



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Biologie Animale

Département :

قسم :

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

**Caractérisation et sensibilité aux antibiotiques des souches
Helicobacter pylori impliquées dans les pathologies
gastroduodénales**

Présenté et soutenu par :

Le : 30/06/2015

- Keita Mamoudou
- Mesfar Meriem

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : M^{me} Satta D (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : Mr Rezgoune ML (Maître assistant - UFM Constantine).

Co-rapporteur : M^{elle} Mehasni S (Doctorante-UFM Constantine)

Examinatrice : M^{me} Ziada-Bouchar H (Maître assistante - UFM Constantine).

*Année universitaire
2014 - 2015*

Remerciements

Nous voudrions présenter nos remerciements et notre gratitude en premier lieu au chef de service de Microbiologie du CHU de Constantine **Mr Benlabed. K** pour nous avoir accueilli dans son laboratoire.

A **M^{me} Bentchouala .C** professeur au service de Microbiologie du CHU de Constantine pour son soutien dans la réalisation de la partie pratique.

Au chef de service d'exploration endoscopique le professeur **Boussafsaf. B** et au **Dr Slimani. S** qui nous a permis de récupérer des biopsies gastriques.

Nous remercions vivement **Mr Rezgoune. ML** et **M^{elle} Mehasni. S** de nous encadrer et nous avoir suivi régulièrement pour la réalisation de ce travail et de tout ce qu'ils ont fait pour nous permettre d'atteindre ces résultats.

Nos remerciements s'adressent également à tous membres du jury d'Examens : **M^{me} Satta D** professeur de l'université des frères Mentouri Constantine et **M^{me} Ziada-Bouchar H** maître assistante classe A à l'université des frères Mentouri Constantine qui nous ont fait l'honneur de leur présence et d'avoir sacrifié leur temps pour juger ce travail.

A tous nos enseignants du département de Biologie animale, qui nous ont transmis le goût de l'étude.

« **A tous ceux qui, de loin ou de près ont contribué à la réalisation de ce mémoire** »

Résumé

Helicobacter pylori est une bactérie à Gram-négatif, microaérophile colonisant durablement l'estomac humain. Sa présence est associée à diverses pathologies de sévérité variable, dont la gastrite chronique, l'ulcère peptique, le lymphome du MALT et l'adénocarcinome gastrique.

Son pouvoir pathogène repose sur plusieurs facteurs pro-inflammatoire tels que l'îlot de pathogénicité cag, la protéine OipA et la protéine VacA.

L'objectif de ce travail est de détecter la présence des souches de *H. pylori* chez des patients en consultation endoscopique afin de les caractériser et de déterminer leur sensibilité aux antibiotiques.

Nous avons utilisé des méthodes invasives nécessitant une endoscopie digestive haute et des biopsies systématiques afin de réaliser des frottis colorés, uréase test et culture.

Dans cette étude *H. pylori* a été identifié par ses principaux caractères culturels, morphologiques et biochimiques.

Seulement deux biopsies ont révélé la présence de *H. pylori*, cette abondance de négativité ne signifie pas forcément l'absence de la bactérie, elle est expliquée par la fragilité du germe et sa nécessité à des conditions de transport, d'atmosphère et de culture très exigeantes.

La réalisation de l'antibiogramme par la méthode de diffusion a révélé une seule résistance, celle de la souche BHp8 au métronidazole (l'une des résistances les plus fréquentes dans le monde).

La découverte des résistances permet de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement d'éradication de l'infection à *H. pylori*.

Mots clés : *Helicobacter pylori*, pathologies gastroduodénales, antibiogramme, biopsies.

Abstract

Helicobacter pylori is a gram - negative bacterium , microaerophilic permanently colonizing the human stomach . Its presence is associated with various pathologies of varying severity, including chronic gastritis, peptic ulcer, MALT lymphoma and gastric adenocarcinoma.

her pathogenicity based on several proinflammatory factors such as the cag pathogenicity ilot, the OIPA protein and the VacA protein.

The objective of this work is to detect the presence of *H. pylori* strains in patients endoscopic consultation to characterize and determine their sensitivity to antibiotics

We used invasive methods require upper gastrointestinal endoscopy and systematic biopsies to achieve stained smears , urease test and culture.

In this study *H. pylori* was identified by its main characters cropping , morphological and biochemical.

Only two biopsies revealed the presence of *H. pylori* , this abundance of negativity does not necessarily mean the absence of the bacterium , it is explained by the fragility of the germ and the need to transport conditions , atmosphere and culture very demanding .

The completion of the susceptibility by the diffusion method revealed a single resistor , that of strain BHp8 metronidazole (one of the most frequent resistance in the world).

The discovery of the resistance used to define new therapeutic strategies for eradication therapy of *H. pylori* infection .

Keywords: *Helicobacter pylori*, gastroduodenal pathology , susceptibility , biopsies.

H.pylori هي بكتيريا سالبة القرام، ألفية هوائية تحتل بصفة دائمة معدة الإنسان يرتبط وجودها بأمراض متفاوتة الخطورة مثل: إتهاب المعدة، القرحة المعدية، سرطان الغدد الليمفاوية، MALT و سرطان المعدة. تركز قدرتها المرضية على عدة عوامل مسببة للإتهاب مثل *l'ilot* الإمرضية، *cag*، البروتين *OipA* و البروتين *VacA*.

الهدف من هذا العمل هو البحث عن وجود سلالات ال *H.pylori* لدى المرضى خلال الخضوع لعملية الكشف بالمنظار وذلك لغرض دراسة مميزاتها والكشف عن حساسيتها للمضادات الحيوية. قمنا باستعمال وسائل تتطلب عملية الكشف بالمنظار الأعلى واستخراج الخزعات بصفة تلقائية وذلك لغرض تحقيق لطخات ملونة، والبحث عن إنزيم حمض البولة والزرع. في هذه الدراسة تم التعرف على *H.pylori* من خلال مميزاتها الأساسية في الزرع، مورفولوجيتها وخصائصها البيوكيميائية. من بين كل الخزعات المستعملة أظهرنا وجود *H.pylori* فقط في إثنان. وجود هذه النتائج السلبية لا يؤكد خلو هذه الخزعات من *H.pylori* ولكن يبين هشاشة هذه الجرثومة و احتياجها إلى شروط نقل، هواء، زرع جد دقيقة.

إستعمال *l'antibiogramme* بواسطة طريقة الانتشار بينت وجود مقاومة واحدة لسلالة BHp8 لل *metronidazole* (واحد من أكبر المقاومات الأكثر انتشارا في العالم) إكتشاف الطفرات يسمح بتعريف الطرق الجديدة لعلاج والقضاء على *H.pylori*.

الكلمات المفتاحية: *Helicobacter pylori*، أمراض المعدة، *antibiogramme*، الخزعات.

Liste des figures

Figure 1 : <i>H. pylori</i> vu au microscope électronique à balayage G x21,000.....	4
Figure 2 : Pathologies gastriques induites par l'infection à <i>H. pylori</i>	9
Figure.3 : Colonisation de la muqueuse gastrique et genèse des lésions par <i>H. pylori</i>	15
Figure 4 : Visualisation <i>H. pylori</i> sur coupe histologique	18
Figure 5 : Principe du test respiratoire à l'urée marquée au ¹³ C.....	19

Liste des tableaux

Tableau. I : renseignements cliniques des patients.....	26
Tableau II : Résultats de l'étude bactériologique des biopsies.....	34
Tableau III : résultats de l'antibiogramme des deux souches isolées.....	35

Liste des photographies

Photographie.1 : résultat du test à l'uréase à partir de biopsies.....	30
Photographie. 2 : observation microscopique d'un frottis coloré par la méthode de Gram à partir des biopsies gastriques G x100.....	30
Photographie.3 : aspect macroscopique des colonies de <i>H. pylori</i> sur gélose au sang.....	31
Photographie.4 : aspect microscopique des isolats sous microscope optique G x100.....	32
Photographie.5 : résultat du milieu urée-indole à partir des isolats.....	32
Photographie 6 : test de catalase des isolats.....	33
Photographie.7 : test à l'oxydase des isolats.....	33
Photographie.8 : Résultats de l'antibiogramme sur gélose Mueller Hinton au sang frais.....	35

Liste des abréviations

Ahp : Alkylhydroperoxyde

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

Alp : Adhesin-like protein

Ap-1 : Activator protein 1

BabA : Blood group antigen-binding adhesin

BGT : Bouillon glucose tamponné

BHIB : Brain Heart Infusion Broth

CagA : Cytotoxin Associated Gene A

cagPA : Cytotoxin Associated Gene- P_Athogenicity Island Centimètre

CLO : Campylobacter like organism

CLO-test : Campylobacter like organism test

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

DupA : Duodenal ulcer promoting gene A

EPIC : European prospective investigation into cancer and nutrition

HES : Hématoxyline Éosine Safran

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

H. pylori : *Helicobacter pylori*

IL : Interleukine

IPP : Inhibiteurs de la Pompe à Proton

LPS : Lipopolysaccharide

MALT : Mucosa-Associated Lymphoid Tissue

MMP : Matrix metalloproteinase

NF-kappa B : Nuclear factor-kappa B

OipA : Outer inflammatory protein

OMP : Outer membrane protein

ON : Oxyde nitrique

PG : Peptidoglycane

PLP : Protéines de liaison aux pénicillines

PTI : Purpura thrombopénique idiopathique

PZ : Plasticity zone

Sab A : Sialic acid-binding adhesin

SOD : Superoxyde dismutase

Th : T helper

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

VacA : Vacuolating Cytotoxin Agent A

Table des matières

Introduction.....	1
Revue bibliographique	
I. Généralités sur l' <i>Helicobacter pylori</i>	2
I.1. Historique.....	2
I.2. Taxonomie.....	2
I.3. Caractères bactériologiques.....	3
I.3.1. Culture et croissance.....	3
I.3.2. Morphologie.....	4
I.3.3. Biochimie.....	5
I.3.4. Caractères génomiques et diversité génétique des souches.....	5
II. Pathologies associées à l'infection à <i>H. pylori</i>	7
II.1. Mode de transmission de l'infection.....	7
II.1.1. Transmission oro-orale.....	7
II.1.2. Transmission féco-orale.....	7
II.1.3. Transmission gastro-orale.....	7
II.2. Aspects Cliniques des pathologies liées à l' <i>Helicobacter pylori</i>	7
II.2.1. Ulcères.....	8
II.2.2. Néoplasies gastriques.....	8
II.3. Déterminisme pathologique associé à l' <i>Helicobacter pylori</i>	9
II.3.1. Facteurs de colonisation.....	10
II.3.2. Facteurs de persistance.....	12
II.3.3. Facteurs de pathogénicité.....	13
III. Diagnostique de l'infection.....	16
III.1. Les méthodes directes invasives.....	16

III.2. Les méthodes non invasives.....	18
IV. Traitement de l'infection à <i>H. pylori</i>	22
IV.1. Evolution des traitements.....	22
IV.1.1. Monothérapies.....	22
IV.1.2. Bithérapie.....	22
IV.1.3. Trithérapies.....	23
IV.1.4. Quadrithérapie.....	23
IV.2. Facteurs de l'échec du traitement médical.....	23
IV.2.1. Résistance aux antibiotiques.....	23
IV.2.3. Mauvaise observance du traitement.....	24

Matériels et méthodes

1. Lieu de travail.....	26
2. Etude microbiologique.....	26
2.1. Isolement et caractérisation de <i>Helicobacter pylori</i>	26
2.1.1. Prélèvements.....	26
2.1.2. Transport et conservation des biopsies.....	26
2.1.3. Ensemencement et caractérisation de <i>Helicobacter pylori</i>	27
2.2. Réalisation de l'antibiogramme.....	29
3. Conservation des isolats.....	29

Résultats et Discussion

I. Résultats.....	30
1. Isolement et caractérisation de <i>Helicobacter pylori</i>	30
1.1. Test à l'uréase à partir de biopsies.....	30
1.2. Frottis coloré à partir de biopsies.....	30
1.3. Examen macroscopique.....	31
1.4. Examen microscopique.....	31

1.5. Caractéristiques biochimiques des isolats	32
1.5.1. Recherche de l'activité uréasique.....	32
1.5.2. Recherche de la catalase.....	33
1.5.3. Recherche de l'oxydase	33
2. Résultats de l'antibiogramme	34
II. Discussion.....	36
Conclusion	38
Références bibliographiques	40
Annexes	

Introduction

Introduction

Jusqu'au début des années 80, une éventuelle implication bactérienne dans les pathologies gastriques n'avait jamais été envisagée. Seul le rôle de l'hyperacidité gastrique liée au stress et à d'autres facteurs environnementaux et génétiques était pris en considération [1].

Il a fallu attendre les travaux de l'Australien Barry Marshall (1982) pour que le rôle central de *Helicobacter pylori* dans l'ulcère du duodénum et de l'estomac soit reconnu [2]. Il est aujourd'hui clairement établi que toute colonisation de la muqueuse gastrique par *H. pylori* entraîne une gastrite pouvant évoluer vers des formes plus sévères d'ulcération ou de transformation maligne [3].

H. pylori est une bactérie à Gram négatif, hélicoïdale, incurvée ou droite. Sa principale caractéristique biochimique réside dans son activité uréasique qui lui permet de résister à l'acidité gastrique. La survie et la persistance de la bactérie sont liées à l'expression de plusieurs facteurs de colonisation et de virulence [4].

La comparaison du génome des différentes souches séquencées a permis de mettre en évidence une grande diversité génétique chez *H. pylori*.

L'infection de *H. pylori* est principalement transmise par deux principales voies oro-orale et féco-oral. La moitié de la population mondiale est touchée par cette infection [5].

Le diagnostic de l'infection à *H. pylori* peut se faire par des méthodes directes (invasives) notamment par la mise en culture qui a un gros avantage dans la détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Actuellement le taux de succès d'éradication de l'infection est à son plus bas niveau, notamment en raison de la résistance aux antibiotiques [6].

L'objectif de ce travail est de détecter la présence des souches de *H. pylori* chez des patients en consultation endoscopique afin de les caractériser et de déterminer leur sensibilité aux antibiotiques.

Revue bibliographique

I. Généralités sur *H. pylori*

I.1. Historique

La découverte de l'*Helicobacter pylori* a été tardive en raison de son habitat principal qui est l'estomac humain. En effet ce dernier, compte tenu de son hyperacidité fut longtemps considéré comme un milieu stérile et hostile à toute présence bactérienne [7].

De nombreuses observations suspectant la présence de bactéries dans l'estomac humain n'ont pas été validées par la communauté scientifique jusqu'à la mise en évidence de *H. pylori* dans l'estomac humain par Barry Marshall et Robin Warren en 1982 [8].

Après avoir échoués plusieurs fois à cultiver la bactérie les deux chercheurs ont finalement réussi à visualiser les colonies en 1982 quand ils ont involontairement laissé leurs boîtes de Pétri incubant pendant cinq jours au cours du week-end de Pâques [1].

Ils la baptisèrent initialement *Campylobacter-like organisme* (CLO) en pensant que c'était une nouvelle espèce du genre *Campylobacter* [1]. La bactérie fut ensuite nommée *Campylobacter pyloridis* sur base de la suggestion de Skirrow [9]. Pour des raisons de grammaire latine, elle prit le nom de *Campylobacter pylori* [9,10]. Puis finalement la bactérie devint *Helicobacter pylori* en 1989 après un séquençage de son ADN et d'autres études sur sa morphologie.

De ces études, ils ont découvert qu'il n'appartient pas au genre *Campylobacter*, mais plutôt à son propre genre celui des *Helicobacter* [11].

La découverte de *H. pylori* a révolutionné l'approche de l'ulcère, et l'axiome classique «pas d'acide, pas d'ulcère» s'est complété par «pas de *Helicobacter pylori* pas d'ulcère» [2].

