



CARACTERISATION MOLECULAIRE DE LA VIRULENCE ET DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DE *HELICOBACTER PYLORI* DANS DES BIOPSIES GASTRIQUES HUMAINES EN CÔTE D'IVOIRE

Tchépé Flore Bernadette Diplo

► To cite this version:

Tchépé Flore Bernadette Diplo. CARACTERISATION MOLECULAIRE DE LA VIRULENCE ET DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DE *HELICOBACTER PYLORI* DANS DES BIOPSIES GASTRIQUES HUMAINES EN CÔTE D'IVOIRE. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan - Côte d'Ivoire); N°ORDRE 2069 / 2017, 2017. Français. NNT: . tel-02526966

HAL Id: tel-02526966

<https://theses.hal.science/tel-02526966>

Submitted on 31 Mar 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique



**Laboratoire de Pharmacodynamie
Biochimique**

**Année Universitaire
2016-2017**

THESE

**Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de
l'Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY**

**SPECIALITE : BIOLOGIE FONCTIONNELLE ET
MOLECULAIRE**

**Numéro d'ordre
2069/2017**

DIPLO TCHEPE FLORE BERNADETTE Epouse TCHIMOU

THEME

**CARACTERISATION MOLECULAIRE DE LA
VIRULENCE ET DE LA RESISTANCE AUX
ANTIBIOTIQUES DE *HELICOBACTER PYLORI* DANS
DES BIOPSIES GASTRIQUES HUMAINES EN CÔTE
D'IVOIRE**

**Soutenue publiquement
11 Novembre 2017**

Commission du jury

M.DJAMAN Allico Joseph	Professeur titulaire	UFHB	Président
M. YAPO Adou Francis	Maître de conférences	UFHB	Directeur
M.AKPA Essoh Eric	Maître de conférences	UFHB	Rapporteur
M.DADIE Adjéhi Thomas	Maître de conférences	UNA	Rapporteur
Mme KACOU N'DOUBAA Adèle	Professeur titulaire	UFHB	Examineur

DEDICACE

Je dédie ce manuscrit :

➤ A l'éternel DIEU TOUT PUISSANT

Merci pour cette grâce que Tu m'as accordée de conduire ce mémoire à terme.

➤ A mon époux

Tu n'as cessé de m'encourager et de m'accompagner dans toutes mes décisions. Tu as tout simplement cru en moi. Tu es mon pilier et mon réconfort. Merci Amour de m'avoir accompagnée dans cette aventure.

➤ A mes filles

Vous êtes venues chacune dans sa différence, illuminer ma vie au moment où je n'y croyais plus. Vous êtes pour l'une mon rayon de soleil et pour l'autre mon espoir car c'est pour vous que je me bats. Bienvenues Tchimou Koutou Maeva et Tchimou Koutou Marie Ghislaine.

➤ A feu mon père

Toi qui as consenti d'énormes sacrifices pour ma réussite. Père, tous tes efforts ne sont pas vains. Car, voici aujourd'hui l'un des fruits de tes nombreux sacrifices consentis à l'éducation de tes enfants. Je ne pourrai jamais oublier toute l'affection que tu avais pour moi. Ta présence m'aurait été bénéfique, mais hélas Dieu notre Seigneur en a décidé autrement. Mille fois merci. Que Dieu t'accueille auprès de lui.

➤ A ma mère

Je voudrais te remercier pour m'avoir donné la vie et d'avoir supporté tous mes caprices. Ce travail est aussi le fruit de tes sacrifices, de tes prières et de ton Amour.

➤ A Milena Arnaudo et Luciana Formiga en Italie

Je vous adresse ici toute mon affection et ma plus profonde estime. Merci de m'avoir menée là où j'en suis aujourd'hui. Les mots me manquent et je ne pourrais jamais vous remercier suffisamment pour tout l'amour, les sacrifices, la tendresse et la confiance que vous m'avez témoignée.

➤ A mes frères et sœurs

Vous qui n'avez jamais douté de moi, m'avez aidée et encouragée tout au long de mes études. Votre compréhension permanente et votre soutien sans cesse tout au long de cette aventure ont porté du fruit. Vos prières ont été entendues. Nous sommes à la fin et nous avons la victoire.

➤ A mes oncles et tantes

En reconnaissance de votre soutien et votre amour, je vous exprime toute ma gratitude.

➤ A mes grands-parents

Vos conseils et votre manière de concevoir la vie restent pour moi des souvenirs inoubliables.

Recevez ici la profondeur de ma gratitude.

➤ A mon grand cousin et "fils" Kapet Guillaume.

Toute ma reconnaissance pour ton soutien sans cesse. Que Dieu te comble de ses bienfaits.

➤ A la famille Koutou Tchimou.

Mes beaux-frères et belles-sœurs qui n'ont jamais douté de moi, m'ont aidée et encouragée tout au long de mes études. Vos conseils m'ont permis d'arriver au bout de cette longue et pénible épreuve que représente ce mémoire.

➤ A mon ami et binôme feu Kouakou Kouassi Lucien dit "KKL"

Tu m'as abandonnée en chemin au moment où je m'y attendais le moins. Un véritable espoir perdu... Repose en paix et que la terre te soit légère.

➤ A tous les défunts de la famille Djoman Diplo et Koutou Tchimou

Puisse le TOUT PUISSANT, vous accueillir auprès de lui dans sa félicité céleste.

REMERCIEMENTS

Je tiens à saluer et à remercier les personnes qui ont contribué de près ou de loin , à la réalisation de ce travail de thèse de Doctorat en me prodiguant conseils, soutiens et réconforts.

Je tiens en premier lieu à remercier **Professeur Karamoko Abou**, Président de l'Université Félix Houphouët Boigny de me permettre de présenter cette thèse, fruit de plusieurs années d'étude.

Je remercie chaleureusement le doyen de l'UFR de Biosciences **Professeur Kouamelan Essétchi Paul** pour m'avoir accepter dans son département et me permettre d'achever mon cursus universitaire. Merci doyen d'être à l'écoute de vos étudiants.

Je remercie vivement **Monsieur DJAMAN Allico Joseph**, Professeur titulaire de Biochimie-Parasitologie, Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique à l'UFR de Biosciences de l' Université Félix Houphouët Boigny, Chef de Département de Biochimie médicale et fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Vous n'avez pas hésité un seul instant à m'accepter dans votre laboratoire pour préparer le diplôme de Thèse unique. Vos conseils, votre entière disponibilité et votre rigueur dans le travail sont autant de qualités qui ont suscités en moi une très grande admiration et un profond respect pour votre personne. Soyez rassuré cher maître de ma reconnaissance vis-à-vis de ce que vous avez fait pour moi. Merci infiniment, que l'ETERNEL vous bénisse.

Je remercie profondément **Madame DOSSO Mireille**, Professeur Titulaire de Bactériologie-Virologie à l'UFR des Sciences Médicales, Directrice de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et Responsable du Certificat d'Etudes spécialisées (CES) de Bactériologie-Virologie. Je vous remercie de cette disponibilité que vous avez affichée à notre égard en dépit de vos nombreuses charges. Merci également de m'avoir acceptée dans le laboratoire de Bactériologie-Virologie et surtout pour vos conseils. Sincère remerciement. Que le Tout-Puissant vous comble de ses bienfaits.

Sincères remerciements à **Monsieur YAPO Adou Francis**, Maître de Conférences de Biochimie-Pharmacologie, Directeur de thèse, Enseignant-chercheur au Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'UFR de Biosciences de l' Université Félix Houphouët Boigny. Merci infiniment pour avoir accepté de diriger cette thèse unique. Vos conseils et suggestions m'ont permis de m'améliorer dans le travail, d'y mettre du sérieux et de l'acharnement afin d'obtenir de meilleurs résultats. Merci Docteur, pour votre optimisme

infaillible et vos encouragements. Merci également pour votre aide et votre attention à mon égard. Que l'ETERNEL DIEU se souvienne de vous.