H. pylori est classé carcinogène de type I par l'Organisation Mondiale de la Santé en 1994 [12].

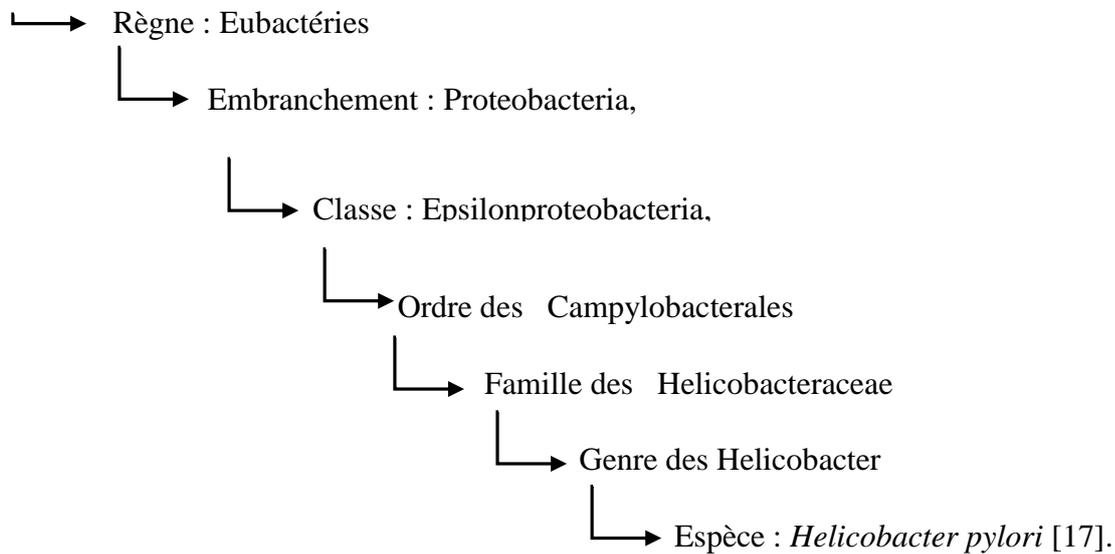
En 2005 Barry Marshall et Robin Warren reçoivent le prix Nobel de physiologie et de médecine pour leurs travaux sur *H. pylori* et l'ulcère gastroduodéal.

Aujourd'hui, il est clairement établi que *H. pylori* est un germe pathogène de la muqueuse gastrique de l'homme [13].

I.2. Taxonomie

H. pylori est une bactérie de forme hélicoïdale découverte dans une zone de l'estomac proche du pylore, d'où son nom [14]. Elle fait partie d'un nouveau groupe de bactéries appelé super famille VI des bacilles Gram négatif, qui comprend 4 genres : *Helicobacter*,

Campylobacter, Arcobacter et Wolinella [15]. L'analyse de l'ARNr 16S a permis de classer l'espèce *H. pylori* dans la subdivision des bactéries pourpres (protéobactéries) [16]. Actuellement, cette bactérie est classée dans le :



I.3. Caractères bactériologiques

I.3.1. Culture et croissance

H. pylori est une bactérie très exigeante nécessitant des conditions de culture particulières. C'est une bactérie microaérophile c'est-à-dire qu'elle nécessite pour sa croissance une faible proportion d'oxygène (3% à 5%) [18]. En outre l'atmosphère doit être humidifiée et contenir une proportion de 6-10% de CO₂ [18]. Cependant en subculture beaucoup de souches peuvent croître en atmosphère simplement enrichie en CO₂ à 10% [19, 20].

La température optimale de culture est de 37°C. Cependant toutes les souches peuvent se développer à des températures variant entre 33 et 40 °C. Le pH optimal de croissance est compris entre pH 6,9 et 8,0 [18, 21].

Le contenu nutritionnel du milieu de culture est également spécifique à la bactérie. Pour cela on utilise généralement un milieu constitué d'une base gélosée (milieu *Brucella*, coeur-cerveille, Columbia, Wilkins-Chalgren ou Mueller-Hinton) additionnée de 10% de sang de cheval, mouton ou humain. Certains auteurs ont proposé de remplacer le sang par du sérum (de veau, de cheval ou humain). D'autres suppléments de croissance ont été proposés (vitamines, β-cyclodextrine...) [19, 20].

Pour bien isoler la bactérie et éviter toute contamination portant atteinte à sa viabilité, on utilise des antibiotiques et des antifongiques [22]. Après l'incubation de la culture les colonies de *H. pylori* apparaissent tardivement. En primo-culture, elles apparaissent en 3 à 12 jours sur gélose au sang. Les primo-cultures doivent donc être incubées 12 jours et examinées chaque jour à partir du troisième jour. En subculture, la croissance est plus rapide, les colonies sont visualisées en 2 à 3 jours [19, 20].

Par ailleurs le meilleur échantillon pour réaliser une culture de *H. pylori* est les biopsies gastriques. Le transport des biopsies doit être effectué dans des conditions particulières pour maintenir la viabilité des bactéries.

I.3.2. Morphologie

Les bactéries du genre *Helicobacter* sont Gram négatives, hélicoïdales, incurvées ou droites [23]. Ce bacille non sporulé mesure 0,5 à 1 μm de large et 2,5 à 4 μm de long [18, 24]. Il possède à l'une de ses extrémités 4 à 6 flagelles unipolaires [18, 24], qui présentent la particularité d'être engainées et de comporter un bulbe terminal analogue à celui présent sur les flagelles des bactéries du genre *Vibrio* [25]. La présence de ces flagelles associée à la forme spiralée de la bactérie confère à *H. pylori* une grande mobilité [25].

Au microscope optique, la morphologie peut varier entre une forme bacillaire en U, en S, C ou en O. De plus lorsque les cultures sont vieilles, apparaissent des formes coccoïdes non viables. La forme coccoïdale peut également être observée dans un milieu pauvre ou dans des conditions défavorables de culture [26].

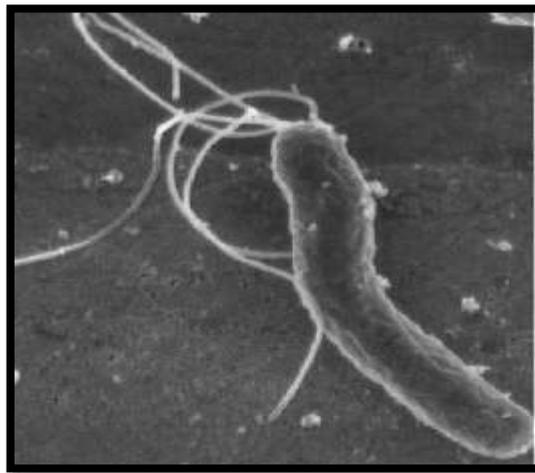


Figure 1 : *H. pylori* vu au microscope électronique G x21,000 (Bergey's Manual, 2005) [27].

I.3.3. Biochimie

La bactérie *H. pylori* a un faible équipement enzymatique, elle ne peut pas dégrader l'hydrate de carbone ni par fermentation ni par oxydation. Elle utilise les acides aminés et les acides organiques comme source d'énergie mais pas les sucres, ce qui signifie que *H. pylori* est une bactérie asaccharolytique [28].

Cependant certains travaux laissent supposer que *H. pylori* pourrait utiliser faiblement le glucose par la voie des pentoses [29]. Signalons encore qu'elle peut produire son énergie par méthanogenèse à partir d'hydrogène.

Cette bactérie infectieuse qui ne colonise que la muqueuse gastrique [30] est capable de produire un groupe d'enzymes nécessaires pour sa survie, son métabolisme et sa pathogénicité [31]. Elle produit l'oxydase [32], la cytochrome catalase [33] et la superoxyde dismutase [34] et synthétise également une γ - glutamyl transférase, une leucine aminopeptidase, une DNase, une phospholipase et aussi une phosphatase alcaline [35, 36]. Cependant la principale caractéristique de *H. pylori* réside dans son activité uréasique qui lui permet de résister à l'acidité gastrique, par modification de l'environnement acide en milieu alcalin par l'hydrolyse de l'urée en ammoniac grâce à son uréase [21, 28].

I.4. Caractéristiques génétiques et diversité des souches

H. pylori comme la plupart des bactéries possède un seul chromosome circulaire.

Son génome a été séquencé pour la première fois en 1997 à partir d'une souche référence (souche 26695) chez un patient anglais atteint de gastrite chronique [37].

En 2010, 32 souches ont été séquencées [38]. La taille du génome, l'ordre des gènes et l'ordre des nucléotides diffèrent en fonction des souches. La taille de la séquence génomique varie de 1,5 Mb à 1,67 Mb Selon les souches. La teneur en GC dans le génome de *H. pylori* est de l'ordre de 39 % [38, 39]. 30 % des gènes de *H. pylori* seraient spécifiques à l'espèce [40]. Ce qui reflète la présence exceptionnelle de la bactérie dans l'acidité gastrique. Cependant environ 1200 gènes sont communs à toutes les souches, et 200 à 400 gènes situés principalement dans des zones de plasticité ou dans l'îlot de pathogénicité *cag* (*cagPAI*), sont présents de manière variable entre les différentes souches [40].

Toutes les souches étudiées contiennent des plasmides. La plupart des souches portent de 1 à 3 plasmides, chez certaines, jusqu'à 6 plasmides ont été retrouvés [41].

Tjia et al (1987) ; Graham et al (1988) puis Penfold et al (1988) rapportent que la taille des plasmides varie de 3,7 à 147 Kb chez 35-58% des souches [42, 43, 44].

La comparaison du génome des souches séquencées a permis de mettre en évidence une grande diversité génétique chez *H. pylori* [45].

Cette diversité peut être présentée sous l'angle d'une microdiversité (polymorphisme intragénétique) et d'une macrodiversité (absence ou présence d'un gène entre les souches) [46]. Le polymorphisme génétique (microdiversité) trouvé entre le génome des différentes souches séquencées apporte une explication au caractère quasi unique de chaque souche de telle sorte que chaque souche isolée d'un sujet est virtuellement différente de toutes les autres [47, 48]. La macrodiversité concerne principalement la présence ou l'absence de gènes entre les souches (gènes spécifiques de souches).

Ainsi selon les différentes études publiées (Salama *et al.* 2000 ; Gressmann *et al.* 2005 ; Han *et al.* 2007 ; Romo-Gonzalez *et al.* 2009) 20 à 25 % des gènes étaient «souches-spécifiques» ou « non-ubiquistes » [49, 50, 51, 52].

La plupart de ces gènes codent pour des protéines de fonctions inconnues, des transposases ou des gènes appartenant au système de Restriction-modification [45].

Ces gènes non-ubiquistes sont localisés principalement dans 2 grandes régions de l'ADN génomique de *H. pylori*, le *cag* PAI et la zone de plasticité (PZ), caractérisées par un GC % différent de celui du reste du génome. Le *cag* PAI est principalement transmis sous la forme d'un bloc unique de 27 gènes, tandis que la PZ contient de multiples transposases, endonucléases, suggérant des phénomènes de recombinaison, insertion et délétion [45].

Malgré son exceptionnelle diversité génétique, cependant grâce à l'analyse du polymorphisme génétique de 7 gènes de ménage (*atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI*, *yphC*), il a été mis en évidence une forte structure phyléogéographique chez *H. pylori* [53, 54].

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

II.1. Mode de Transmission de l'infection

H. pylori est principalement transmis par trois voies :

II.1.1. Transmission oro-orale

Helicobacter pylori a été retrouvé dans la bouche. Une transmission par voie orale à partir de la bouche est possible. La prémastication d'aliments par la maman a été avancée comme source de contamination de leurs enfants dans différentes populations [55].

L'utilisation de baguettes et le partage d'un même plat au sein de communautés chinoises ont été identifiés comme facteurs de risque de transmission [56].

II.1.2. Transmission féco-orale

L'isolement récent de *H. pylori* dans des selles de sujets africains, oriente plutôt vers une transmission de type féco-orale [57]. L'hypothèse de la contamination à partir des selles a été longtemps écartée, du fait que l'excrétion fécale de la bactérie est difficile à mettre en évidence, en raison des concentrations bactériennes inférieures à celles des micro-organismes pathogènes, habituellement rencontrés. [58].

II.1.3. Transmission gastro-orale

On peut certainement contaminer un sujet au cours d'une endoscopie digestive haute, ce risque de transmission de *H. pylori* est un des motifs de désinfection du matériel endoscopique entre deux examens [59].

II.2. Aspects Cliniques des pathologies liées à l'*Helicobacter Pylori*

L'infection à *H. pylori* a lieu généralement dans l'enfance et persistera toute la vie s'il n'y a pas de traitement d'éradication [60]. Chez tous les sujets infectés, il en résulte rapidement une gastrite aiguë suivie d'une gastrite chronique [61]. Dans la majorité des cas, environ 90 %, la gastrite chronique évolue sans autre conséquence et reste asymptomatique [40,62]. Cependant dans environ 10 % des cas cette gastrite chronique évolue vers d'autres pathologies sévères et symptomatiques en fonction de sa localisation dans l'estomac, de sa sévérité, du sujet infecté et de la durée d'infection [60], Ces autres pathologies sont principalement des ulcères (duodénal et gastrique) et des néoplasies gastriques (cancer gastrique et lymphome du Mucosa-

Associated Lymphoid Tissue) [60]. La durée d'apparition de ces pathologies peut être de plusieurs dizaines d'années (environ 40 ans pour le cancer gastrique) [45]. C'est l'une des raisons pour laquelle la plupart des enfants infectés ne sont pas atteints de ces pathologies.

Chez un hôte constitutionnellement "hypersécréteur" acide, *H. pylori* s'installe dans l'antra (gastrite antrale) où le pH est légèrement plus élevé et l'infection pourrait évoluer vers un ulcère duodénal. Chez le sujet "hyposécréteur" acide, *H. pylori* colonise toute la muqueuse gastrique (Pangastrite) et l'infection évoluera plutôt vers un ulcère gastrique ou un cancer gastrique [61]. Quant au lymphome de MALT, sa localisation n'est pas spécifique et apparaît généralement dans une acidité normale [40].

II.2.1. Ulcères

Les ulcères dus à *H. pylori* sont deux en fonction de leur localisation : ulcère duodénal (au niveau du duodénum) et l'ulcère gastrique (muqueuse gastrique) [40, 63, 64]. On parle d'ulcère gastroduodénal [63].

Il s'agit d'une lésion, une perte de substance de l'épithélium de l'estomac ou du duodénum. Sur le plan clinique le signe le plus palpable et commun est le signe anatomique, cette lésion de la paroi de l'estomac ou du duodénum. L'ulcère a été observé chez des sujets ne se plaignant de rien. Cependant certains signes sont partagés par la plupart des patients dont les épigastralgies et le pyrosis. Les complications les plus sévères de la maladie sont l'hémorragie digestive haute [65] et la perforation gastrique ou duodénale, cette dernière étant rare [66].

Des études épidémiologiques montrent que *H. pylori* est responsable de 80 % des ulcères gastroduodénaux et le reste étant attribué à d'autres facteurs en particulier des AINS (Anti-inflammatoire non stéroïdien) [60].

II.2.2. Néoplasies gastriques

L'infection à *H. pylori* conduit également dans environ 1 % des cas à deux types de néoplasies gastriques, les adénocarcinomes gastriques hors cardia (1 %) et le lymphome gastrique du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) (0,1 %) [40].

L'adénocarcinome gastrique apparaît au fil des décennies à la suite de modifications histologiques de la muqueuse décrites sous le nom de cascade de Correa [67].