Merci à **Madame GUESSENND Kouadio Aya Nathalie**, Maître de Recherches, Responsable de l'Unité des Antibiotiques et de la Surveillance des Résistances des Microorganismes aux Anti Infectieux (ASSURMI), Département de Bactériologie-Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). Vous n'avez pas hésité un seul instant à m'accepter au sein de votre unité. Vos conseils et votre rigueur dans le travail sont autant de qualités qui m'ont permis de doubler d'effort dans le travail. Merci Docteur. Que le Tout-Puissant vous rassasiasse de sa coupe.

Je remercie chaleureusement **Madame MBENGUE GBONON Valérie Bintou Carole**, Médecin biologiste, Chargée de recherches en Microbiologie à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). Vous m'avez fait confiance en acceptant de m'encadrer dans le phase pratique de cette thèse unique. La ponctualité et la constance dans votre travail ont fait de moi un apprenant meilleur. Dans les moments de doutes vous avez su trouver les mots pour me relancer. Votre gentillesse, votre disponibilité et votre soutien dans les moments difficiles m'ont été d'un grand réconfort . Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude. Que DIEU Tout-Puissant multiplie en vous sa grâce et vous comble de ses bienfaits.

Merci à **Madame KAKOU Gazoa Solange**, Maitre de recherche et responsable plateforme de Biologie Moléculaire l'Institut Pasteur d'Ivoire (IPCI). Vos remarques et suggestions ont participés à l'amélioration de ce document. Recevez mes plus vifs remerciements pour avoir jugé ce travail.

Grand merci à **Monsieur Ouattara Abdoulaye**, Chercheur au département d'épidémiologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci pour votre disponibilité, de m'avoir consacré du temps pour l'analyse de mes données. Que Dieu vous bénisse abondamment.

Merci à **Madame Yapo Crézoit Antoinette**, Médecin biologiste et Maitre de recherche, Responsable de l'Unité d'Immunologie de l'IPCI. Vos conseils et encouragements m'ont permis d'évoluer avec confiance dans mon travail.

Mes sincères remerciements aux enseignants-chercheurs du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique pour le savoir transmis, soyez en gratifiés.

Je tiens enfin à redire le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de l'ASSURMI, et remercie particulièrement, **Dr TIEKOURA Bertin, Dr KONAN Fernique, Dr OUATTARA Baguy, Dr Toty Abalé, Mr KOUAKOU Alexandre, Mr FOFANA Kouakou, Mme N'GUESSAN Sylvestre.**

Je remercie chaleureusement le personnel de l'Unité des Agents du tractus génital de l'IPCI, **Pr Faye-Kette Hortense, Dr Belinda Blavo, Dr Yéo Alain, Mr Ouattara Abdoulaye.**

Mes vifs remerciements :

- ✓ au personnel du service de Gastro-entérologie du CHU de Cocody
- ✓ à tous mes amis de la Thèse unique du laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique.
- ✓ A tous les doctorants de l'ASSURMI.
- ✓ au personnel de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.
- ✓ A la CEDEAO et l'ONEG pour la bourse CEDEAO pour le genre

Merci aux membres du jury de la soutenance de cette thèse unique:

- M.DJAMAN Allico Joseph	Professeur titulaire	UFHB	Président
- M. YAPO Adou Francis	Maître de conférences	UFHB	Directeur
- M. AKPA Essoh Eric	Maître de conférences	UFHB	Rapporteur
- M. DADIE Adjéhi Thomas	Maître de conférences	UNA	Rapporteur
- Mme KACOU N'DOUBA Adèle	Professeur titulaire	UFHB	Examineur

Pour votre esprit critique qui a contribué à la valorisation de ce travail. Trouvez ici chers maîtres l'expression de ma profonde gratitude.

Merci de tout cœur.

AVANT-PROPOS

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université de Félix Houphouët Boigny.

Sous la direction scientifique du Docteur **Yapo Adou Francis**. Maître de conférence dudit laboratoire.

Sous l'encadrement du Docteur **Mbengue GBONON Valérie Bintou Carole**. Chargée de recherche à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Nous avons également bénéficié de la collaboration de l'Unité de Bactériologie-Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire site de Cocody et de la plateforme de Biologie moléculaire de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire site d'Adiopodoumé.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la caractérisation moléculaire de la virulence et de la résistance aux antibiotiques de *Helicobacter pylori* dans la chronicité de l'infection à partir des biopsies gastriques à Abidjan.

La problématique de l'infection à *Helicobacter pylori* se situe aujourd'hui partout dans le monde au niveau de la résistance de cette bactérie aux antibiotiques actuellement utilisés pour le traitement ainsi que de son évolution vers le cancer gastrique. En effet, La présence de gènes de résistance aux antibiotiques utilisés dans l'éradication de l'infection serait à l'origine des nombreux échecs thérapeutiques. De même, la production de diverses protéines telles que le *cagA*, le *vacA*, *oipA* et le *tipA* par cette bactérie favoriserait l'évolution clinique de l'infection vers les formes sévères notamment le cancer gastrique.

Ainsi, nos travaux visent à identifier et à caractériser les facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques de *Helicobacter pylori* dans notre contexte hospitalier. Ils permettront ainsi de faire un état de lieu quant à la biodiversité génétique des souches de *Helicobacter pylori* circulant en Côte d'Ivoire.

Une telle approche permettra surement d'avoir de meilleurs outils dans la gestion de l'infection à *Helicobacter pylori* qui est un véritable problème de santé publique dans les pays en voie de développement.

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	I
REMERCIEMENTS	IV
AVANT-PROPOS	VIII
TABLE DES MATIERES	X
LISTE DES FIGURES.....	XX
LISTE DES TABLEAUX.....	XXI
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I- HELICOBACTER PYLORI	6
I-1- Historique.....	6
I-2- Caractères bactériologiques	7
I-2-1- Structure.....	7
I-2-2- Taxonomie	9
I-2-3- Habitat	9
I-2-3-1- Homme	9
I-2-3-2- Animal	10
I-2-3-3- Environnement.....	10
I-2-4- Modes de transmission	10
I-2-4-1-Transmission oro-orale	11
I-2-4-2-Transmission féco-orale	11
I-2-4-3- Eau	12
I-2-4-4- Endoscopie.....	12
I-2-5- Caractères morphologiques	12
I-2-6- Caractères cultureux	13
I-2-7- Caractères biochimiques et enzymatiques	15
I-2-8- Génétique.....	15

I-3- Epidémiologie	15
I-3-1-Prévalence.....	15
I-3-2- Pays développés.....	16
I-3-3- Pays en voie de développement.....	16
I- 4- Rappel de l'anatomie de l'estomac humain	19
I-4-1- Structure de l'estomac	19
I-4-2- Histologie de l'épithélium gastrique	21
I-5- Pouvoir pathogène	23
I-5-1- Facteurs de colonisation	23
I-5-2- Pathogénicité	24
I-5-2-1-Facteurs de virulence majeurs	25
I-5-2-1-1-Ilot de pathogénicité Cag et ses constituants	25
I-5-2-1-2- Cytotoxine vacuolisante (VacA)	30
I-5-2-1-3- Peptidoglycane (PG).....	32
I-5-2-1-4- Protéines de la membrane externe	32
I-5-2-1-5- Auto-immunité et lipopolysaccharide	32
I-5-2-2- Facteurs de persistance	33
I-5-2-3- Autres facteurs.....	33
I-5-3- Symptômes de l'infection à <i>H. pylori</i>	35
I-5-4- Physiopathologie plurifactorielle.....	35
I- 6- Pathologies liées à <i>H. pylori</i>	36
I-7- Déterminisme pathologique associé à <i>H. pylori</i>	38
1.7.1- Facteurs bactériens	38
I-7-2- Facteurs de l'hôte	38
I-7-3- Facteurs environnementaux	38
I-8- Résistance aux antibiotiques	41
I-8-1- Résistance naturelle	41

I-8-2- Resistance acquise	41
I-8-3- Mécanisme de résistance	41
II- DIAGNOSTIC DE L'INFECTION A <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	42
II-1- Méthodes directes ou invasives	42
II-1-1- Anatomie pathologie	42
II-1-2- Test rapide à l'uréase.....	42
II-1-3- Culture.....	43
II-1-4- Amplification génique.....	43
II-2- Méthodes indirectes ou non invasives	43
II-2-1- Test respiratoire à l'urée marquée ou analyse de l'air expiré	43
II-2-2- Sérologie.....	44
II-2-3- Détection des antigènes bactériens dans les selles	44
III- PROTOCOLE THERAPEUTIQUE	45
III-1- Protocole d'éradication	45
III-2- Mesures préventives	45
MATERIEL ET METHODES	46
I- MATERIEL	47
I-1- Matériel biologique	47
I-2- Lieux d'étude	47
I-3- Matériel technique.....	47
I-3-1- Collecte des échantillons.....	47
I-3-2- Prélèvement et transport des échantillons.....	47
I-3-3- Test rapide à l'uréase	48
I-3-4- Isolement et identification de <i>H. pylori</i> à partir de biopsies gastriques.....	48
I-3-5- Détection des facteurs de la virulence et de l'antibiorésistance par PCR	48
I-3-5-1- Matériel d'extraction de l'ADN de <i>H. pylori</i>	48
I-3-5-2- Matériel d'amplification génique.....	48

I-3-6- Séquençage	52
I-3-7- Conservation des biopsies	52
I-4- Ethique	52
II- METHODES	52
II-1- Echantillonnage	52
II-1-1- Cadre de l'étude	52
II-1-2- Prélèvement et transport des échantillons	52
II-1-3- Critères de collecte des échantillons	53
II-1-4- Détermination de la taille minimale d'échantillons	53
II-2- Test rapide à l'uréase.....	53
II-3- Isolement et identification de <i>H. pylori</i>	54
II-4- Détection des gènes de virulence et d'antibiorésistance	55
II-4-1- Extraction de l'ADN de <i>H. pylori</i> à partir des biopsies gastriques	55
II-4-2- Amplification des gènes de virulence	57
II-4-3- Amplification des gènes associés à la résistance aux antibiotiques	57
II-4-4- Analyse des produits d'amplification.....	59
II-5- Détermination des séquences nucléotidiques des gènes de résistance aux antibiotiques	59
II-5-1- Analyse des séquences néo synthétisées	59
II-5-2- Identification des mutations par alignement des séquences	59
II-6- Analyses statistiques des données	59
II-6-1- Collecte des données	59
II-6-2- Traitement statistique des données.....	60
RESULTATS ET DISCUSSION.....	61
I- RESULTATS.....	62
I-1- Données épidémiologiques.....	62
I-1-1- Caractéristiques sociodémographiques.....	62

I-1-2- Mode de vie	62
I-1-3-Antécédents médicaux	62
I-1-4- Données cliniques.....	62
I-2- Présence de <i>H. pylori</i> dans les biopsies gastriques selon le test rapide à l'uréase.....	64
I-2-1- Prévalence de l'infection à <i>H. pylori</i> selon le test rapide à l'uréase	64
I-2-2- Présence de <i>H. pylori</i> dans les biopsies gastriques selon les données épidémiologiques et cliniques.....	64
I-3- Isolement et identification de <i>H. pylori</i>	66
I-4- Détection des gènes de virulence de <i>H. pylori</i>	67
I-4-1- Caractéristiques générales des patients porteurs des gènes de virulence	67
I-4-2- Gène <i>vacA</i>	67
I-4-3- Gène <i>cagA</i>	67
I-4-4- Gène <i>oipA</i>	67
I-4-1-1-6- Répartition des génotypes de virulence identifiés chez <i>H. pylori</i> selon l'aspect endoscopique observé.....	70
I-4-1-1-7- Combinaisons génotypiques de <i>H. pylori</i> selon l'aspect endoscopique observé.....	70
I-4-2- Gène <i>tipA</i>	72
I-4-2-1- Prévalence du gène <i>tipA</i>	72
I-4-2-2- Caractéristiques générales des patients porteurs du gène <i>tipA</i>	72
I-4-2- Détection des gènes associés à la résistance aux antibiotiques	76
I-4-2-1- Caractéristiques générales des patients porteurs de <i>H. pylori</i> possédant des gènes de résistance aux antibiotiques.....	76
I-4-2-2- Gène de résistance au métronidazole.....	76
I-4-2-3- Gène de résistance à la clarithromycine	76
I-4-2-4- Gène de résistance à l'amoxicilline.....	76
I-4-2-5- Présence des gènes de résistance aux antibiotiques chez <i>H. pylori</i> selon les antécédents et l'aspect endoscopique.....	78

I-4-2-6- Résistances croisées aux antibiotiques	78
I-4-3- Identification des mutations ponctuelles dans les gènes de résistance aux antibiotiques séquencés.....	81
I-4-3-1- Analyse des séquences des gènes de résistance rdxA et frxA (MTZ).....	81
I-4-3-2- Analyse de la séquence du gène 23S rRNA (CLR).....	81
I-4-3-3- Analyse de la séquence du gène pbp1 (AML).....	81
II- DISCUSSION	86
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	100
I- CONCLUSION	101
II- PERSPECTIVES.....	102
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	103
ANNEXES	
PUBLICATIONS	

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	:	Acide désoxyribonucléique
AINS	:	Anti inflammatoires non stéroïdiens
AML	:	Amoxicilline
ARN	:	Acide ribonucléique
AVC	:	Accident vasculaire cérébral
BabA	:	Blood group antigen binding adhesion
Cag	:	Cytotoxin associated gene
Cag PAI	:	Cag pathogenicity Island
CHU	:	Centre Hospitalier Universitaire
CLR	:	Clarithromycine
DupA	:	Duodenal ulcer promoting gene
ELISA	:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FOGD	:	Fibroscopie œsogastroduodénale
IgG	:	Immunoglobuline G
IL	:	Interleukine
IPP	:	Inhibiteurs de la pompe à protons
LPS	:	Lipopolysaccharide
LT	:	Lymphocytes T
MALT	:	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MMP1	:	Matrice métallo protéinase 1
MTZ	:	Métronidazole
NAP	:	Neutrophil activating protein
NF-κB	:	Nuclear Factor κB
OipA	:	Outer Inflammatory Protein A
pb	:	paire de bases
pbp1	:	penicillin binding protein

PCR	:	Polymérase Chain Reaction
PGN	:	Peptidoglycane
pH	:	potentiel hydrogène
RGO	:	Reflux gastro-oesophagien
SabA	:	Sialic acid binding adhesion
SSTIV	:	Système de secretion de type IV
TipA	:	TNF alpha inducing protein A
TLR	:	Toll-Like receptor
TNF- α	:	Tumor Necrosis Factor alpha
VacA	:	Vacuolating associated cytotoxin A
VIH	:	Virus de l'immuno déficience humaine