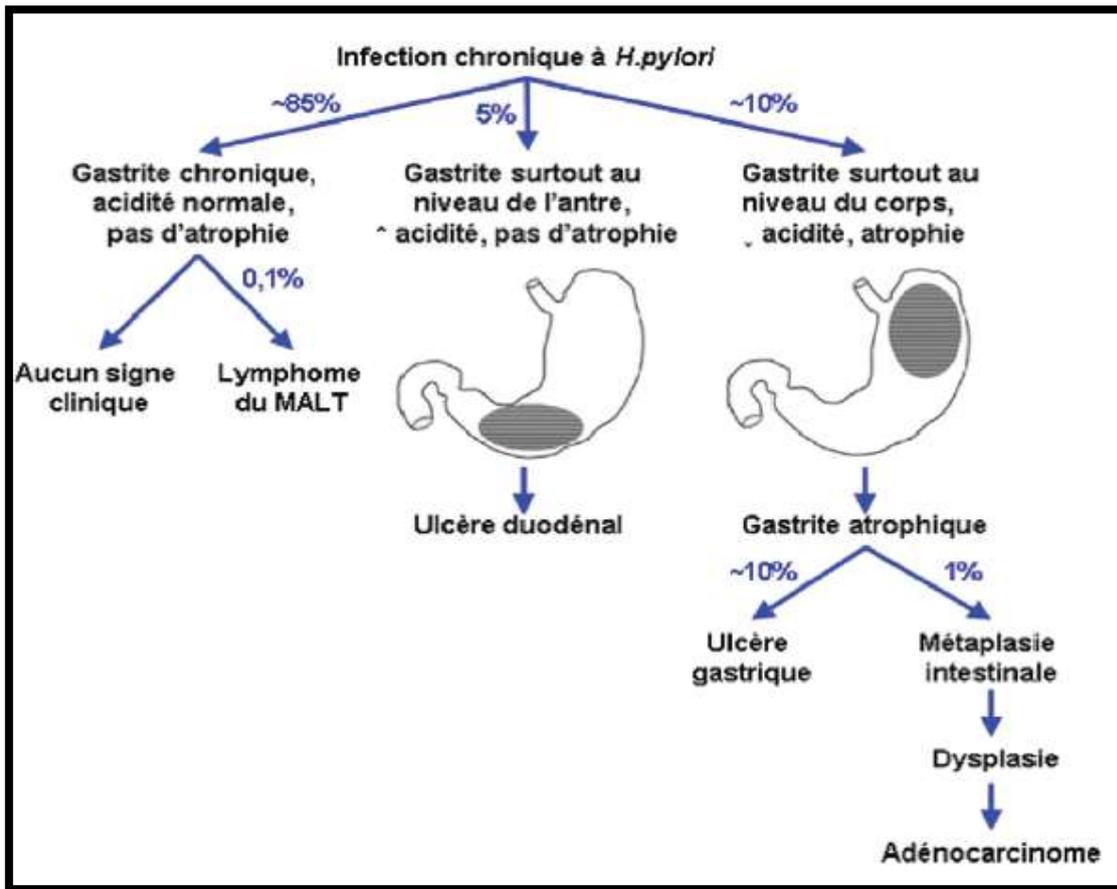


Figure 2 : Pathologies gastriques induites par l'infection à *H. pylori* (Varon C et Megraud F, 2013) [40].

II.3. Déterminisme pathologique associé à l'*Helicobacter pylori*

H. pylori dispose de tout un arsenal de propriétés lui permettant de survivre dans l'estomac et provoquer à long terme une variété de pathologies chez l'hôte [68].

La séquence d'événements qui conduit au développement d'une des pathologies implique tout d'abord la colonisation gastrique par *H. pylori*, sa persistance dans l'estomac et des facteurs conférant à la bactérie des propriétés pro-inflammatoires accrues, tels que l'îlot de pathogénicité *cag*, la protéine OipA ou protéine activatrice des neutrophiles (HP-NAP), ces derniers sont considérés comme des facteurs de pathogénicité.

Cependant d'autres facteurs ne dépendant pas de *H. pylori* comme les facteurs environnementaux (facteurs nutritionnels) et les facteurs dépendant de l'hôte (polymorphisme génétique de l'hôte) contribuent à l'apparition des pathologies sévères comme l'ulcère et les néoplasies gastriques [69].

Par ailleurs les seuls déterminants pathologiques chez *H. pylori* peuvent être répartis en 3 groupes : les facteurs de colonisation, les facteurs de persistance et les facteurs de pathogénicité.

II.3.1. Facteurs de colonisation

Les facteurs de colonisation sont présents sur l'ensemble des souches cliniques [68]. Il s'agit des facteurs qui assurent à *H. pylori* le pouvoir de coloniser la muqueuse gastrique. En occurrence trois facteurs confèrent à *H. pylori* le pouvoir de coloniser l'estomac : la mobilité, l'uréase pour la régulation du pH acide autour de la bactérie [70] et enfin les facteurs d'adhérence assurant à *H. pylori* son adhésion aux cellules cibles, les cellules épithéliales gastriques [71].

Mobilité

La mobilité de *H. pylori* est assurée par 5 à 7 flagelles unipolaires et engainés [68]. Cette machinerie flagellaire aide la bactérie à fuir l'acidité gastrique, à atteindre l'épithélium et à se propager à travers le mucus visqueux qui couvre les cellules épithéliales de la muqueuse gastrique [72].

Les filaments flagellaires de cette bactérie sont constitués par des polymères de deux sous-unités de flagelline, une majeure FlaA et une mineur, FlaB codées respectivement par les gènes *flaA* et *flaB* qui s'expriment en fonction des conditions environnementales.

Uréase

La majorité des souches étudiées produisent de l'uréase en grande quantité (6 à 10 % des protéines totales) [68]. C'est cette enzyme qui assure à *H. pylori* sa résistance à l'acidité gastrique. En effet l'uréase hydrolyse l'urée présente dans l'environnement gastrique, permettant une production d'ammoniac et de carbonate. L'ammoniac issu de l'hydrolyse capte un proton et devient ammonium qui permet de neutraliser localement l'acidité gastrique créant ainsi un microenvironnement favorable au développement de la bactérie [73]. L'uréase de *H. pylori* est principalement cytoplasmique [68].

Les gènes codant pour l'uréase sont organisés en un opéron bicistronique comprenant les gènes de structures de l'apoenzyme (*ureA* et *ureB*) et cinq gènes (*ureIEFGH*) [68] dont quatre (*ureEFGH*) codent pour les protéines accessoires qui activent l'enzyme par

incorporation des ions nickels [74] et un, *ureI* codant pour une protéine membranaire assurant le transport efficace de l'urée vers le cytoplasme où a lieu la réaction d'hydrolyse.

Des études de cristallographie montrent que l'uréase de *H. pylori* est un complexe dodécamérique [(UreAUreB)₃]₄ contenant 12 sous-unités catalytiques (UreB) fixant chacune 2 ions de nickel (24 ions/molécule) [68].

Cependant en plus des gènes de l'opéron uréasique un certain nombre de gènes ont été identifiés comme modulant l'activité uréolytique chez *H. pylori* [68]. C'est le cas des gènes codant pour les protéines NixA (transporteur à haute affinité des ions nickel), HP548, HP511, HP1041 ou la protéine FlbA [75]. Il a été démontré que des souches déficientes en une de ces protéines semblent avoir une activité uréolytique diminuée [75].

L'uréase est aussi un déterminant essentiel à la virulence de la bactérie, l'ammoniac produit sous l'action de l'uréase est cytotoxique et peut causer des dommages cellulaires [76].

Les souches mutantes non uréolytiques de *H. pylori* semblent incapables de coloniser la muqueuse gastrique [77].

Facteurs d'adhérence

H. pylori grâce à sa mobilité efficace peut traverser le mucus où il se multiplie pour atteindre les cellules épithéliales gastriques et y adhérer. L'adhérence est assurée par des interactions spécifiques entre les adhésives de *H. pylori* et les cellules hôtes [78]. L'adhésion de *H. pylori* à l'épithélium gastrique est considérée comme un facteur essentiel à l'implantation de la bactérie au niveau de la muqueuse gastrique.

Un certain nombre d'adhésives ont été caractérisées à ce jour.

Il s'agit principalement des adhésines :

- BabA ((Blood group antigen binding adhesin)

BabA est codée par le gène *babA* (hp1243) [68] qui existe sous deux formes alléliques : *bab A1* et *bab A2*, ce dernier se distingue de l'autre par une insertion de 10 pb dans la partie 3'. Il a été démontré que les souches *bab A2* expriment une adhésine fonctionnelle (BabA2) qui se lie avec les antigènes Lewis b (Leb), présents sur les cellules épithéliales gastriques.

- Sab A (Sialic acid binding adhesion)

Codée par le gène *sabA* (hp0725) SabA reconnaît comme récepteur une forme sialylée des motifs Lewis X [68] exprimés à la surface des cellules épithéliales.

L'expression de l'antigène sialylé Lewis x est induite durant l'inflammation gastrique

chronique, ce qui indique que *H. pylori* peut moduler les motifs de glycosylation des cellules de l'hôte pour améliorer l'adhérence et la colonisation [79].

- Alp (Adhesin-like protein) A et B

Les protéines AlpA et AlpB sont codées respectivement par les gènes *alpA* (hp0912) et *alpB* (hp0913) [80] dont l'inactivation conduit pour chacun d'eux à une diminution de l'adhésion au tissu gastrique humain [68].

II.3.2. Facteurs de persistance

Les facteurs de colonisation permettent à *H. pylori* de survivre à l'acidité et de se multiplier au niveau de la muqueuse. Cependant pour pouvoir persister et se maintenir durant des dizaines années, *H. pylori* doit faire face à la réponse humorale et cellulaire de l'hôte. Plusieurs études récentes montrent que la réponse immunitaire de l'hôte ne peut éliminer *H. pylori* et par conséquent celui-ci peut demeurer longtemps dans l'estomac en absence de traitement d'éradication. Les macrophages sont connus comme les effecteurs les plus importants dans la réponse innée contre *H. pylori* [69]. Cependant l'arginase de *H. pylori* peut réduire la production de l'oxyde-nitrite(ON) par les macrophages et assure ainsi la survie de la bactérie car l'élimination du germe par les macrophages a été démontrée ON-dépendante [81].

H. pylori possède 3 enzymes pour résister au stress oxydatif généré par les cellules phagocytaires : la catalase qui dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène [32,82], la superoxyde dismutase (SOD) qui décompose les ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène enfin, l'alkylhydroperoxyde réductase (Ahp) [83].

Indépendamment de ces mécanismes enzymatiques d'échappement à la réponse immunitaire, il a été suggéré que l'abondante quantité d'antigènes relargués dans le milieu extracellulaire, incluant la majorité des antigènes immunodominants, tels que l'uréase et la catalase, pourrait saturer les anticorps locaux et rendre inefficace la réponse immunitaire locale [68]. Certaines protéines pro-inflammatoires de *H. pylori* notamment CagA et VacA (cf. facteurs de pathogénicités) ont une activité immunosuppressive.

II.3.3. Facteurs de pathogénicité

H. pylori possède plusieurs facteurs lui conférant des propriétés pro-inflammatoires tels que :

Îlot de pathogénicité cag (cagPAI)

Les souches de *H. pylori* ont été classées en deux catégories : celles qui possèdent un îlot de pathogénicité *cag* (*cag PAI*) complet et fonctionnel et celles qui en sont totalement ou partiellement dépourvues [84].

Le *cag PAI* est une région génomique de 40 kb contenant environ 31 gènes. Le *cag PAI* est inséré dans le gène chromosomique *glr* codant la glutamate racémase et présente les caractéristiques d'un îlot de pathogénicité. Cet îlot est caractérisé par : i) une grande taille (environ 40 kb, 31 gènes putatifs), ii) un contenu en GC de 35 % différent de celui du reste du génome (39 %), iii) la présence de séquences répétées de 31 paires de base (pb) aux extrémités, iv) une présence variable de séquences d'insertion, v) des homologues à certains facteurs de virulence, et vi) une instabilité génétique [85].

L'interaction d'une souche de *H. pylori* (dont l'îlot *cag* est pleinement fonctionnel) avec une cellule gastrique humaine conduit :

- à l'induction de la sécrétion d'interleukines IL-8, IL-10 et IL-12 par l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF-kappaB),
- à la sécrétion et la translocation de la protéine CagA dans la cellule puis sa phosphorylation sur des résidus tyrosine,
- à un réarrangement du cytosquelette des cellules en contact associé à la formation de structures en forme de pédestales et au phénotype dit de type « colibri » (forme allongée des cellules),
- à une signalisation cellulaire associée à l'induction de facteurs transcriptionnels comme la protéine activatrice 1 (AP-1) ; enfin à l'expression des proto-oncogènes *c-fos* et *c-jun* [68].

Cytotoxine vacuolisante A (VacA)

Le gène *vac A* de *H.pylori* code pour une cytotoxine vacuolisante (Vac A) sécrétée à l'extérieure de la bactérie [86] et agissant sur les cellules épithéliales. Ce gène est présent dans toutes les souches, mais seulement certaines d'entre elles possèdent une activité vacuolisante.

Cette protéine hautement immunogène est associée in vitro à différents phénotypes :

- cytotoxicité provoquant une vacuolisation lors de l'accumulation de VacA dans les membranes endosomales des cellules épithéliales, par apoptose,
- perméabilisation des mono-couches cellulaires : diminution de la résistance électrique trans-épithéliale des cellules et hausse de la perméabilité aux ions Fe^{3+} , Ni^{2+} et aux métabolites de petites tailles ; VacA pourrait avoir pour rôle de favoriser l'apport nutritionnel nécessaire à la croissance de *H. pylori* au niveau de la muqueuse gastrique,
- formation d'un pore d'anion dans des bi-couches lipidiques et sur des membranes plasmiques : des monomères de VacA, activés à pH acide et insérés dans une bi-couche lipidique, se réassocient au niveau membranaire pour former un pore hexamérique impliqué dans un transport d'anions (HCO_3^-) [68].

Lipopolysaccharide (LPS)

Le lipopolysaccharide (LPS) de *H. pylori* a une faible activité biologique comparé à celui des bactéries à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae* [68]. Il possède toutefois des propriétés qui lui sont uniques dans le monde bactérien, puisque qu'il porte des résidus fucosylés associés à l'expression des antigènes Lewis X, ou Lewis Y ou Lewis H type I similaires à ceux que l'on rencontre au niveau des glycoprotéines des cellules épithéliales de la muqueuse gastrique [68]. Ces antigènes bactériens (Lewis) présentent des variations antigéniques permettant à *H. pylori* d'échapper à la réponse immunitaire [87]. Le LPS de *H. pylori* a été décrit comme faible activateur de la réponse immunitaire innée comparé à celui d'autres bactéries Gram-négatif [88, 89].

Peptidoglycane (PG)

Le PG présente plusieurs fonctions biologiques et ses dérivés constitués de petits fragments de PG (muropeptides) sont impliqués dans plusieurs mécanismes cellulaires tels que l'activation des macrophages [90] et l'induction de cytokines [91, 92, 93] et de peptides antimicrobiens [94]. Au cours de l'infection par *H. pylori*, le PG est un acteur fort de l'induction de la réponse immunitaire innée et de l'inflammation.

✚ OipA (Outer inflammatory protein)

OipA est une protéine membranaire inflammatoire de la famille OMP [95]. La présence chez *H. pylori* du gène *oipA* fonctionnel est fortement associée aux ulcères duodénaux, au cancer gastrique et à des infiltrations accrues de polynucléaires neutrophiles [96, 97]. L'expression de OipA est associée à une production élevée d'IL-8 *in vitro* [98]. OipA joue un rôle dans l'induction de l'inflammation gastrique et la production des cytokines inflammatoires IL-1, IL-17 et TNF- α chez les gerbilles de Mongolie [99]. Elle contribue également à l'induction de la métalloprotéase matricielle MMP-1 (matrix metalloproteinase 1) fortement associée au cancer gastrique [100].

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

HP-NAP a été décrite en 1995 par Evans *et al.*[68]. Les travaux les plus récents sur HP-NAP ont confirmé son rôle dans le recrutement chimiotactique des polynucléaires neutrophiles et des monocytes humains au site de l'infection [68].

✚ DupA (Duodenal ulcer promoting gène)

Le gène *dupA* est situé dans la zone de plasticité du génome de *H. pylori* et semble être un marqueur de virulence. *In vitro*, Dup A augmente la production d'IL-8 [101]. La présence de *dupA* est associée au risque de développement d'un ulcère duodénal et/ou cancer gastrique [102].

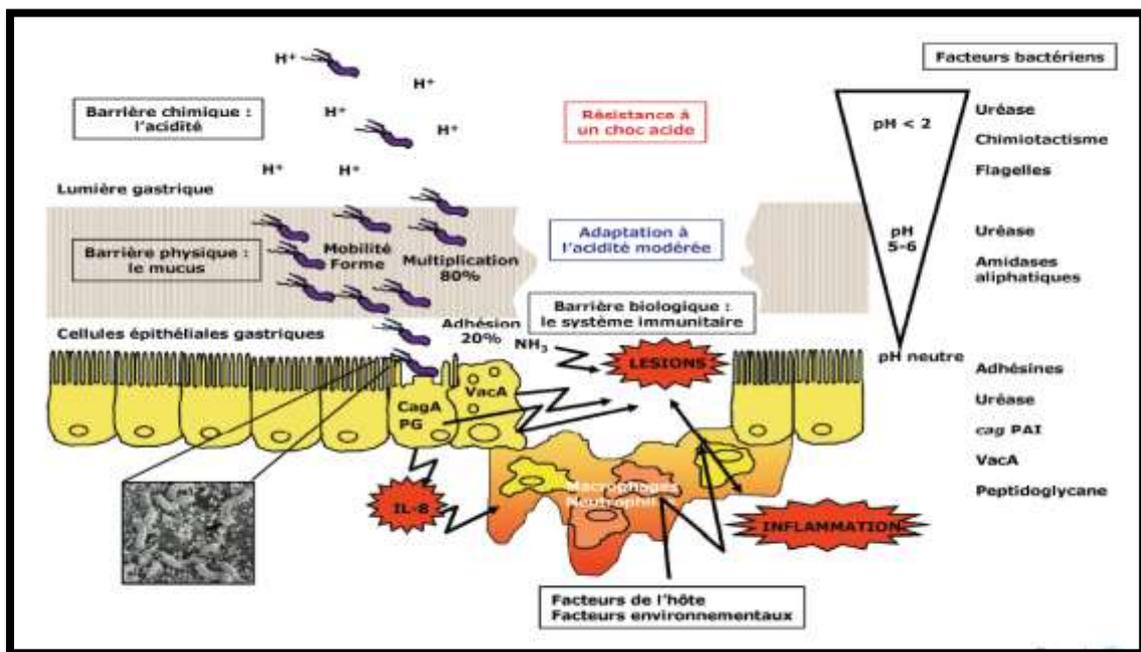


Figure.3 : Déterminisme pathologique associé à *H. pylori* (d'après Breurec S, 2011) [45].

III. Diagnostic de l'infection

Les méthodes de diagnostics pour la détection de l'infection à *H. pylori* peuvent être réparties en deux groupes :

Les méthodes directes invasives ayant recours à la fibroscopie gastrique haute avec biopsies (méthodes biopsies dépendantes) et les méthodes non invasives regroupant les tests diagnostiques ne nécessitant pas la fibroscopie gastrique haute (méthodes sans biopsies) [103].

III.1. Les méthodes directes invasives

Elles consistent à pratiquer plusieurs biopsies de la muqueuse antrale ou fundique au cours d'un examen endoscopique et à rechercher les bactéries dans ces prélèvements biopsiques [103].

Test rapide à l'uréase (CLO-test*)

Ce test est basé sur la propriété de *H. pylori* de posséder une uréase très forte. Les avantages de ce test sont sa facilité et sa rapidité. On obtient la réponse en salle d'endoscopie en 20 à 30 minutes [28]. La limite de ce test est sa faible sensibilité : il faut en effet un nombre de bactéries important (supérieur à 10^5 /g) pour faire virer le test, ce qui limite son utilité pour le contrôle de l'éradication du germe après traitement, car dans ce cas *H. pylori*, même s'il n'a pas disparu, ne sera pas détecté par cette méthode.

L'uréase test est constitué d'un gel d'agar contenant de l'urée, du rouge de phénol comme indicateur de pH, des tampons et d'un agent bactériostatique. La biopsie gastrique est déposée dans le gel qui a une coloration jaune. En cas de présence de *H. pylori* sur le fragment biopsique, l'activité uréasique a pour conséquence la production d'ammonium et de bicarbonate à partir de l'urée. Cette réaction vire au rouge violacé à une température comprise entre 30 et 40 °C.

Examen bactériologique

- Frottis coloré

Cet examen comporte la recherche de bactéries spiralées. Après coloration de Gram, les bactéries incurvées ou spiralées sont recherchées. Elles apparaissent à Gram négatif et dans certaines zones du frottis ont tendance à se trouver nombreuses [104].

L'avantage de cette méthode ; consiste en sa simplicité et sa rapidité. La sensibilité de détection est environ 80%. Cette méthode peut être combinée à la culture ; mais elle implique l'obtention d'une biopsie supplémentaire [105, 106].

- **Culture**

La culture est une méthode de référence pour la mise en évidence de la bactérie. Elle permet l'étude de la sensibilité aux antibiotiques et le typage de la souche.

Cette méthode nécessite des conditions particulières de transport de la biopsie et un broyage. Elle est effectuée sur un milieu enrichi, sélectif et spécifique, c'est pour cette raison elle est coûteuse et fastidieuse, elle n'est justifiée que pour réaliser un antibiogramme en cas de résistance à un premier ou un second traitement [106, 107, 108].

Les formes coccoïdes des vieilles cultures seraient pour certains, des formes de dégénérescence. Pour d'autres des formes de résistance [109,110].

Examen anatomo-pathologique

L'examen anatomo-pathologique permet de mettre en évidence, avec coloration, la bactérie au niveau du mucus et de la surface épithéliale [111]. Les coupes sont colorées par diverses colorations : Hématoxyline Éosine Safran (HES), coloration de Giemsa modifiée au Crésyl violet mais la plus répandue étant la coloration argentique (méthode de Warthin et Sary [41]. Cette dernière peut donner d'excellents résultats, les bactéries apparaissent noires sur fond jaunâtre, mais elle est longue et délicate [106, 112].

Cette méthode diagnostic reste l'une des plus couramment utilisées. La sensibilité augmentant avec le nombre de biopsies, il est conseillé à partir de 2 biopsies de l'antre et 2 au niveau du fundus [113].

Après coloration des coupes de biopsies, *H. pylori* apparaît sous forme de bactéries incurvées à la surface de l'épithélium de la muqueuse (figure.4).

Le gros avantage de l'analyse anatomo-pathologique est qu'elle permet conjointement le dépistage de la gastrite et la recherche de complications, telles qu'atrophie, métaplasie, lymphome ou cancer.

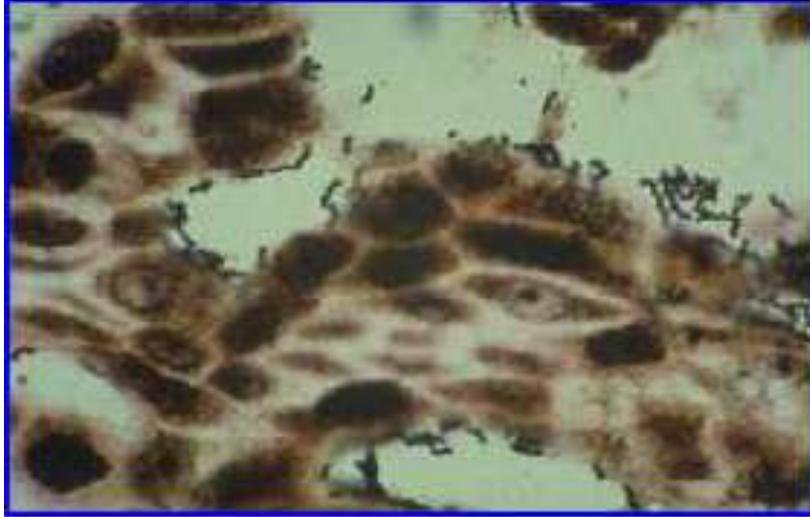


Figure 4 : Visualisation de *H. pylori* sur coupe histologique (d'après Marshall B.J et al, 1985) [10]

✚ Amplification génique ou PCR

La détection de séquences d'ADN spécifiques de *H. pylori* dans des prélèvements gastriques (biopsies ; suc ; mucus) ou autres (salive ; plaque dentaire ; selles) se fait facilement par l'amplification génique par la Polymerase Chain Reaction (PCR) [114]. Cette méthode est connue pour sa rapidité et sa possibilité de mettre en évidence toutes les formes de *H. pylori* y compris les formes coccoïdes non cultivables ou les bactéries mortes [115].

III.2. Les méthodes non invasives

III.2.1. Test respiratoire à l'urée marquée au carbone 13

Le test respiratoire à l'urée marquée repose sur l'activité uréasique de *H. pylori*. Il consiste à faire absorber au patient de l'urée marquée au ^{13}C (isotope stable non radio-actif). Le $^{13}\text{CO}_2$ qui résulte par hydrolyse de l'urée est détecté dans l'air expiré 30 min après l'ingestion. La détection du CO_2 se fait par spectrométrie infrarouge ou spectrométrie de masse. Le taux du $^{13}\text{CO}_2$ dégagé est comparé à celui obtenu juste avant l'ingestion [108, 116].

Le patient doit être à jeun, et absorber une solution d'acide citrique ou de jus d'orange avec l'urée marquée au ^{13}C principalement afin de retarder la vidange gastrique et allonger les temps de contact entre l'uréase bactérienne et l'urée ^{13}C [117].

L'innocuité de ce test permet de le répéter à volonté et donc de l'utiliser pour le dépistage et le suivi des sujets infectés après traitement.

Pratiqué 4 à 6 semaines après l'arrêt du traitement d'éradication, ce test a une sensibilité de 90% et constitue la technique non invasive de référence pour confirmer l'éradication [108, 116].

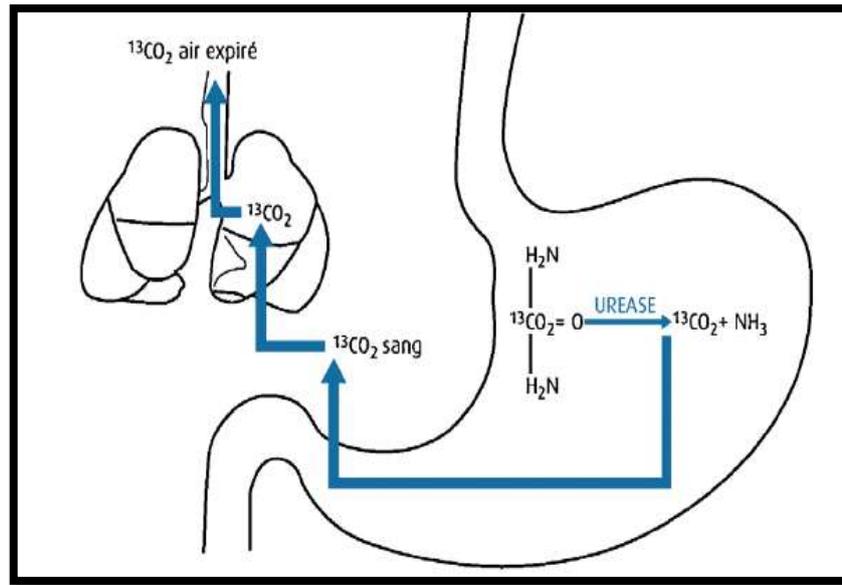


Figure 5 : Principe du test respiratoire à l'urée marquée au ^{13}C (d'après Mégraud F, 2010) [60]

III.2.2. Méthodes immunologiques

✚ Recherche des anticorps sériques

La réponse humorale à l'infection par *H. pylori* est caractérisée par la production d'anticorps spécifiques (principalement les immunoglobulines (IgG, IgA, IgM) qui peuvent être détectés dans le sang [114]. Cette méthode est la plus utilisée, elle a une sensibilité et une spécificité supérieures à 90%. Il s'agit d'un test ELISA son principe est fondé sur la mise en évidence des anticorps IgG anti-*H. pylori* qui peuvent être détectés dans le sang.

La technique d'immuno-blot, l'une des autres techniques utilisées, qui met en évidence des anticorps sériques spécifiques dirigés contre des antigènes de *H. pylori*, en particulier l'antigène Cag considéré comme un marqueur de virulence ; aussi l'agglutination par test au latex et la réaction de dot-blot sur papier filtre [116]. Le taux élevé d'anticorps durant l'infection baisse progressivement dans les 4 à 6 mois suivant l'éradication. De ce fait, cette technique ne peut être utilisée que pour détecter précocement l'éradication [107, 108, 118].

✚ Recherches des antigènes de *H. pylori* dans les selles

C'est un test non invasif, de type ELISA, utilisé pour le diagnostic et le contrôle de l'éradication. Sa fiabilité est équivalente à celle des tests respiratoires [119, 120].

Elle est basée sur l'élimination de *H. pylori* par les selles [121]. La recherche d'antigène spécifique de *H. pylori* s'effectue sur selles fraîches ou conservées à basse température ou même congelées à -70°C .

Différents kits sont proposés à cet effet ; ceux utilisant les anticorps monoclonaux offrent de meilleurs résultats [122]. Sa sensibilité est de 95% et sa spécificité de 94% [123].

En pratique, ce test peut servir au diagnostic primaire de l'infection mais s'avère surtout utile pour le contrôle de l'efficacité du traitement d'éradication. Il pourrait être utilisé comme alternative au test respiratoire pour le contrôle d'éradication [123].

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

IV.1. Evolution des traitements

H. pylori est sensible in vitro à de nombreux antibactériens ; néanmoins peu sont efficaces pour son éradication in vivo.

Les gastro-entérologues doivent faire un choix rationnel parmi les agents thérapeutiques disponibles en prenant en considération les caractéristiques optimales des antibiotiques disponibles et les facteurs prédictifs de l'évolution du traitement de l'infection à *H. pylori* [124]

IV.1.1. Monothérapies

Les monothérapies proposées comme premier model thérapeutique, testaient des molécules auxquelles *H. pylori* était sensible in vitro [125].

Les sels de bismuth ont été testés les premiers en raison de leurs propriétés antibactériennes et de leur rôle dans le traitement anti-ulcéreux [126].

Les monothérapies antibiotiques (amoxicilline, nitroimidazolé et macrolides) ont également utilisées [127].

Ces différentes monothérapies sont inefficaces in vivo, un taux d'éradication de *H. pylori* est obtenu de 20 à 40 % [127].

L'oméprazole et la ranitidine ont aussi été étudiés en monothérapies, sans succès [126]

IV.1.2. Bithérapie

Les résultats décevants des monothérapies ont conduit à l'essai de différentes bithérapies dont principalement

- Bismuth et un antibiotique.
- Un antisecretoire et un antibiotique [128].

Les bithérapies associant un antisécrétoire et un antibiotique donnaient des taux d'éradication maximum de 60% [127] paraissant donc inefficaces pour être utilisées en traitement de première ligne.