LISTE DES FIGURES

Figure 1: <i>Helicobacter pylori</i>	8
Figure 2: Aspect des colonies de <i>H. pylori</i> sur gélose Columbia au sang frais	14
Figure 3: Prévalence de <i>H. pylori</i> dans le monde	18
Figure 4: Schéma descriptif de l'anatomie de l'estomac humain.....	20
Figure 5: Schéma de l'histologie de l'estomac humain.....	22
Figure 6: Arrangement génétique de l'îlot de pathogénicité <i>cag</i> de <i>H. pylori</i> 26695.	27
Figure 7: Architecture proposée du système de sécrétion de type IV de <i>H. pylori</i>	29
Figure 8: Différentes actions cellulaires de <i>vacA</i> au cours de l'infection chronique par <i>H. pylori</i>	31
Figure 9: Schéma descriptif de l'infection par <i>H. pylori</i> et affections digestives associées.....	37
Figure 10: Déterminisme pathologique lié à <i>H. pylori</i>	40
Figure 11: Schéma synoptique de l'extraction de l'ADN à partir de la biopsie.	56
Figure 12: Profil électrophorétique de produits d'amplification des gènes <i>vacA</i> , <i>cagA</i> et <i>oipA</i>	69
Figure 13: Profil électrophorétique des produits d'amplification du gène <i>tipA</i>	73
Figure 14: Profil électrophorétique des produits d'amplification des gènes <i>rdxA/frxA</i> , 23S rRNA et <i>pbp1</i>	77
Figure 15: Alignement des protéines de <i>RdxA</i> et <i>FrxA</i> des souches sélectionnées résistantes aux antibiotiques	82
Figure 16: Alignement des protéines 23S rRNA des souches sélectionnées résistantes aux antibiotiques	83
Figure 17: Alignement des protéines Pbp1 des souches sélectionnées résistantes aux antibiotiques	84

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Principaux facteurs de virulence de <i>H. pylori</i>	34
Tableau II: Amorces pour l'amplification des gènes associés à la résistance aux antibiotiques	50
Tableau III: Amorces pour l'amplification des gènes associés à la virulence	51
Tableau IV: Conditions de réalisation des PCR pour la détection des gènes de résistance de <i>H. pylori</i>	58
Tableau V: Répartition des patients prélevés selon l'aspect endoscopique observé	63
Tableau VI: Positivité du test rapide à l'uréase selon le site de prélèvement de la biopsie.....	65
Tableau VII: Présence de <i>H. pylori</i> dans les biopsies gastriques selon les données épidémiologiques et cliniques.	65
Tableau VIII: Fréquence des gènes de virulence et caractéristiques des patients porteurs des gènes de virulence.	68
Tableau IX: Répartition des différents génotypes de virulence.	68
Tableau X: Fréquence des génotypes identifiés et génotypes combinés selon les antécédents familiaux de syndrome ulcéreux l'aspect endoscopique	71
Tableau XI: Patients porteurs du gène <i>tipA</i> selon les données sociodémographiques et l'indication endoscopique.	74
Tableau XII: Répartition du gène <i>tipA</i> de <i>H. pylori</i> selon l'aspect endoscopique de la muqueuse gastrique.	75
Tableau XIII: Présence des gènes de résistance aux antibiotiques chez <i>H. pylori</i> selon les antécédents et selon l'aspect endoscopique de la muqueuse gastrique.....	79
Tableau XIV: Profil génétique de la résistances croisées de <i>H. pylori</i> aux antibiotiques.....	80
Tableau XV: Répartition des génotypes de résistance croisée de <i>H. pylori</i> selon les génotypes de virulence identifiés.	80
Tableau XVI: Différents types de mutations identifiés dans les séquences des gènes <i>rdxA/frxA</i> , <i>23S rRNA</i> et <i>pbpI</i>	85

INTRODUCTION

Helicobacter pylori (*H. pylori*) est responsable de l'une des infections chroniques les plus courantes car elle touche plus de 50% de la population humaine dans le monde (**Blaser, 1997; Suerbaum et Michetti, 2002; Cover et Blaser, 2009**). Depuis sa classification comme bactérie présente à la surface de la muqueuse gastrique capable de survivre et de persister malgré l'acidité gastrique et la forte réponse immunitaire (**Marshall et Warren, 1984**), *H. pylori* est incriminée dans de multiples affections de la muqueuse gastroduodénale, telles que la gastrite, l'ulcère gastrique, le lymphome gastrique du MALT (Mucosa Associated lymphoid tissue) et l'adénocarcinome gastrique (**Ito et al., 2008; Ford et al., 2016**).

L'infection débute par une gastrite chronique superficielle qui passe généralement inaperçue. Mais après une lente progression des lésions de la muqueuse de l'estomac durant des décennies, un cancer gastrique peut se déclarer (**Atherton, 1998; De Korwin et Lozniewski, 2000; Shiota et al., 2013**). D'après l'Agence Internationale de la Recherche sur le Cancer de l'Organisation Mondiale de la Santé (AIRC/OMS), *H. pylori* est actuellement la seule bactérie définie comme carcinogène de classe 1 autrement dit, la seule bactérie directement associée au développement du cancer gastrique chez l'homme (**IARC, 1994**). A l'échelle mondiale, le cancer gastrique représente le quatrième cancer et la deuxième cause de mortalité par cancer. Il est responsable de près de 700 000 décès chaque année dans le monde et ce chiffre est en évolution (**WHO, 2006**).

Le rôle majeur de *H. pylori* dans l'étiopathogénie des maladies gastroduodénales (gastrites, ulcères, adénocarcinomes et lymphomes gastriques) est bien établi et a conduit à considérer la maladie ulcéreuse comme une maladie infectieuse (**Hafidi et al., 2013**). En effet, l'ulcère gastroduodénale est une affection cosmopolite fréquente avec d'énormes disparités dans la répartition géographique (**Woodward et al., 2000**). Dans les pays riches, les taux de prévalence sont actuellement plus bas (5 à 10 %) et la transmission est plus tardive, certainement du fait de l'amélioration des conditions de vie et sans doute, également en raison de l'utilisation plus fréquente d'antibiotiques (**Hunt et al., 2011**). Dans les pays pauvres, l'infection est beaucoup plus fréquente avec des taux de prévalence de 75 % en moyenne avec une transmission qui survient très tôt dans l'enfance (**Malaty, 2007**).

En Côte d'Ivoire, l'ulcère gastroduodénale représente le deuxième motif de consultation en gastro-entérologie après la colopathie fonctionnelle (**Attia et al., 1999**). En outre, l'on estime que près de 75% de la population est infectée selon des données histologiques (**Attia et al., 2001**). L'infection à *H. pylori* est un véritable problème de santé publique en Côte d'Ivoire. La principale cause qui est le cancer gastrique représente 6,09% des cancers et touche particulièrement les

hommes (**Effi et al., 2013**). La prévalence élevée de l'infection implique que des stratégies de prise en charge sont nécessaires.

Dans le monde entier, des consensus internationaux sont érigés pour permettre une meilleure prise en charge de l'infection à *H. pylori*. Les recommandations européennes sont connues sous le nom de Conférence de consensus Maastricht III et ont été publiées en 2007 (**Malfertheiner et al., 2007**). Les recommandations américaines ont été également publiées en 2007 (**Chey et Wong, 2007**). Ces recommandations sont en pleine évolution du fait de la nécessaire adaptation à l'émergence de résistances de plus en plus fréquentes aux antibiotiques de base.

Cependant, en Afrique, il n'y a pas de recommandations particulières concernant la prise en charge de *H. pylori*. Les cliniciens appliquent les schémas thérapeutiques établis dans les consensus internationaux. Ainsi, la comparaison épidémiologique directe de la maladie ulcéreuse peptique entre les pays en voie de développement et le reste du monde est complexe, étant donné que les ulcères peptiques peuvent être asymptomatiques et qu'il existe une forte variation dans la disponibilité des tests nécessaires au diagnostic et leur accessibilité (**Tonkic et al., 2012**).