IV.1.3. Trithérapies

Les trithérapies associent un antisécrétoire à deux antibiotiques, permettent d'obtenir des taux d'éradication supérieurs ou égaux à 85%. A ce jour, les trithérapies constituent les associations les plus performantes [126]. En Algérie, elles sont actuellement utilisées comme traitement de première ligne.

IV.1.4. Quadrithérapie

En cas d'échec des trithérapies, une quadrithérapie peut-être proposée, notamment aux Etats-Unis. Elle est plus efficace avec des taux d'éradication allant de 95% à 100% mais nécessite un programme de dosage compliqué. Elle est moins bien tolérée que les trithérapies. Cette quadrithérapie consiste en l'association [129, 130] :

- d'un inhibiteur de la pompe à proton (IPP) ou d'un antihistaminique H2.
- et d'une trithérapie associant un sel de bismuth à deux antibiotiques.

IV.2. Facteurs de l'échec du traitement médical

Il existe plusieurs causes d'échec du traitement. Cependant la Résistance de *H. pylori* aux antibiotiques et la mauvaise observance du traitement sont les plus courants.

IV.2.1. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est le facteur déterminant de l'échec du traitement d'éradication de *H. pylori* [131]. Cette bactérie peut développer des résistances à tous les antibiotiques utilisés pour son traitement. Il s'agit toujours de résistances par mutations. Dans une étude allemande, les mutations en positions A2143G et A2142G étaient respectivement responsables de 52,8 et 36,1 % des résistances phénotypiques de la clarithromycine, La résistance au métronidazole concernerait jusqu'à 59 % des souches [132]. La prévalence de la résistance en 2009 évaluée sur un groupe des souches a montré que 13 % étaient résistantes à la fois à la clarithromycine et au métronidazole [132].

L'apparition d'une résistance primaire à la clarithromycine est la principale cause de l'inefficacité de la trithérapie à base de clarithromycine [133, 134]. L'impact clinique de la résistance au métronidazole est plus faible [135, 136]. Cette résistance peut être surpassée par l'usage de fortes doses de métronidazole et/ou l'addition d'IPP, de bismuth et de tétracycline

[131, 137, 138, 139]. Une importante étude a trouvé qu'un traitement préalable par métronidazole, quelle qu'en soit la raison, augmente le risque de résistance de *H. pylori* à cet antibiotique [140].

En conséquence, le clinicien doit systématiquement s'enquérir auprès du patient d'un traitement antérieur par macrolide ou métronidazole, quelle qu'en soit l'indication, avant de prescrire un traitement d'éradication. Dans les pays où le bismuth est disponible, la quadrithérapie comprenant un IPP doit être préférée en cas de traitement préalable par clarithromycine ou métronidazole.

La découverte récente des mécanismes de résistance aux principaux antibiotiques utilisés pour éradiquer *H. pylori* et la mise en évidence de leur support génétique permettent aujourd'hui de proposer des tests génétiques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques.

Différentes méthodes fondées sur l'étude de l'ADN bactérien ont été mises au point pour détecter les principales mutations conférant la résistance aux antibiotiques [62].

Ces tests s'appuient sur diverses méthodes d'amplification génique de type PCR (*polymerase chain reaction*) et/ou des méthodes d'hybridation comme PCR-RFLP [141].

IV.2.3. Mauvaise observance du traitement

Concernant l'observance, il est important pour les cliniciens d'insister auprès des patients sur la nécessité de prendre l'ensemble du traitement et les patients doivent également être informés des effets secondaires attendus. L'efficacité optimale des IPP nécessite une prise double journalière 30 à 60 mn avant le repas [142]. Les effets secondaires les plus fréquents de la clarithromycine sont la dyspepsie, la diarrhée et une sensation de goût métallique. Les effets secondaires les plus fréquents associés à l'amoxicilline sont la dyspepsie, les céphalées et la diarrhée.

Les effets secondaires du métronidazole sont dépendants de la dose et correspondent à un goût métallique dans la bouche, une dyspepsie. La tétracycline incluse dans la quadrithérapie à base de bismuth peut provoquer une dyspepsie et une photosensibilité. Le bismuth peut être responsable d'un aspect foncé de la langue et des selles, de nausées et d'une dyspepsie [142]. Les patients informés dès la prescription des effets secondaires sont moins inquiets et ont tendance à moins souvent arrêter leur traitement

Cette mauvaise observance semble être une importante cause d'échec de traitement qui reliée à la lourdeur des thérapies et aussi aux effets secondaire des antibiotiques.

Matériel et méthodes

1. Lieu de travail

Le présent travail a été réalisé au niveau du service de microbiologie du CHU Dr Benbadis de Constantine.

2. Etude microbiologique

2.1. Isolement et caractérisation de *Helicobacter pylori*

2.1.1. Prélèvements

Des patients (N°08) présentant une symptomatologie gastroduodénale évocatrice, subissent une endoscopie digestive haute afin de prélever des biopsies gastriques de l'antrum (2 fragments antrales), au niveau du service d'explorations endoscopiques, CHU de Constantine. L'âge, le sexe et l'aspect endoscopique des patients sont présentés dans **le tableau. II**

Le matériel d'endoscopie (fibroscope et pince) est nettoyé entre chaque examen dans une solution de Cidex. Après désinfection, le matériel était rincé à l'eau de robinet.

Tableau. I : renseignements cliniques des patients

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8
Sexe	homme	femme	Homme	homme	homme	homme	femme	femme
Age (ans)	28	70	51	40	60	22	48	18
Aspect endoscopique	Gastrite érosive diffuse	Tumeur antrale	Gastrite érosive antrale	Gastrite érosive diffuse	Ulcère gastrique	Gastrite érosive antrale	Muqueuse normale	Muqueuse normale

2.1.2. Transport et conservation des biopsies

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

Les biopsies récupérés ont été transportées et conservées :

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

2.1.3. Ensemencement et caractérisation de *Helicobacter pylori*

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

2.1.3.1. Broyage manuel des biopsies

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

Dans ce travail le broyage manuel avec la lame à bistouri a été utilisé.

A l'aide de la lame à bistouri, chaque biopsie a été broyée séparément sur une lame stérile placée dans une boîte de Pétri.

A l'issue du broyage, les fragments ont subi trois traitements à savoir le test à l'uréase, le frottis coloré et la mise en culture (primoculture).

a. Test à l'uréase

Il est réalisé en déposant une partie de la biopsie dans le milieu urée-indole. Ce milieu contient un indicateur coloré qui est le rouge de phénol. La présence de *Helicobacter pylori* dans l'échantillon test se manifeste après incubation à 37°C pendant 24 à 48h, par le virage de l'indicateur au rose violacé.

b. Frottis coloré

La 2^{ème} partie du broyat de chaque biopsie a été étalée en frottis sur une lame en verre en présence d'une goutte d'eau physiologique. Après séchage, les lames ont subi la coloration de Gram.

La lecture des frottis est réalisée à l'huile d'immersion au microscope optique pour détecter la présence de *Helicobacter pylori* à la surface de l'épithélium de la muqueuse gastrique.

c. Mise en culture

Le restant du broyat de chaque biopsie est ensemencé sur milieu gélose Columbia supplémenté du sang frais humain, d'un mélange d'antibiotiques (*Helicobacter pylori* sélective supplement, oxoïd) afin d'empêcher la prolifération d'éventuel contaminant et des vitamines (PVX-M, Biomérieux).

Les boîtes sont placées dans une jarre en présence de deux sachets générateurs d'atmosphère microaérophile (Genbox microaer , Biomérieux) et incubées à 37 ° C à l'étuve pendant 5 à 7 jours.

Les cultures sont contrôlées chaque deux jour à partir du 5^{ème} jour jusqu'au 12^{ème}.

Cette primoculture permet d'isoler *H. pylori* sur les boîtes de Pétri mais un réisolement en subculture est nécessaire pour obtenir des cultures riches.

2.1.3.2. Caractérisation des isolats

D'après Cassel-Béraud *et al.* (1996) l'identification de *H. pylori* est basée sur ses caractères morphologiques, son examen microscopique et sur ses caractères biochimiques essentiels : uréase très intense, catalase et oxydase [143].

a. Examen macroscopique

Après culture sur milieu gélose spécifique et sélectif et l'apparition des colonies suspectes, une observation macroscopique de la forme, la taille, l'aspect et la couleur des colonies a été réalisée.

b. Examen microscopique

Un frottis est préparé à partir des colonies suspectes, en fixant sur une lame en verre une goutte de la suspension bactérienne, ce frottis est coloré par la méthode de Gram.

La lecture des frottis est réalisée à l'huile d'immersion au microscope optique pour détecter la présence des formes typiques de *Helicobacter pylori*.

c. Identification des caractères biochimiques

✚ .Recherche de l'activité uréasique

A l'aide d'une pipette Pasteur, quelques colonies sont prélevées et introduites dans un tube contenant de l'urée-indole puis les tubes sont incubés pendant 24 heures. Un résultat positif se traduit par le virage de couleur de la solution vers le rose violacé.

✚ Recherche de la catalase

La présence de cette enzyme est détectée en déposant quelques colonies dans une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame en verre. L'apparition de bulles de gaz signifie que l'isolat dispose de la catalase.

Recherche de l'oxydase

A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever des colonies et les déposer dans une goutte du réactif de l'oxydase déposée sur un fragment de papier. La réaction positive est le virage rapide de couleur vers le bleu.

2.2. Réalisation de l'antibiogramme

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité et la résistance des isolats aux différents types d'antibiotiques.

Dans ce travail, la méthode de diffusion en milieu gélosé (utilisation des disques d'antibiotiques) a été utilisée. Cette méthode comprend les étapes suivantes :

La préparation du milieu Mueller-Hinton (gélose) supplémenté du sang frais humain et des vitamines.

La préparation de l'inoculum : ensemencer 1ml du sérum physiologique avec plusieurs colonies jusqu'à avoir une suspension très dense (3 unités Mac Ferland).

L'inoculum ainsi obtenu est ensemencé en nappe à l'aide d'un écouvillon sur milieu Mueller Hinton et les disques d'antibiotiques y sont déposés.

La sensibilité et la résistance des souches ont été évaluées par rapport à 4 disques d'antibiotiques à savoir l'amoxicilline, le métronidazole, la clarithromycine et la ciprofloxacine.

L'incubation s'effectue à 37°C pendant 72 heures en microaérophilie (Genbox microaer , Biomerieux).

-La lecture des résultats s'effectue par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition apparue.

3. Conservation des isolats

La conservation à court terme (une semaine environ) est possible sur boîte si cette dernière est maintenue à + 4°C en atmosphère microaérophile [144] Tandis qu'à long terme, on racle le tapis bactérien à l'aide d'un écouvillon que l'on met dans un tube de 1ml de la solution de conservation (bouillon nutritif, eau peptonée, BGT...) glycérolé à 25%, puis on congèle à - 80°C.

Résultats et Discussion

I. Résultats

1. Isolement et caractérisation de *Helicobacter pylori*

1.1. Test à l'uréase à partir de biopsies

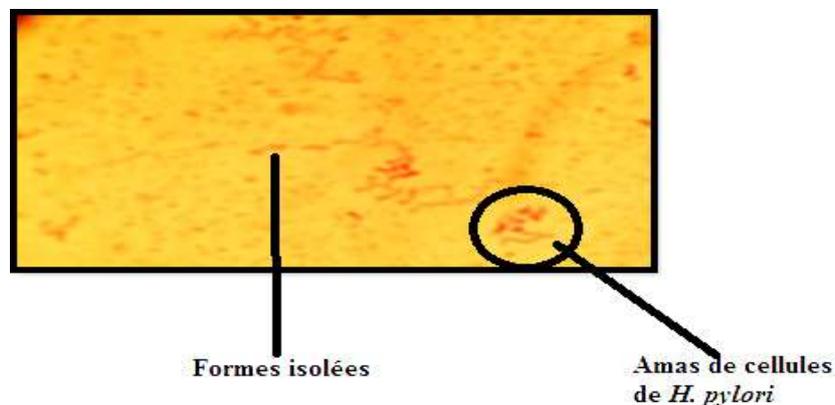
Le test à l'uréase est basé sur la production abondante de l'uréase par *H. pylori*. Après incubation 24h à 48h à 37°C du milieu urée-indole ensemencé par le broyat de biopsies gastriques antrales. Un virage de couleur de l'orangé vers le rose violacé a été observé avec quelques prélèvements (**photographie.1**).



Photographie.1 : résultat du test à l'uréase à partir de biopsies.

1.2. Frottis coloré à partir de biopsies

L'observation microscopique à l'immersion des frottis colorés, préparés à partir des biopsies a montré la présence des bactéries incurvés à Gram négatif dans quelques biopsies. Ces bactéries sont *Helicobacter pylori* (**photographie.2**).



Photographie. 2 : observation microscopique d'un frottis coloré par la méthode de Gram à partir des biopsies gastriques G x100 (après zoom de la photo).

1.3. Examen macroscopique

Après 5 jours d'incubation à 37°C en atmosphère microaérophile, de petites colonies rondes, ont un contour régulier, transparentes à grisâtres et luisantes apparaissent (**photographie.3**). Ces caractères culturels correspondent à *H. pylori*. Un réisolement sur la gélose Columbia au sang frais mais sans supplément est nécessaire afin d'obtenir une nappe bactérienne.

La gélose Columbia additionnée avec le supplément, le sang et les vitamines permet la croissance de *H.pylori*. Ce qui indique que ce milieu constitue un milieu de base pour la fabrication de la gélose au sang, qui est spécifique à la prolifération des souches *H. pylori*.

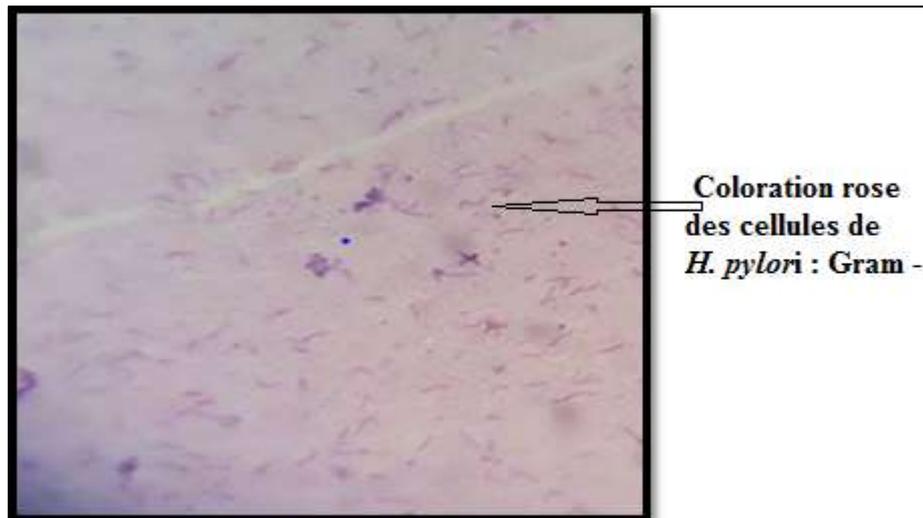


Photographie.3 : aspect macroscopique des colonies de *H. pylori* sur gélose au sang

1.4. Examen microscopique

La coloration de Gram, réalisée à partir des colonies apparues, montre la présence de bactéries Gram négatif. Elles se présentent sous la forme de bacille droit, incurvé, en virgule, en forme de C, V ou S (**photographie.4**). Ce sont les caractères morphologiques typiques à *H.pylori* sous microscope optique. L'examen microscopique nous a permis l'identification de la pureté des souches.

Les bactéries évoluent rapidement au cours des repiquages vers des formes d'aspect coccoïde.



Photographie.4 : aspect microscopique des isolats sous microscope optique G x100 (après zoom de la photo).

1.5. Caractéristiques biochimiques des isolats

L'identification de *Helicobacter pylori* par les tests biochimiques consiste en une recherche de l'uréase, de la catalase et de l'oxydase.

1.5.1. Recherche de l'activité uréasique

Après incubation des tubes contenant le milieu urée-indole ensemencé par les isolats à 37°C pendant 24h, un virage de couleur de l'orangé vers le rose violacé a été observé (**photographie.5**). Ce résultat indique la présence d'une activité uréasique très intense chez les souches isolées, ce qui confirme leur appartenance à l'espèce *Helicobacter pylori*.



Photographie.5 : résultat du milieu urée-indole à partir des isolats.

1.5.2. Recherche de la catalase

Le dépôt des colonies isolées dans le milieu d'eau oxygéné à 10 volumes a révélé l'apparition des bulles d'air à la surface (**photographie.6**). Ce résultat positif indique la présence d'une catalase, un caractère biochimique essentiel lié à *H. pylori*.



Photographie 6 : test de catalase des isolats

1.5.3. Recherche de l'oxydase

Les colonies des isolats déposées dans une goutte du réactif de l'oxydase révèlent l'apparition d'une coloration bleue (**photographie.7**). Ce qui indique la présence d'une oxydase caractérisant *H. pylori*.



Photographie.7 : test à l'oxydase des isolats

La positivité des trois tests biochimiques confirme l'appartenance des isolats à l'espèce *H. pylori*.

Dans ce présent travail, on a pu isoler que deux souches de *Helicobacter pylori* à partir de huit biopsies gastriques antrales provenant des patients présentant une symptomatologie gastroduodénale.

Les résultats de l'étude bactériologique des biopsies sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III : Résultats de l'étude bactériologique des biopsies

Biopsies	Coloration de Gram à partir de biopsies	Urée-indole à partir de biopsies	Culture	Urée-indole à partir des isolats	catalase	oxydase
BHp1	-	+	-	nd	nd	Nd
BHp2	+	-	-	nd	nd	Nd
BHp3	+	+	+	+	+	+
BHp4	-	-	-	nd	nd	nd
BHp5	+	-	-	nd	nd	nd
BHp6	+	-	-	nd	nd	nd
BHp7	-	-	-	nd	nd	nd
BHp8	+	+	+	+	+	+

Légende :

BHp : Biopsie *Helicobacter pylori*

+ : positif

- : négatif

nd : non déterminé

2. Résultats de l'antibiogramme

Un antibiogramme avec la méthode de diffusion en milieu gélosé (utilisation des disques d'antibiotiques) a été réalisé pour chacune des deux souches.

Les résultats de la mesure du diamètre des zones d'inhibition basée sur la standardisation CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) sont présentés dans le tableau ci-après. Ces résultats montrent une seule résistance de la souche BHp8 au MTR alors la souche BHp3 en est sensible. Les deux souches sont sensibles aux autres antibiotiques Cip, AMX et CLR (**photographie.8**).

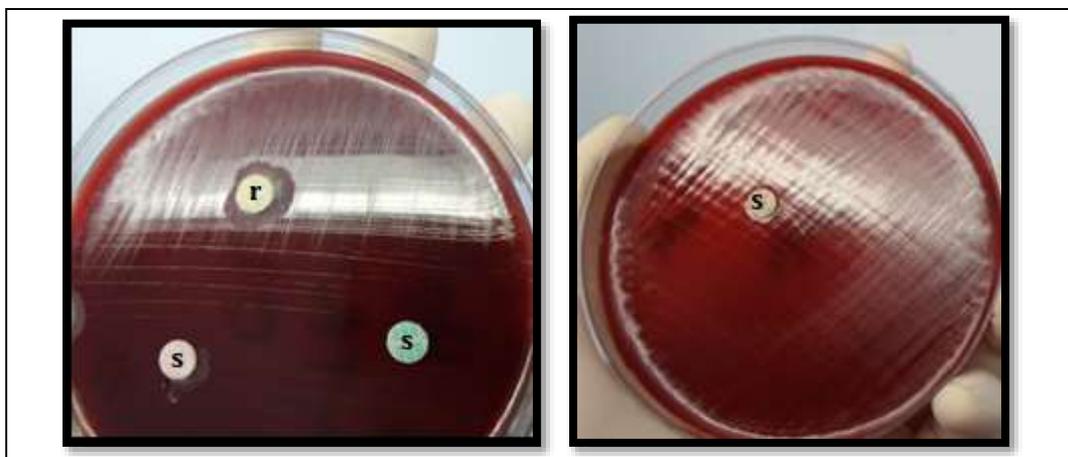
□ Diamètre critique provisoire :

Clarithromycine, amoxicilline,métronidazole,ciprofloxacine: $\varnothing > 22$ mm

Tableau IV : résultats de l'antibiogramme des deux souches isolées

Antibiotiques	Souche 1 (BHp3)		Souche 2 (BHp8)	
	Diamètre mm	Sensibilité	Diamètre mm	Sensibilité
Clarithromycine (CLR) 15 μ g	$\varnothing \geq 30$	S	$\varnothing \geq 20$	S
Amoxicilline (AMX) 25 μ g	$\varnothing \geq 30$	S	$\varnothing \geq 35$	S
Métronidazole (MTR) 4 μ g	$\varnothing \geq 20$	S	$\varnothing \geq 6$	R
Ciprofloxacine (Cip) 5 μ g	$\varnothing \geq 20$	S	$\varnothing \geq 27$	S

Légende : mm : millimètre ; R : résistante ; S : sensible



Photographie.8 : Résultats de l'antibiogramme sur gélose Mueller Hinton au sang frais

II. Discussion

H. pylori est l'agent pathogène qui infecte l'homme, on estime 50% de la population mondiale .Il s'agit d'une cause commune de dyspepsie et d'ulcère gastroduodéal potentiellement curable [60]

Dans ce présent travail, les méthodes bactériologiques nous ont permis d'établir que *Helicobacter pylori* était retrouvé liée aux pathologies gastroduodénales et des lésions inflammatoires qui ont pour siège la muqueuse gastrique. L'analyse récente des différentes publications [145] montre que l'infection à *H. pylori* peut être asymptomatique (90 % des cas) ou symptomatique pour 10 % des cas En effet dans notre travail *H. pylori* a été identifié dans un cas asymptomatique (BHp8) et un cas symptomatique (BHp 3).

Nous avons utilisé des méthodes invasives nécessitant une endoscopie digestive haute et des biopsies systématiques afin de réaliser des frottis colorés, uréase test et culture.

La recherche de *Helicobacter pylori* et de sa densité a été réalisée pour huit lames. Nous avons pu observer 5 lames, certaines nous ont montré de rares bacilles, alors que pour les autres la bactérie était sur tous les champs. Trois lames ont montré leur négativité totale du germe. La distribution irrégulière du germe au niveau de l'antra et la densité des bacilles sont les principales difficultés s'opposant à l'observation de ce germe d'après notre expérience.

La morphologie de *Helicobacter pylori* est caractéristique, ce sont de longs bacilles Gram négatif en courte spire ou incurvés et rend donc le diagnostic sur frottis spécifique et de sensibilité proche de celle de la culture [156]

Le test à l'uréase est une méthode de diagnostic simple, rapide et facile à interpréter puisqu'elle repose sur le virage du rouge de phénol. Ce virage est observé seulement dans 3 cas de nos biopsies. Ce résultat est expliqué soit par l'absence de la bactérie dans la biopsie soit les bactéries ne sont pas bien dispersées par le broyage ou bien du fait de l'extrême fragilité du germe.

Un travail de Otth *et al.* réalisé en 2011 dans le sud du Chili sur 240 patients ont une gastrite ou un ulcère gastrique, chaque biopsie gastrique a été homogénéisée etensemencée sur une gélose au sang contenant un mélange sélectif des antibiotiques. Des boites de Pétri ont été incubées à 37°C dans un environnement microaérophile pendant cinq jours. *H. pylori* a été isolée à partir de 99 patients sur 240 [147].

La négativité d'un des traitements dont ont subies nos biopsies ne peut indiquer l'absence ou la présence de *H. Pylori* sans certaines études complémentaires dont le diagnostic moléculaire (PCR).

En effet la négativité des résultats est expliquée par plusieurs raisons, notamment par le type de broyage, les problèmes de transport et de conservation et par la qualité des biopsies.

En fait les biopsies doivent être bien broyées pour une meilleure libération et dispersion des colonies [148]. Une bonne dispersion permet de retrouver facilement les bactéries sur le frottis coloré (coloration de Gram) et d'augmenter leur chance de coloniser le milieu de culture.

Dans cette étude nous avons utilisées le broyage manuel qui non seulement est délicat mais également donne peu de résultats satisfaisants.

H. pylori est un germe très fragile. En effet si la bactérie n'a pas été transportée et conservée dans des conditions requises, elle meurt. Ceci conduira à l'échec de la mise en culture.

Dans le deuxième volet de notre travail, nous avons analysé la résistance /sensibilité aux antibiotiques. En effet, le traitement d'éradication est basé essentiellement sur les antibiotiques. Pour une meilleure prescription efficace aux patients, il revient de suivre l'évolution des résistances de *H. pylori* aux antibiotiques. La détermination de la résistance est cependant recommandée après deux échecs de traitement de l'infection à *H. pylori*.

Classiquement un antibiogramme est réalisé afin de détecter les phénotypes des souches résistantes. La difficulté technique de cette méthode est réelle en raison de la croissance lente de *H. pylori* et de ses besoins cultureux spécifiques. Dans notre étude nous avons réalisé un antibiogramme pour chaque une des deux souches, en utilisant la méthode de diffusion sur gélose, milieu Mueller-Hinton enrichie du sang. Cette méthode est validée par la standardisation CLSI pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

Il apparait dans nos résultats que les souches montrent une sensibilité à quatre antibiotiques actuellement utilisés dans les traitements. Par ailleurs une seule souche BHp8 montre une résistance au métronidazole. Ces résultats peuvent permettre de réorienter le traitement pour les patients ayant fourni ces biopsies (BHp3 et BHp8).

Notre étude pouvait être continuée par la recherche des gènes impliqués dans la résistance de *H. pylori* au métronidazole.

Conclusion

Conclusion

L'infection à *H. pylori* affecte l'ensemble de l'humanité. Elle concerne la majorité des populations des pays en voie de développement, mais son incidence diminue régulièrement dans les pays développés, probablement en raison de meilleures conditions d'hygiène liées au niveau socioéconomique plus élevé, qui limite les possibilités de transmission interhumaine.

Notre étude repose sur la détection des souches *H. pylori* dans des biopsies gastriques prélevées à partir des patients présentant une symptomatologie gastroduodénale. L'isolement et la caractérisation des souches sont réalisés par l'utilisation des méthodes bactériologiques simples.

L'étude que nous avons menée a permis de mettre en évidence les caractéristiques morphologiques et biochimiques des isolats qui confirment leurs appartenances à l'espèce *Helicobacter pylori*. Ce travail est le premier du genre à être réalisé au CHU Benbadis de Constantine.

Les résultats obtenus ont montré que seulement deux biopsies ont révélé la présence de *H. pylori*, cette abondance de négativité ne signifie pas forcément l'absence de la bactérie, elle est expliquée par la fragilité du germe et sa nécessité à des conditions de transport, d'atmosphère et de culture très astreignantes.

La réalisation de l'antibiogramme par la méthode de diffusion a révélé une seule résistance, celle de la souche BHp8 au métronidazole (l'une des résistances les plus fréquentes dans le monde).

Les tests indirects et notamment le test respiratoire sont utiles pour tester l'éradication. Les résultats sont toujours à discuter en fonction des traitements antibiotiques ou anti sécrétoires que le patient aurait pu prendre récemment.

Aujourd'hui sur le plan clinique, il est question d'évaluer l'influence de la diversité génétique dans la pathogénicité des différentes souches de *H. pylori*. La diversité de *H. pylori* est probablement à l'origine de la variabilité de son pouvoir pathogène.

En Algérie il existe très peu de laboratoire qui pratiquent le diagnostic, du fait de la prévalence des pathologies gastriques, il serait judicieux de mettre en place les

Conclusion

méthodes de recherche bactériologique de cet agent hautement pathogène au niveau des différents laboratoires à travers le pays dans le but de traiter efficacement l'infection en éradiquant *H. pylori* afin de prévenir la survenue du cancer gastrique .

De plus sur le plan recherche, nous projetons de réaliser l'analyse des gènes de résistance.

Références bibliographiques

- [1] **Marshall B.J, Warren J.R., (1984)** - Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*; 1:1311-5.
- [2] **Marshall B., (1994)** - *Helicobacter* au pinacle. *Abstract*. 36: 15-17.
- [3] **Suerbaum S, Michetti P., (2002)** - *Helicobacter pylori* infections. *N Engl J Med*; 347: 1175-1186.
- [4] **Arnion H., (2011)** - Etude de petits ARNs chez une bactérie : *Helicobacter pylori*. Mémoire pour obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*; 445:915-918.
- [5] **The EUROGAST Study Group., (1993)** - Epidemiology of, and risk factors for, *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. *Gut*, 34: 1672-6.
- [6] **Fontaine V, Douat N., (2011)** - Contribution au management de l'infection à *Helicobacter pylori* en biologie : Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques. Université libre de Bruxelles.
- [7] **Rochard E., (2000)** - Contribution à l'infection de l'estomac par les bactéries *Helicobacter* chez les carnivores domestiques : Thèse pour le diplôme de docteur vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire de Nantes. France 140 p.
- [8] **Kidd M, Modlin I.M., (1998)** - A Century of *Helicobacter pylori*. *Digestion*. 59 : 1-15.
- [9] **Marshall B.J, Goodwin C.S, Warren J. R, Blincow E, Phillips M, Murray R, Blackbourn S-J, Waters T-E, Sanderson C-R., (1988)** - Prospective double-blind trial of ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet*. 2: 1437-1442.
- [10] **Marshall B.J, Armstrong J.A, Mcgechie D.B, Glancy R.J., (1985)** - Attempt to fulfil Koch's postulates for *pyloric Campylobacter*. *Med J Aust*, 142: 436-9.
- [11] **Liddell H.G, Scott R (1966)** - A Lexicon: Abridged from Liddell and Scott's Greek-English Lexicon. Oxford [Oxfordshire]: Oxford University Press.
- [12] **World Health Organization (1994)**. - IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Lyon*: World Health Organization 177-240.
- [13] **Gottrand F., (2000)** - Place d'*Helicobacter pylori* dans les douleurs abdominales de l'enfant. *Arch Pediatr* ; 7 : 197-200.