La plupart des travaux menés en Afrique sur *H. pylori* concernent les aspects cliniques, endoscopiques et histologiques (**Naficy et al., 2000; Andoulo et al., 2013**). Il existe très peu de données concernant la résistance aux antibiotiques qui constitue l'un des facteurs majeurs des échecs thérapeutiques.

En Côte d'Ivoire, la culture microbienne de ce germe n'est pas faite, bien qu'essentielle pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques (**Attia et al., 2001**). Elle est aussi recommandée comme examen de référence pour le diagnostic d'une infection à *H. pylori*. Dans ce contexte Il nous est impossible d'évaluer le niveau de résistance aux antibiotiques de *H. pylori*.

Par ailleurs, plusieurs facteurs de virulence connus comme influençant la pathogénicité de cette bactérie ont été décrits. Ce sont entre autres l'îlot de pathogénicité du gène associé à la cytotoxine (*cagPAI*), la cytotoxine vacuolisant (*vacA*), la protéine inflammatoire externe (*oipA*), l'antigène induisant le contact avec l'épithélium (*iceA*). Ces facteurs de virulence seraient selon de nombreuses études menées en Afrique du nord et subsaharienne (**Ben Mansour et al., 2010; Breurec et al., 2012**) et ailleurs (**Havaei et al., 2014; Rasheed et al., 2014**) fortement liés à l'évolution de l'infection à *H. pylori* vers les formes les plus sévères (ulcère peptique, lymphome de MALT, cancer gastrique). L'étude de la biodiversité des souches de *H. pylori* a permis d'associer certains allèles à l'ulcération gastroduodénale. En Côte d'Ivoire, une étude menée en 2007 par **Ekaza et al** a montré que les bactéries porteuses du gène *cagA* étaient retrouvées de manière plus abondante dans la muqueuse gastrique des sujets infectés et présentaient également une forte activité (forte présence de polynucléaires neutrophiles).

Les stratégies de prise en charge de *H. pylori* appliquées dans les pays industrialisés sont basées sur une solide connaissance des profils antibiotypiques et génétiques (génotypes, facteurs de virulence et de résistance) des souches de *H. pylori* impliquées dans les différentes formes de l'infection (gastrites chroniques, ulcères gastroduodénaux, adénocarcinome). Ces stratégies sont uniformes et basées sur une bonne connaissance de l'épidémiologie de la circulation de *H. pylori* dans leur contexte sanitaire.

La réduction de la prévalence de l'infection au niveau mondial s'inscrit donc dans les prérogatives de la recherche médicale et entre dans le cadre de la lutte contre la pauvreté. Ainsi, «l'énigme africaine» qui s'explique par des niveaux élevés d'infection par *H. pylori* dans la plupart des pays africains, mais à des niveaux relativement faibles de cancer gastrique semble être un atout pour l'Afrique (**Holcombe, 1992**). Par conséquent, une étude concernant la biodiversité génique des souches virulentes circulantes et leur implication dans la résistance à l'antibiothérapie entraînant la chronicité de l'infection à *H. pylori* mérite d'être faite.

Ainsi, la présente étude vise à caractériser les facteurs virulence et de résistance aux antibiotiques de *H. pylori* au plan moléculaire à partir de biopsies gastriques.

De façon spécifique, il s'agit de :

1. Déterminer la diversité génétique des facteurs de virulence de *H. pylori*.
2. Décrire le profil génétique des facteurs de virulence associés à la chronicité de l'infection à *H. pylori*.
3. Déterminer la prévalence moléculaire de la résistance aux antibiotiques utilisés pour le traitement de l'infection à *H. pylori*
4. Identifier les mutations ponctuelles dans les séquences de gènes conférant la résistance aux antibiotiques utilisés pour le traitement.

D'une façon générale, une enquête épidémiologique a été réalisée pendant la collecte des échantillons de biopsies gastriques et des données cliniques de l'endoscopie. Ensuite, une étude bactériologique a permis de décrire les caractéristiques de *H. pylori* dans les biopsies gastriques collectées. Finalement, les facteurs génétiques de la virulence et de l'antibiorésistance ont été déterminés par PCR suivi d'un séquençage des gènes conférant la résistance aux antibiotiques pour la recherche des mutations ponctuelles.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- **HELICOBACTER PYLORI**

I-1- **Historique**

La découverte de *H. pylori* a été un véritable bouleversement dans la communauté scientifique et un point de départ d'une prise de conscience : Celle selon laquelle il existerait un groupe de bactéries colonisant les muqueuses du tube digestif et notamment de l'estomac supposé stérile. En effet, les scientifiques de l'époque étant convaincus de la stérilité de l'estomac, vu la très forte acidité qui y règne, n'accordent pas d'importance à cette observation pensant qu'il ne pouvait s'agir que de contaminants. En 1875, des scientifiques allemands découvrirent une bactérie spiralée dans des estomacs humains. Celle-ci ne pouvant être cultivée, les recherches la concernant furent finalement abandonnées.

En 1906, Walter Krienitz, (**Rickes *et al.*, 2007**) un médecin allemand observe pour la seconde fois des bactéries spiralées dans l'estomac d'un patient. Ce n'est qu'au début des années 1980 que de telles bactéries sont cultivées et étudiées. Robin Warren, un pathologiste australien constate la présence de bactéries spiralées, dans la moitié des biopsies gastriques qu'il prélève. Il fait l'hypothèse qu'elles sont à l'origine de gastrites chroniques et d'ulcères gastroduodénaux, pathologies que l'on pensait, jusque là, liées au stress ou à la nourriture épicée.

Intéressé par ces résultats, Barry Marshall, un étudiant de Robin Warren, est le premier à cultiver cette bactérie en 1982 (**Marshall et Warren, 1984**).

Cette dernière est baptisée dans un premier temps *Campylobacter pyloridis* puis *Campylobacter pylori* (après correction grammaticale latine) en raison de ses similitudes avec *Campylobacter jejuni* (notamment son caractère micro aérophile). Cependant, différentes études portant sur les caractères génétiques (séquences des ARNr 16S, pourcentage de G+C) et phénotypiques (morphologie, structure, composition en acides gras, activités enzymatiques) ont permis d'individualiser cette bactérie dans un nouveau genre, et de la renommer *Helicobacter pylori*. Le nom "*pylori*" tire son origine du mot latin «pylorus» qui signifie «gardien de l'ouverture» et qui fait référence à l'ouverture circulaire (le pylore) menant de l'estomac au duodénum.

La communauté scientifique, sceptique quant au rôle de *H. pylori* dans les ulcères gastriques, commence à changer d'avis après des études complémentaires conduites par Marshall, dont la plus décisive est celle durant laquelle il ingurgite un tube à essai de *H. pylori* et contracte une gastrite qu'il guérit avec des antibiotiques.

En 1994, le National Institute of Health (Australie) publie un texte soutenant que la plupart des ulcères gastriques récurrents sont causés par *H. pylori*, et recommande que des antibiotiques soient

inclus dans le traitement. En 2005, l'Institut Karolinska de Stockholm décerna le prix Nobel de médecine aux Docteurs Barry Marshall et Robin Warren "pour leur découverte de la bactérie *Helicobacter pylori* et son rôle dans la gastrite et l'ulcère gastroduodéal".

I-2- Caractères bactériologiques

I-2-1- Structure

H. pylori est une bactérie dont la structure externe est hélicoïdale (d'où son nom «*Helicobacter*»), munie de flagelles, et qui infecte la muqueuse gastrique. Cette bactérie est pathogène et colonise sélectivement l'épithélium gastrique humain. C'est un bacille à Gram-négatif spiralé mesurant 2 à 4 µm de long et 0,5 à 1 µm de large et qui peut également exister sous une autre forme ronde dite coccoïde viable mais non cultivable (**Enroth et al., 1999; Andersen et Rasmussen, 2009**).

H. pylori est une bactérie microaérophile, uréase, catalase et oxydase positive. Elle possède 4 à 6 flagelles polaires (Figure 1) et engainés conférant une motilité et permettant un mouvement rapide dans la muqueuse gastrique visqueuse lui assurant ainsi une meilleure colonisation (**O'Toole et al., 2000; Radin et al., 2013**) Elle résiste à l'acidité gastrique en hydrolysant l'urée en ammoniac, grâce à son uréase. Elle est également capable de résister au stress oxydatif généré par la réponse immunitaire grâce à la catalase ainsi que d'autres éléments de défense tels que la superoxyde dismutase et l'alkylhydroperoxyde réductase (**Kusters et al., 2006**).

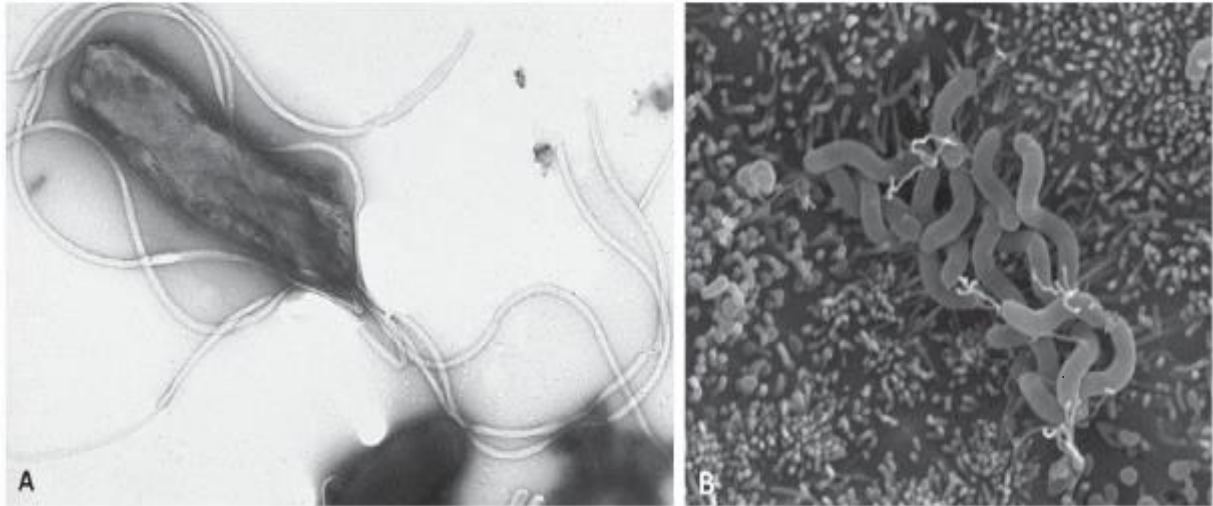


Figure 1: *Helicobacter pylori*

Photos de H. pylori prises en microscopie électronique. A. Une bactérie H. pylori, B. Amas de H. pylori au niveau des cellules épithéliales gastriques
(Source: Tan et al., 2009)

I-2-2- Taxonomie

Le genre *Helicobacter* inclut diverses espèces de bactéries micro aérophiles colonisant soit l'estomac, soit l'intestin de différents mammifères (**Raymond *et al.* 2000**). Parmi elles, se trouve *Helicobacter pylori* dont la classification taxonomique (**Goodwin et Worsley, 1993; Dewhirst *et al.*, 2000; Solnick et Vandamme, 2001**) est la suivante :

➤ Classification

Domaine : *Bacteria*

Phylum : *Proteobacteria*

Classe : *Epsilon Proteobacteria*

Ordre : *Campylobacterales*

Famille : *Helicobacteraceae*

Genre : *Helicobacter*

Espèce : *pylori*

➤ Nom binomial : *Helicobacter pylori*

I-2-3- Habitat

I-2-3-1- Homme

H. pylori vit exclusivement dans l'estomac humain et est le seul organisme connu pouvant survivre dans un environnement aussi acide. La colonisation de l'estomac humain par *H. pylori* serait très ancienne, et les ancêtres d'*Homo sapiens* auraient porté l'ancêtre d'*H. pylori*, qui aurait évolué avec lui (**Cover et Blaser, 2009; Belair *et al.*, 2011**).

Les données actuelles suggèrent que *H. pylori* est une bactérie dont le réservoir principal est humain (**Ota *et al.*; 2009**). Elle est totalement inféodée à la muqueuse gastrique humaine (**Lehours, 2003**), surtout au niveau des cellules de l'antra où il s'attache. *H. pylori* a été retrouvé dans d'autres sites où les cellules antrales peuvent se trouver, le plus important en terme de pathogénicité étant le duodénum où une métaplasie antrale peut être présente (**Wyatt *et al.*, 1990**).

I-2-3-2- Animal

Il est maintenant prouvé que certains animaux peuvent servir de réservoir de *H. pylori* notamment les primates (old world macaques) et le chat (**Goodwin et al., 1998**). Les mouches, quant à elles, peuvent véhiculer *H. pylori* lorsqu'elles sont mises en présence de boîtes de Pétri des colonies de celui-ci. Cependant, l'utilisation de selles de sujets *H. pylori* positifs n'a pas permis de reproduire ces résultats (**Veldhuyzen et al., 1995**). Les cafards qui vivent près de l'homme et qui sont attirés par la nourriture sont capables de véhiculer ce germe. Il a en effet été retrouvé par culture dans leurs excréments. *H. pylori* est également capable de coloniser l'estomac des moutons. Cela suggère un possible réservoir bovin de cette bactérie (**Pounder et al., 1995**).

I-2-3-3- Environnement

La possibilité que l'eau contaminée soit responsable de la transmission de *H. pylori* a été soulevée et confirmée récemment en Iran (**Ranjbar et al., 2016**). Les études ont montré que ce germe était difficilement cultivable avec les méthodes standards en milieu ambiant. *H. pylori* perd sa forme typique spiralée et donne des formes coccoïdes lorsque les conditions lui sont difficiles. Ces formes coccoïdes seraient des formes de résistance du germe dans la nature. Elles sont capables de redonner les formes spiralées, de coloniser une muqueuse gastrique et de déterminer une gastrite (**Fox, 1995**). Les formes cultivables de *H. pylori* ne survivent pas plus de 48 heures dans l'eau (**Matisko et Thomson, 1995**) et pas plus de 1 à 3 jours à la température ambiante dans l'eau distillée saline (**West et al., 1992**). Il en est de même pour les fruits et légumes.

I-2-4- Modes de transmission

Une transmission de personne à personne par exposition oro-orale ou féco-orale semble la plus probable. La principale voie de transmission reste la voie intrafamiliale (**Okuda et al., 2015; Osaki et al., 2015; Bui et al., 2016**) des mères aux enfants et entre frères et sœurs à travers la voie orale – orale, fécale - orale et gastro-orale par contamination par les instruments de fibroscopie bien que rare (**Yokota et al., 2015**). Il convient de noter que la transmission est faite dans la petite enfance où elle est persistante et transitoire (**O'Ryan et al., 2015**). A cela, s'ajoutent dans les pays en voie de développement, le surpeuplement des ménages et les mauvaises conditions de vie (**Hasosah et al., 2015**). Les facteurs de la transmission fécale-orale semblent avoir disparus, ce qui est en accord avec une transmission devenue rare et sans doute essentiellement oro-orale (**Mégraud, 2003**).