- [14] **Domonique T., (2008)** - Une nouvelle bactérie qui donne des maux d'estomac. *In vivo* 28(2) : 14-16.
- [15] **Megraud F., (1993)** - *H. pylori*, chef de file des bactéries du mucus. *Lettre de L'infectioLogue*, Vol. 8, 5: 151-159.
- [16] **Olsen G.Y, Woese C.R, Overbeek R., (1994)** - The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J Bacteriol*, 176: 1-6.
- [17] **Garrity,G, Bell M, Lilburn JA. (2005).** - Helicobacteraceae fam. nov. In : *Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology*. New York, NU : Pub. Springer,
- [18] **Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T., (1989)** - Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter. mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. and *Helicobacter pylori* comb, nov., as *Helicobacter mustelae* comb, nov., respectively. *Int J System Bacteriol*; 39: 397-405.
- [19] **Glupczynski Y., (1997)** - Sensibilité des *Helicobacter pylori* aux agents antimicrobiens. pp. 317 - 340. In : *Helicobacter pylori* : volume 2, Clinique, Traitement. F. Mégraud et H. Lamouliatte ed. Collection Option Bio, Paris.
- [20] **Mégraud F., (1997)** - Diagnostic bactériologique standard de l'infection à *Helicobacter pylori*. pp. 249 - 266. In : *Helicobacter pylori* : volume 1, Epidémiologie, Pathogénie, Diagnostic. F. Mégraud et H. Lamouliatte. ed. Collection Option Bio, Paris.
- [21] **Mégraud F, Bonnet F, Garnier M, Lamouliatte H., (1985)** - Characterization of *Campylobacter pyloridis* by culture, enzymatic profile, and protein content. *J Clin Microbiol*, 22:1007-1010.
- [22] **Solís Á.S., (2012)** - Factores de virulencia, Aspectos Inmunológicos y Patronos de Sensibilidad en Aislamientos Clínicos de *Helicobacter pylori*: Memoria para optar al grado de Doctor . Universidad Complutense de Madrid, 217p.
- [23] **Eleko E.B., (2003)** - Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* en milieu rural : mémoire présenté à la faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en épidémiologie pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.sc.) Québécois. Université LAVAL QUEBEC, 116 p.
- [24] **Maroye P., (1991)** - Diagnostic biologique de l'infection à *Helicobacter pylori*. *Revue Française des Laboratoires.* ; 316 :47-54.

- [25] **Mégraud F., (1998)** - Epidémiologie and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gastroenteology* .115 ,1278-1282.
- [26] **Kusters J. G., Gerrits M.M., Van Strijp J.A. , Vandenbroucke-Grauls C. M., (1997)** -Cocoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun*, 65, 3672-9.
- [27] **Brenner D.J. ; Krieg N.R. ; Staley J.T., (2005)** - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology : Second Edition Volume Two The *Proteobacteria* Part C The *Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University East Lansing, MI 48824-4320, USA.
- [28] **Marshall B. J., Barrett L. J., Prakash C., Mccallum R. W., Guerrant, R. L., (1990)** - Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology*, 99, 697-702.
- [29] **Baldwin D.N., Shepherd B., Kraemer P., Hall M.K., Pinto-Santini D.M., Salama N. R., (2006)** - Identification of *Helicobacter pylori* Genes that contribute to Stomach Colonization. *American society for microbiology : infection and immunity*, 75 : 1005-1016.
- [30] **Bigard , M.A., (2004).** - Large trials that have changed (or not) my practice in the treatment of duodenal and ulceregastro-eradication *Helicobacter pylori* *Med. Therapy*, 10 : 191-197.
- [31] **Sobhani L, Valwt T., Mignon M. (1995)** - *H. pylori*. une bactérie redécouverte. Son implication dans les maladies gastro-duodénales. *Presse Méd.*, Vol. 24. 2 : 67-79.
- [32] **Hazell Sl, Evans Dj, Jr, Graham Dy., (1991)** - *Helicobacter pylori* catalase. *J Gen Microbiol*; 137 (Pt 1):57-61.
- [33] **Maier Rj, C Fu, J Gilbert, F Moshiri, J Olson, Ag Plaut., (1996)** - Hydrogen uptake hydrogenase in *Helicobacter pylori*.» *FEMS Microbiol Lett*, 141:71-76.
- [34] **Pesci Ec, Pickett Cl., (1994)** - Genetic organization and enzymatic activity of a superoxide dismutase from the microaerophilic human pathogen. *Helicobacter pylori. Gene*, 143:111-116.
- [35] **Mataysiak B. T., (1998)** - Les facteurs pathogènes de H.pylori.Hapato-gastrentérologie. 5 :17-23.
- [36] **Skoulobris S., De Reuse H., & Labigne A., (2000)** - Bactériologie et pathologie d'*H. pylori* .*Revue pratique* . 50 : 1409-1413.

- [37] **Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., et al. (1997)** - The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, , 388: 539-547.
- [38] **Thiberge J. M., Boursaux-Eude C., Lehours P., et al., (2010)** - From array-based hybridization of *Helicobacter pylori* isolates to the complete genome sequence of an isolate associated with MALT lymphoma. *BMC Genomics*, 11: 368.
- [39] **McClain, M. S., Shaffer, C. L., Israel, D. A., et al., (2009)** - Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. *BMC Genomics*,, 10: 3.
- [40] **Varon C., Megraud F., (2013)** - Infection à *Helicobacter pylori* et cancer gastrique. Revue Francophone des Laboratoires, N°456.
- [41] **Belalami W., (1998)** - *Helicobacter pylori* et ulcère gastro-duodénal : Thèse pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'état). Université Cheikh Anta Diop – Dakar. 140p.
- [42] **Tjia T.N., Harper W.E.S., Goodwin C.S., Grubb W.B., (1987)** - Plasmids in *Campylobacter pyloridis*. *Microbios Lett.* 36: 7–12.
- [43] **Penfold, S.S., A.J. Lastovica and B.G. Elisha. (1988)** - Demonstration of plasmids in *Campylobacter pylori*. *J. Infect. Dis.* 157: 850–851.
- [44] **Graham, D.Y., Klein P.D., Opekun A.R., Boutton T.W., (1988)** - Effect of age on the frequency of active *Campylobacter pylori* infection diagnosed by the ¹³C urea breath test in normal subjects and patients with peptic ulcer disease. *J. Infect. Dis.* 157: 777–780.
- [45] **Breurec S., (2011)** - *Helicobacter pylori* : migrations humaines et cancer gastrique, Thèse de Doctorat en microbiologie. Université Paris-Sud 11, 223p.
- [46] **Lehours, P., (2003)** - *Helicobacter pylori* et les autres. *Gastroenterol Clin biol* ; 27 : 367-373.
- [47] **Labigne A. (1994)** - Existe-t-il différentes souches pathogènes de *H. pylori*. *Gastrographies*,; Janv: 6-7.
- [48] **Megraud F., (1994)** - Quelles sont les particularités de *H. pylori* ? *Gastrographies*. Janv: 6.
- [49] **Salama, N., Guillemin, K., Mcdaniel, T. K., et al. (2000)** - A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 14668-14673

- [50] Romo-Gonzalez C., Salama N. R., Burgeno-Ferreira J., *et al.* (2009) - Differences in genome content among *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, duodenal ulcer, or gastric cancer reveal novel disease-associated genes. *Infect Immun*, 77: 2201-2211.
- [51] Han Y. H., Liu W. Z., Shi Y. Z., *et al.* (2007) - Comparative genomics profiling of clinical isolates of *Helicobacter pylori* in Chinese populations using DNA microarray. *J Microbiol*, 45: 21-28.
- [52] Gressmann H., Linz B., Ghai R., *et al.* (2005) - Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. *PLoS Genet*, 1: 43.
- [53] Linz B., Balloux F., Moodley Y., *et al.* (2007) - An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*, 445: 915-918.
- [54] Falush D., Stephens M., Pritchard J. K., (2003) - Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587.
- [55] Azevedo N. F., Huntington J., Goodman K. J. (2009) - The epidemiology of *Helicobacter pylori* and public health implications. *Helicobacter*, , 14 Suppl 1: 1- 7.
- [56] Chow T. K., Lambert J. R., Wahlqvist M. L., *et al.* (1995) - *Helicobacter pylori* in Melbourne Chinese immigrants : evidence for oral-oral transmission via chopsticks. *J Gastroenterol Hepatol.*, 10: 562-569.
- [57] Remot P *et al.* (1994) – Infection gastrique à *H. Pylori* : argument en faveur d’une transmission interhumaine du micro-organisme. *Anal. Méd. Nancy-Est*, 33 : 127.
- [58] Vincent P., (1994) – Quels sont les modes de contamination possibles de l’infection à *H. Pylori* ? *Gastrographies* : 16.
- [59] Vincent P., (1993) – Epidémiologie de l’infection à *H. Pylori* : quand et comment risque-t-on de s’infecter ? *Lettre de l’infectiologue* ; vol. 8, 5 : 184-189.
- [60] Mégraud F., (2010) - Infection à *Helicobacter pylori* : bonnes pratiques. *Presse Med.* ; 39: 815–822.
- [61] Émile C., (2008) - Diagnostiquer et traiter l’infection à *Helicobacter pylori*. *Option Bio* n° 394.

[62] **Korwin J.-D., (2004)** - Infection à *Helicobacter pylori* et résistance aux antibiotiques. La revue de médecine interne ; 25 : 54–64 .

[63] **Bouyssou C., (2014)** - *Helicobacter pylori* : l'essentiel pour comprendre. Actualités pharmaceutiques n° 536.

[64] **Mustapha P., (2011)** - Etude des interactions entre *Helicobacter pylori* et les cellules épithéliales gastriques : These pour l'obtention du Grade de Docteur de l'Université de Poitiers. Ecole Doctorale : BioSanté. 182p.

[65] **Hearnshaw SA, Logan RF, Lowe D, Travis SP, Murphy MR, Palmer KR, (2011)** - Acute upper gastrointestinal bleeding in the UK: patient characteristics, diagnoses and outcomes in the 2007 UK audit , Gut,;60:1327-1335.

[66] **Malfertheiner P, Chan FK, McColl KE, (2009)** - Peptic ulcer disease. Lancet; 374:1449-1461.

[67] **Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. (1975)** - A model for gastric cancer epidemiology. Lancet; 2:58-60.

[68] **Labigne A., (2003)** - Gastroentérologie Clinique et Biologique : Quels sont les facteurs de virulence de *Helicobacter pylori* Vol 27, N° 3-C2. pp. 401-408.

[69] **Wroblewski L. E., Peek Jr R. M., et al. (2010).** - Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk. Clin Microbiol Rev 23(4) : 713-739.

[70] **Fitzgerald O., Murphy P. (1995)** - Studies on physiological chemistry and clinical significance of uréase and urea with special reference to the stomach. Med. Sci. 292: 97-159.

[71] **Matysiak T. et Mégraud F. (1996)** - Facteurs pathogènes bactériens dans l'infection à *Helicobacter pylori*.Hepatogastro. 2: 21-27.

[72] **Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling HO, Josenhans C, Suerbaum S. (2004)** - The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus.» Proc Natl Acad Sci U S A, 101(14) : 5024-5029.

[73] **Stingl K, Altendorf K, Bakker E., (2002)** - Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis Trends Microbiol,; 10:70–74.

[74] **Suerbaum, S. and C. Josenhans., (1999)** - Virulence factors of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development." Mol Med Today 5(1): 32-39.

[75] **McGee DJ, May CA, Garner RM, Himpfl JM, Mobley HL., (1999)** - Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. *J Bacteriol* ; 181:2477-84.

[76] **Kuwahara H., Miyamoto Y, et al. (2000).** - *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxynitrite via carbon dioxide production. *Infect Immun* 68(8): 4378-4383.

[77] **Tsuda M, Karita M, Morshed MG, Okita K, Nakazawa T. (1994)** - A Urease-Negative Mutant of *Helicobacter pylori* constructed by Allelic Exchange Mutagenesis Lacks the Ability To Colonize the Nude Mouse Stomach. *Infect Immun*, 62 (8) : 3586–3589.

[78] **Hessey SJ, Spencer J, Wyatt JI, Sobala G, Rathbone BJ, Axon AT, Dixon FM. (1990)** - Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut*, : 31(2) : 134–138.

[79] **Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, et al., (2002)** - *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, 297(5581):573-578.

[80] **Odenbreit S, Till M, Hofreuter D, Faller G, Haas R., (1999)** - Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol*;31: 1537-48.

[81] **Gobert A. P., McGee D.J et al., (2001).** - *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci, U S A* 98(24): 13844-13849.

[82] **Odenbreit S, Wieland B, Haas R. (1996)** - Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *J Bacteriol*;178: 6960-7.

[83] **Lundström AM, Bolin I. (2000)** - A 26-kDa protein of *Helicobacter pylori* shows alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) activity and the mono-cistronic transcription of the gene is affected by pH. *Microb Pathog*;29: 257-66.

[84] **Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, G., et al., (1999)** - *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284: 1328-1333.

[85] **Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., et al. (1996)** - *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci, U S A*, 93: 14648-14653.

- [86] Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli M, Tecce MF, Censini S, Covacci A, Xiang Z, Papini E, Montecucco C, Parente L, Rappuoli R., (1994) - Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J. Exp. Med*, 179:1653–1658.
- [87] Kusters J. G., van Vliet A. H., *et al.*, (2006) - Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 19 (3): 449-490.
- [88] Muotiala A., Helander I. M., *et al.*, (1992).- Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 60(4): 1714-1716.
- [89] Bliss C. M., Jr., Golenbock D.T, *et al.* (1998). - *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes." *Infect Immun* 66(11) : 5357-5363.
- [90] Pabst, M. J., Cummings N. P., *et al.* (1980). - Lipophilic derivative of muramyl dipeptide is more active than muramyl dipeptide in priming macrophages to release superoxide anion." *Infect Immun* 29(2) : 617-622.
- [91] Gold, M. R., C. L. Miller, *et al.* (1985). - Soluble non-cross-linked peptidoglycan polymers stimulate monocyte-macrophage inflammatory functions." *Infect Immun* 49(3) : 731-741.
- [92] Dokter W. H., Dijkstra A. J., *et al.* (1994). - a natural bacterial cell wall breakdown product, induces interleukin-1 beta and interleukin-6 expression in human monocytes. A study of the molecular mechanisms involved in inflammatory cytokine expression. *J Biol Chem* 269(6): 4201-4206.
- [93] Girardin, S. E., I. G. Boneca, *et al.* (2003). - Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278(11) : 8869-8872.
- [94] Dunn P. E., Dai W., *et al.* (1985) - Soluble peptidoglycan fragments stimulate antibacterial protein synthesis by fat body from larvae of *Manduca sexta*." *Dev Comp Immunol* 9(3): 559-568.
- [95] Yamaoka, Y., Kwon D. H., *et al.* (2000) - A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13): 7533-7538.

- [96] Yamaoka, Y., Ojo O., *et al.* (2006). "Helicobacter pylori outer membrane proteins and gastroduodenal disease." *Gut* 55(6): 775-781.
- [97] Franco, A. T., Johnston E., *et al.*, (2008) - Regulation of gastric carcinogenesis by Helicobacter pylori virulence factors. *Cancer Res* 68(2): 379-387.
- [98] Yamaoka, Y., Kudo T., *et al.* (2004). - Role of interferon-stimulated responsive element-like element in interleukin-8 promoter in Helicobacter pylori infection." *Gastroenterology* 126(4): 1030-1043.
- [99] Sugimoto, M., T. Ohno, *et al.* (2009). - Gastric mucosal interleukin-17 and -18 mRNA expression in Helicobacter pylori-induced Mongolian gerbils." *Cancer Sci* 100(11): 2152-2159.
- [100] Wu, J. Y., Lu H., *Et Al.*, (2006) - Balance between polyoma enhancing activator 3 and activator protein 1 regulates Helicobacter pylori-stimulated matrix metalloproteinase l'expression. *Cancer Res* 66(10): 5111-5120.
- [101] Lu, H., Hsu P. I., *Et Al.* (2005) - Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 128(4): 833-848.
- [102] Schmidt Hm, Andres S, Kaakoush No, Engstrand L, Eriksson L, Goh Kl, Fock Fm, Hilmi I, Dhamodaran S, Forman D, Mitchell H., (2009) - The prevalence of the duodenal ulcer promoting gene (dupA) in *Helicobacter pylori* isolates varies by ethnic group and is not universally associated with disease development: a case-control study. *Gut Pathog.*: 1(1):5. doi: 10.1186/1757-4749-1-5.
- [103] Megraud F, Lehours P., (2007) - *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* ; 20:280-322.
- [104] Guerre J., (1994) - *H. pylori* et pathologie gastro-duodénale. *Sem Hôp.* (Paris), Vol. 70,1 2 : 49-53.
- [105] Glupczynski Y., (1994) - Epidémiologie de l'infection à *H. pylori* et méthodes diagnostiques. *Anal Méd. Nancy-Est*, ; 33 : 89-93.
- [106] Megraud F., (1994) - Méthodes diagnostiques directes et indirectes de *H. pylori*. *GastroenteroL Clin. Biol.*, 18 : 217-222.
- [107] Delchier Jc. (2000) - Diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori*. *La revue du praticien*; 50 : 1417-1420 .