I-2-4-1-Transmission oro-orale

H. pylori est isolé à partir de la plaque dentaire (Ogaya *et al.*, 2015) et de la salive (Banatvala *et al.*, 1993; Vincent *et al.*, 1996; Parsonnet *et al.*, 1999; Yee, 2016). En effet, selon (Wang *et al.* 2014), l'antigène de l'uréase de *H. pylori* a été isolé de la salive des patients atteints d'ulcère gastrique dû à cette bactérie. Un facteur favorisant serait la pré mastication par la mère des aliments qui sont donnés ensuite aux jeunes enfants (Vincent, 1991). Les taux d'infection les plus élevés sont rencontrés notamment chez les enfants nés de mères porteuses de *H. pylori* (même souche pour les deux). Ceci suppose des régurgitations fréquentes, parfois provoquées par certains aliments, et la colonisation de la cavité buccale.

En outre, les vomissures des enfants infectés peuvent également servir de véhicule au transport de *H. pylori* dans les familles. La contamination par la salive pourrait se faire directement par les gouttelettes salivaires, la toux, le crachat, et indirectement par les doigts lors du partage d'aliments à partir d'un plat commun ou l'échange de jouets portés à la bouche, ou encore le contact étroit entre le visage de l'enfant et celui des adultes (Walker *et al.*, 1996; Vincent, 1996).

I-2-4-2-Transmission féco-orale

L'élimination fécale probable de *H. pylori* est un argument d'une transmission féco-orale. Ainsi, l'exposition particulière de l'enfant qui porte facilement ses doigts à la bouche après la manipulation d'objets souillés augmente le risque de cette voie de transmission.

Alors que la transmission fécale-orale semble improbable en Europe, certaines conditions propres aux pays africains la rendent plausible. La fréquence des diarrhées chez l'enfant, qui s'accompagne d'un temps de transit raccourci, permettrait la survie de *H. pylori* dans l'intestin et ainsi de retrouver des formes cultivables de *H. pylori* dans les selles. Si ces selles sont infectantes, dans des conditions d'hygiène difficiles, d'autres enfants pourront s'infecter directement (Thomas *et al.*, 1992).

Il a été démontré toutefois dans une étude épidémiologique qu'il n'y a pas de corrélation entre des infections à *H. pylori* et l'hépatite A, mais leurs infections sont fortement associées (Bui *et al.*, 2016). Cette bactérie peut également être transportée par les mouches, fréquentes sous le climat africain (Grübel *et al.*, 1997; Mégraud, 1998; Imamura *et al.*, 2003). Il a pu être démontré, que la bactérie peut survivre pendant 30 heures chez des mouches domestiques. De ce fait, on pense qu'il est possible qu'il y ait des réservoirs dans l'environnement et que des mouches ou d'autres insectes puissent transmettre le germe de façon indirecte par l'intermédiaire d'aliments ou d'eau potable. Ces deux modes de transmission ne sont pas incompatibles. Les selles jouent un rôle

prédominant lorsque les conditions d'hygiène sont défavorables. Des données épidémiologiques obtenues au Chili ont montré que la consommation de légumes crus était un facteur de risque de l'infection. Ces légumes ont pu être contaminés par les selles humaines (**Hopkins *et al.*, 1993**).

I-2-4-3- Eau

La contamination de l'eau de consommation pourrait être une des principales sources d'infection (**Engstrand, 2001; Rolle-Kampezyk *et al.*, 2004; Bellack *et al.*, 2006; Aziz *et al.*, 2015**) si l'eau d'adduction est insuffisamment traitée. A l'heure actuelle on ne dispose pas d'arguments convaincants permettant d'incriminer l'environnement (en particulier l'eau) comme source de contamination. Notons néanmoins que, cette bactérie reste viable plusieurs jours dans l'eau (**Donze *et al.*, 2005; Boehnke *et al.*, 2015**).

Une étude cas-témoin menée au Pérou, a permis de montrer que l'eau pouvait être une voie de transmission de *H. pylori* (**Klein, 1991**). Un support biologique a été donné à cette étude quand *H. pylori* a été détecté par amplification génique dans les eaux d'égout collectées à Lima. D'autres arguments pour cette voie de transmission sont: l'association entre l'infection à *H. pylori* et l'absence d'eau courante à la maison (**Donze *et al.*, 2005**) Ainsi que, la contamination d'eau minérale par la bactérie depuis la source lors de la mise en bouteille (**Ranjbar *et al.*, 2016**). L'eau se trouvait parmi les facteurs de risque (conditions de vie et conditions environnementales) associés à la colonisation de *H. pylori* dans l'étude effectuée à Leipzig (Allemagne) par **Krumbiegel *et al.* (2000)**.

I-2-4-4- Endoscopie

La voie iatrogène (endoscopes contaminés) reste minoritaire mais existe. Cette transmission se fait dans la salle d'endoscopie digestive à partir du fibroscope ou des pinces à biopsies (**Williams, 1999**). Ce risque de transmission bactérienne s'ajoute au risque de transmission virale (Virus de l'Hépatite B : VHB, Virus de l'immunodéficience Humaine : VIH) (**Nkuize *et al.*, 2012**) et renforce la nécessité d'une bonne désinfection du matériel entre deux patients (**Brigard, 1994**).

I-2-5- Caractères morphologiques

H. pylori est un bacille à Gram négatif de 0,5 à 1µm de diamètre sur 2 à 4µm de longueur. Les formes typiques sont hélicoïdales, spiralées ou incurvées. Il est mobile grâce à une ciliature polaire de 4 à 6 flagelles entourés d'une gaine et dépourvu de fibre péri plasmique conférant une motilité et permettant un mouvement rapide dans la muqueuse gastrique visqueuse lui assurant ainsi une meilleure colonisation (**O'Toole *et al.*, 2000**). La bactérie ne forme pas de spores mais peut adopter des formes coccoïdes viables mais non cultivable et cela lorsqu'elle atteint la phase du

plateau de croissance ou quand le milieu s'appauvrit. Elles correspondent à des formes de dégénérescence (**Vandenbroucke-Grauls *et al.*, 1999**).

I-2-6- Caractères cultureux

Hors de sa niche écologique, *H. pylori* est sensible à l'oxygène ambiant et doit par conséquent être cultivée à 37°C en micro aérobiose (5% de teneur en oxygène et 5 à 10% de teneur en CO₂). Cette bactérie est micro aérophile (c'est-à-dire qu'elle nécessite un apport d'oxygène mais dans des proportions inférieures à celles trouvées dans l'atmosphère), mais est incapable de croître en anaérobiose. *H. pylori* croît lentement (3 à 4 jours minimum) sur des milieux de culture additionnés de sang, de sérum ou de suppléments d'enrichissement tels que :

- la gélose sélective *Helicobacter pylori* (PYL) de Bio Mérieux
- la gélose Columbia/Brucella de Wilkins Chalgren, enrichie à 10% de sang de cheval ou de sang de mouton et supplémentée

Les colonies apparaissent très fines (0,5 mm de diamètre), translucides et non pigmentées. Elles sont disposées en nappes brillantes et non hémolytiques (**Fig.2**).

Autres milieux de culture pour *H. pylori*

- Milieu CVA : Gélose au sang de mouton contenant 20 mg/L de céfopérazone, 10 mg/L de vancomycine et 2 mg/L d'amphotéricine B.
- Milieu TVP: Gélose au sang de mouton contenant 5 mg/L de triméthoprim, 10 mg/L de vancomycine et 2500 UI/L de polymyxine B.