- [108] Sobhani I, Pospai I, Mignon M, Fléjou J-F., (2000) - *Helicobacter pylori*: épidémiologie, mécanisme d'altération de la muqueuse gastrique et diagnostic bactériologique. *Traité de gastroentérologie* ; 25 :329-343.
- [109] Conroy M.C., Antoine C., Loziewski A., Korwin J.D., Weberm., (1994) - Apport de la culture dans le cadre du diagnostic d'infection gastroduodénale à *H. pylori*. *Anal Med. Nancy-Est.*; 33 : 95-96.
- [110] Megraud F., (1994) - Pourquoi a-t-il fallu attendre 1982 pour cultiver *H. pylori* pour la première fois ? *Gastrographies*, Janv. : 7-8.
- [111] Stanghellini V., & Barbara G., (2001) - review article; *Helicobacter pylori* .Mucosal inflammation and symptom perception new insights into and old hypothetic. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 15(1): 21-32.
- [112]. Gamra L., Mansouri F., Mahassini N., Chokairi O., Bellakbir A., El Hachimi A. (1993) *H. pylori* et gastrites : étude histologique de 134 biopsies avec revue de la littérature. *Maroc Méd.*; Vol. 15, 1 et 2 : 41-48.
- [113] Bayerdorffer E., Oertel H., Lehn N., Kasper G., Mannes G. A., Sauerbruch T., Stolte, M. (1989) - Topographic association between active gastritis and *Campylobacter pylori* colonisation. *J Clin Pathol*, 42, 834-9.
- [114] Korwin Jd ., Lozniewski A ., (2000) - *Helicobacter pylori* ; notions fondamentales et perspectives. *Encyclopédie Médicale ; Gastroentérologie*. 8p
- [115] Razafimehefa S.H, Rabenjanahary T.H,Rakotoarivelo R.A,Rakotozafindrabe R .A.L., Zerbib F ., Ramanampamonjy R.M., Rajana R.H., (2012) - infection à *helicobacter pylori* ; reveu de la littérature et réalités Madagascar . *Reveu médicale de Madagascar* . 2(2) :1256131 [117] Korwin JD., (2003) - Avantages et inconvénients des différentes méthodes diagnostiques de l'infection à *H. pylori*. *Gastroenterol Clin Biol* ; 27,380-390.
- [116] Dominique J., De Korwin. (2003) - Avantages et inconvénients des différentes méthodes diagnostiques de l'infection à *H. pylori*. *Gastroentérologie Clinique et biologie*. 27 : 380-390.
- [117]Biomnis., (2008) - Test respiratoire à l'urée ; *Helocobter pylori*.
- [118] Lamarque D., (1995) - Aspects immunologiques de l'infection à *Helicobacter pylori*. *Hepato-gastro*; 2: 35-38.

- [119] **Gosciniak G, Klakockar J Et Al., (1993)** - *Helicobacter pylori* antibodies in sera of children suffering from chronic abdominal pain. *Zentralbl Bakteriol* 280(1-2): 214-20.
- [120] **Labigne A., (1994)** - *Helicobacter pylori* and molecular biology. Applications to pathogenesis, prevention, diagnosis and epidemiology. *Gastroenterol Clin Biol*, 18: 206-211.
- [121] **Makristathis A., Pasching E., Schutze K., Wimmer M., Rotter M. L., Hirschl A.M., (1998)** - Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*, 36, 2772-4.
- [122] **Blanco S., Forne M., Lacoma A., Prat C., Cuesta M. A., Latorre I., Viver, J. M., Fernandez, G., Molinos, S. & Dominguez, J., (2008)** - Comparison of stool antigen immunoassay methods for detecting *Helicobacter pylori* infection before and after eradication treatment. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 61,150-5.
- [123] **Malfertheiner P., Megraud F., O'morain C., Bazzoli F., El-Omar E., Graham D., Hunt R., Rokkas T., Vakil N., Kuipers E.J., (2007)** - Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*, 56, 772-81.
- [124] **Miendje Deyi V.Y., Burette A, Bentatou Z, Maaroufi Y, Bontems P, Reynders M. (2011)**- Practical use of HelicoDRTM in the management of *H. pylori* diagnosis and antimicrobial susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*.20 11. In Press .
- [125] **Cayla R., (1998)** - Eradication de *Helicobacter pylori*. *Hépatogastro-enterolgy*. 5 : 42-50.
- [126] **Kaiser J.M (2001)** – Evaluation thérapeutique : les traitements d’eradication de *Helicobacter pylori*. Dossier du C N H I M Revue d’évaluation sur le traitement.
- [127] **Bouché O., (1996)** - Faut-il éradiquer *Helicobacter pylori* chez un malade ayant une gastrite chronique ? *Gastroentérol. Clin. Biot.* 20. 143-q 53.
- [128] **Kamiri A., (2007)** – Strategies thérapeutiques dans la récurrence de la maladie ulcéreuse à *Helicobacter pylori* : thèse pour obtenir le grade de docteur en pharmacie (diplôme d’état). Université Cheick Anta Diop de Dakar.
- [129] **Chassany O; Duracinsky M., (2002)** - Quel schéma thérapeutique pour l’éradication d'*H. pylori* et la cicatrisation de l'UGD. *Le traitement minute a-t-il sa place?* *Presse Médicale* 2002 aug24 ; 31(27) :1277-8 1.

- [130] **Lamouliatte H ; Cayla R ; Mégraud F., (2000)** – traitement de l'infection à *H. pylori*. *La revue du praticien*, 50 : 1442-5.
- [131] **Megraud F, Lehn N, Lind T, et al., (1999)** - Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial : the MACH 2 study. *Antimicrob Agents Chemother*, 43:2747-2752.
- [132] **Raymond J, Lamarque D, Kalach N, et al. (2010)** - High level of antimicrobial resistance in French *Helicobacter pylori* isolates. *Helicobacter*, 15:21-27.
- [133] **Tankovic J, Lamarque D, Lascols C, et al. (2001)** - Impact of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin on the efficacy of the omeprazole-amoxicillin clarithromycin therapy. *Aliment Pharmacol Ther*, 15:707-713.
- [134] **Miendje Deyi VY, Bontems P, Vanderpas J, et al., (2011)** - Routine-based multicentre survey of antimicrobials resistance in *Helicobacter pylori* over the last twenty years (1990 - 2009) in Belgium. *J Clin Microbiol*.
- [135] **Megraud F, Lamouliatte H. (2003)** - Review article: the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*, 17:1333-1343.
- [136] **Fischbach L, Evans EL. (2007)** - Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*, 26:343-357.
- [137] **Bardhan K, Bayerdorffer E, Veldhuyzen Van Zanten SJ, et al., (2000)** - The HOMER Study: the effect of increasing the dose of metronidazole when given with omeprazole and amoxicillin to cure *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 5:196-201.
- [138] **Lind T, Megraud F, Unge P, et al., (1999)** - The MACH2 study: role of omeprazole in eradication of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. *Gastroenterology*, 116:248-253.
- [139] **Lind T, Veldhuyzen van Zanten S, Unge P, et al. (1996)** - Eradication of *Helicobacter pylori* using one-week triple therapies combining omeprazole with two antimicrobials: the MACH I Study. *Helicobacter*, 1:138-144.
- [140] **Mcmahon BJ, Hennessy TW, Bensler JM, Et Al. (2003)** - The relationship among previous antimicrobial use, antimicrobial resistance, and treatment outcomes for *Helicobacter pylori* infections. *Ann Intern Med*, 139:463-469.

- [141] **Grignon B, Tankovic J, Megraud F, Glupczynski Y, Husson MO, Conroy MC, Et Al. (2002)** - Validation of diffusion methods for macrolide susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *Microb Drug Resist*; 8:61–6.
- [142] **Villoria A, Garcia P, Calvet X, Et Al. (2008)** - Meta-analysis: high-dose proton pump inhibitors vs. standard dose in triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther*, 28:868-877.
- [143] **Cassel-Beraud A.M., Peghini M., Mouden J.C., Rajaonarison P., (1996)** - prevalence de l'infection à *Helicobacter pylori* à Tananarive, Madagascar *Bactériologie*. 1441 : 4.
- [144] **Mégraud, F., (1992)** - Mise en évidence de *Helicobacter pylori* au niveau biopsies gastriques par les méthodes bactériologique. *Revue Française des laboratoires Tiret à part* : 1,2.
- [145] **Malfertheiner P, Megraud F, O'morain Ca, Aterton J, Axon At, Bazzoli F, Gensini Gf, Gisbert Jp, Graham Dy, Rokkas T, El-Omar Em, Kuipers Ej ; (2012)** - Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht IV / Florence consensus Report. *Gut*. 61(5) : 646.
- [146] **Sahi M., (1998)** - *Helicobacter Pylori* son incrimination dans la Genèse de la pathologie ulcéreuse Gastrodudenal et le Cancer Gastrique : Thèse pour l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire Option : Microbiologie. Université Aboubekr Belkaid-Tlemcen.
- [147] **Otth L., Wilson M., Fernández H., Otth C., Toledo C, Cárcamo V., Rivera P., & Ruiz L., (2011)** - Isolation of *helicobacter pylri* in gastric mucosa and susceptibility to five antimicrobial drugs in southern chile. *Brazilian journal of microbiologiy*. 42(2) : 422-447.
- [148] **Miftahussurur M ; Yamaoka Y., (2015)** - Appropriate First-Line Regimens to Combat *Helicobacter pylori* Antibiotic Resistance: An Asian Perspective. *Molecules*, 20 : 6068-6092.

Annexes

Annexe 1 : Mécanismes de résistance aux principaux antibiotiques utilisés dans le traitement d'infection à *H. pylori* (modifié d'après Korwin J.-D., 2004) [62].

Antibiotiques	Mécanisme de résistance	Gènes	Mutations principales
Clarithromycine	Altération de l'ARNr 23S	ARNr23S	ADNr 23S : <ul style="list-style-type: none"> - A2143G - A2142C - A2142G* - T2183C*
Métronidazole	Inactivation des nitroréductases NADPH insensibles à l'oxygène	rdxA frxA	Gène rdxA Gène frxA Gène fdxB
Amoxicilline	Diminution d'affinité pour les protéines de liaison à la pénicilline (PLP)	plp	Gène plp 1
Tétracycline	Altération de l'ARN ribosomal 16S	16S rRNA	ADNr 16S : <ul style="list-style-type: none"> • AGA965-967TTC. • Délétion G942
Fluoroquinolones	mutations (QRDR) du gène gyrA	gène gyrA	Gène gyrA <ul style="list-style-type: none"> • Position 87 • Position 91

*Nouvelles mutations découvertes [148].

Annexe 2 : Avantages et inconvénients des différents tests à la recherche d'*Helicobacter pylori* (d'après Emile C, 2008) [61].

I. Avantages et inconvénients des tests invasifs à la recherche d'<i>Helicobacter pylori</i>				
Type	Sensibilité	Spécificité	Avantages	Inconvénients
Examen anatomo-pathologique	> 90 %	> 90 %	Diagnostic histologique des lésions + performances	La fiabilité dépend du site, du nombre, de la taille des lésions et de l'expérience de l'anatomopathologiste
Culture	80 à 95 %	100 %	Permet l'antibiogramme	Conditions difficiles de transport (< 4 h à 4 °C ou dans des milieux spéciaux) et de culture
Test rapide à l'uréase	> 80 %	95 %	Diagnostic rapide (< 4 h)	Si négatif, compléter par un examen anapath. Diminution de sensibilité en cas de faible densité d' <i>Hp</i>
PCR	> 90 %	100 %	Conditions de transport et de conservation faciles, résultat rapide + test de sensibilité aux macrolides	
II. Avantages et inconvénients des tests non invasifs à la recherche d'<i>Helicobacter pylori</i>				
Type	Sensibilité	Spécificité	Avantages	Inconvénients
Recherche d'Ag dans les selles	Variable ≈ 92 %	Variable ≈ 93 %	Simplicité, surtout chez l'enfant et contrôle plus précoce de l'efficacité du traitement	Résultats variables chez l'enfant ; moins spécifique que les autres tests ; recueil désagréable pour le patient ; délai de réalisation/arrêt du traitement IPP* ou ATB** (1 mois) ; coût
Sérologie	Variable 60 à 95 %	Variable 60 à 95 %	Pas de délai/arrêt du traitement par IPP ou antibiotiques ; simplicité	Faux positifs (les anticorps diminuent 4 à 6 mois après l'éradication, mais de manière inconstante)
Test respiratoire à l'urée marquée	98 %	98,5 %	Performances (avant ou après éradication) ; simplicité	Délai/traitement : nécessité d'arrêt des IPP depuis 2 semaines et des ATB depuis 4 semaines ; non utilisable chez le jeune enfant
<i>D'une manière générale, tous ces tests ont de moins bonnes performances chez l'enfant.</i>				
<i>*IPP : inhibiteurs de la pompe à protons. **ATB : antibiotiques.</i>				

Nom : Prénom :	Keita Mamoudou Mesfar Meriem Date de Soutenance : 30/06/2015
Titre	Caractérisation et sensibilité aux antibiotiques des souches <i>Helicobacter pylori</i> impliquées dans les pathologies gastroduodénales
Nature du diplôme :	Master en génétique moléculaire
Résumé	<p><i>Helicobacter pylori</i> est une bactérie à Gram-négatif, microaérophile colonisant durablement l'estomac humain. Sa présence est associée à diverses pathologies de sévérité variable, dont la gastrite chronique, l'ulcère peptique, le lymphome du MALT et l'adénocarcinome gastrique.</p> <p>Son pouvoir pathogène repose sur plusieurs facteurs pro-inflammatoire tels que l'îlot de pathogénicité cag, la protéine OipA et la protéine VacA.</p> <p>L'objectif de ce travail est de détecter la présence des souches de <i>H. pylori</i> chez des patients en consultation endoscopique afin de les caractériser et de déterminer leur sensibilité aux antibiotiques.</p> <p>Nous avons utilisé des méthodes invasives nécessitant une endoscopie digestive haute et des biopsies systématiques afin de réaliser des frottis colorés, uréase test et culture.</p> <p>Dans cette étude <i>H. pylori</i> a été identifié par ses principaux caractères cultureux, morphologiques et biochimiques.</p> <p>Seulement deux biopsies ont révélé la présence de <i>H. pylori</i>, cette abondance de négativité ne signifie pas forcément l'absence de la bactérie, elle est expliquée par la fragilité du germe et sa nécessité à des conditions de transport, d'atmosphère et de culture très astreignantes.</p> <p>La réalisation de l'antibiogramme par la méthode de diffusion a révélé une seule résistance, celle de la souche BHp8 au métronidazole (l'une des résistances les plus fréquentes dans le monde).</p> <p>La découverte des résistances permet de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement d'éradication de l'infection à <i>H. pylori</i>.</p>
Mots clés	<i>Helicobacter pylori</i> , pathologies gastroduodénales, antibiogramme, biopsies.
Laboratoire de recherche	Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université des Frères Mentouri Constantine
Directeur de recherche	Mr.Rezgoune ML (Maître assistant classe A-UFM Constantine) M^{elle} Mehasni S (Doctorante -UFM Constantine)
Membres de jury :	Présidente : M^{me} Satta D (Professeur-UFM Constantine) Examinatrice : M^{me} Ziada-Bouchar H (Maître assistante-UFM Constantine)