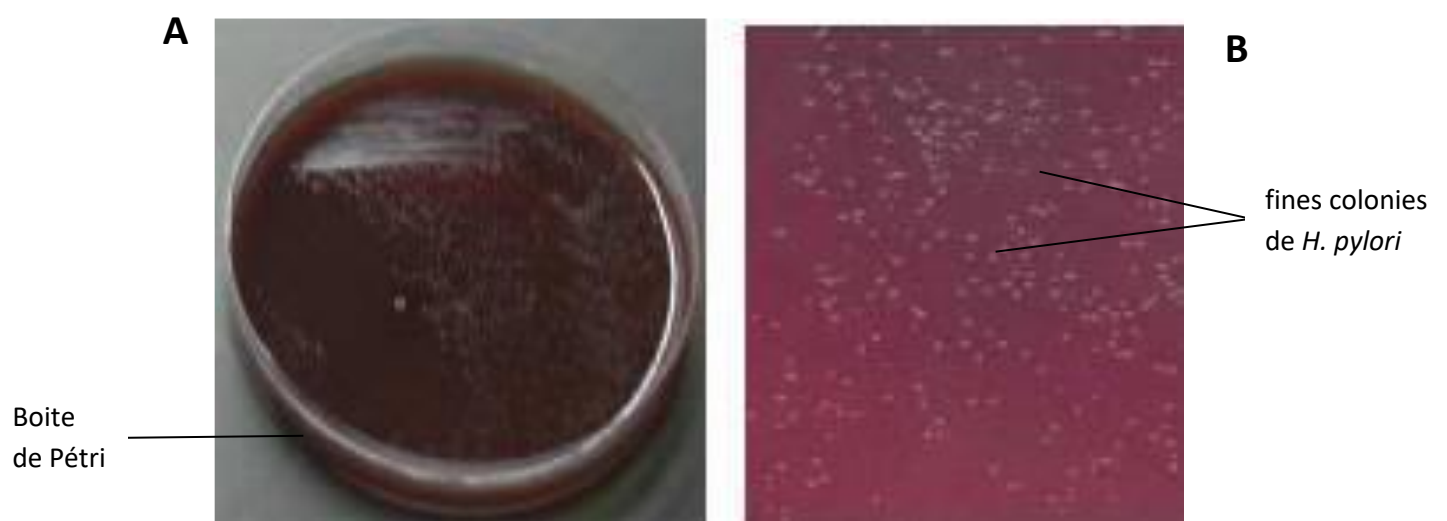


Figure 2: Aspect des colonies de *H. pylori* sur gélose Columbia au sang frais

(Source: Amir-Tidani, 2003)

A: boite de Pétri avec de fines colonies de *H. pylori*

B: fines colonies de *H. pylori*

I-2-7- Caractères biochimiques et enzymatiques

H. pylori produit une uréase, une catalase, une oxydase, une alkylhydroperoxyde réductase et une superoxyde dismutase (Kusters *et al.*, 2006). Elle n'acidifie pas les sucres. Son activité uréasique est très intense et c'est cette enzyme qui lui permet la survie à un pH très acide en présence d'urée. C'est une bactérie réputée asaccharolytique; toutefois des travaux ont montré qu'il pouvait utiliser faiblement la voie des pentoses.

I-2-8- Génétique

H. pylori compte parmi les espèces bactériennes présentant le plus grand polymorphisme génétique (Jiang *et al.*, 1996; Linz *et al.*, 2007). Le génome de *H. pylori* est séquencé depuis 1997 et possède 1 667 867 paires de bases codant pour 1590 protéines essentielles. *H. pylori* possède environ 1200 gènes communs à toute l'espèce et 200 à 400 gènes présents de manière variable selon les souches. La majorité des différences génétiques est retrouvée dans la zone de plasticité et dans l'îlot de pathogénicité (CagPAI). Aussi, *H. pylori* peut posséder des plasmides ou des systèmes d'import d'ADN qui lui permettent d'augmenter son adaptabilité. Les analyses *in silico* ont permis de montrer que les gènes de ménage ou de virulence peuvent être transférés entre bactéries. Ces gènes peuvent provenir d'autres espèces du genre *Helicobacter* mais également d'autres genres bactériens (Ferrand, 2009). La diversité génétique de *H. pylori* s'explique aussi par des différences notables, entre les souches, dans l'organisation générale du génome, l'ordre des gènes et les séquences protéiques théoriques. La grande variabilité génétique de *H. pylori* pourrait être due à sa voie de transmission intrafamiliale et à sa grande adaptation à un hôte unique.

En 1999, le génome d'une seconde souche J99 est publié et mise à la disposition de la communauté scientifique. Les deux séquences sont accessibles sur le réseau internet et contiennent 1667867 et 1643831 paires de bases pour les souches 26695 et J99 respectivement soit une taille identique à *Haemophilus influenzae*.

I-3- Epidémiologie

I-3-1-Prévalence

L'infection par *H. pylori* est très répandue et touche environ 50% de la population mondiale. Environ 4% de la population souffre d'un ulcère gastroduodéal (Najm, 2011). Environ 10% des personnes développent un ulcère gastroduodéal à un moment donné de leur vie (Snowden, 2008). Le taux d'infection varie d'un pays à l'autre. La prévalence est très élevée dans les pays en développement où elle peut atteindre 90% alors qu'elle peut ne pas dépasser 20% dans les pays

industrialisés (**Krejs, 2010**). Dans l' ensemble, l'infection à *H. pylori* dans le monde entier est en baisse, en particulier dans les pays développés (**Leclerc, 2006; Burucoa, 2010; Ertem ,2013**).

Il existe une grande disparité géographique des prévalences. Les données actuelles montrent qu'il existe deux modèles différents concernant l'épidémiologie de l'infection à cette bactérie. Schématiquement on peut opposer les régions à forte prévalence comme l'Afrique, l'Amérique du sud, l'Inde et la Chine aux régions à prévalence modérée (Europe, Amérique du nord, Australie) (**Figure 3**).

I-3-2- Pays développés

Dans les pays développés, les preuves d'infection sont plus fréquentes chez l'adulte que chez l'enfant. Des preuves sérologiques sont rares chez les enfants de moins de 10 ans, mais elles se trouvent à environ 10% chez les personnes de 18 à 30 ans et atteignent environ 50% chez celles de plus de 60 ans (**Donze et al., 2005**). L'augmentation du niveau de vie, l'amélioration des conditions d'hygiène et l'importante utilisation des antibiotiques sont parmi les facteurs qui ont contribué vraisemblablement à la diminution de la prévalence de *H. pylori* dans les pays industrialisés (**Malaty, 2007**).

I-3-3- Pays en voie de développement

Dans les pays en développement, notamment les pays d'Afrique, la prévalence est constante de la grande enfance à l'âge adulte. L'infection survient généralement pendant l'enfance. La réaction immunitaire qui s'en suit détermine probablement l'évolution de l'infection au cours du temps (**Raymond et al., 2005**). En effet, plusieurs études tendent à montrer qu'un individu a très peu de risques d'être infecté après l'âge de 10 ans (**Mitchell et Mégraud, 2002**).

Les facteurs de risque de l'acquisition de l'infection par *H. pylori* sont fréquemment liés à la pauvreté. Ils comprennent la promiscuité, le manque d'hygiène, le partage de lits pendant l'enfance et le faible niveau d'éducation des parents. En outre, des facteurs comportementaux propres à certaines sociétés, tel que la pré-mastication des aliments par la mère, semblent également jouer un rôle significatif. Aux États-Unis, par contre, les personnes atteintes sont essentiellement des personnes âgées (plus de 50 % de personnes contaminées au-delà de 60 ans, contre environ 20% chez les moins de 40 ans), ainsi que les personnes les plus démunies. (**Pilotto et Malfertheiner, 2012**).

L'Organisation mondiale de gastroentérologie (OMG) observe une prévalence exceptionnellement élevée de *H. pylori* chez l'adulte, soit 70 % à 90 % en Amérique du Sud et de 50 % à 80 % en Asie.

L'incidence du cancer gastrique est également élevée dans ces régions (**Burucoa, 2012**). Une étude récente de l'épidémiologie de *H. pylori* a indiqué que la prévalence est également élevée en Europe de l'Est, en Afrique du Nord et au Moyen-Orient (**Tonkic *et al.*, 2012**).

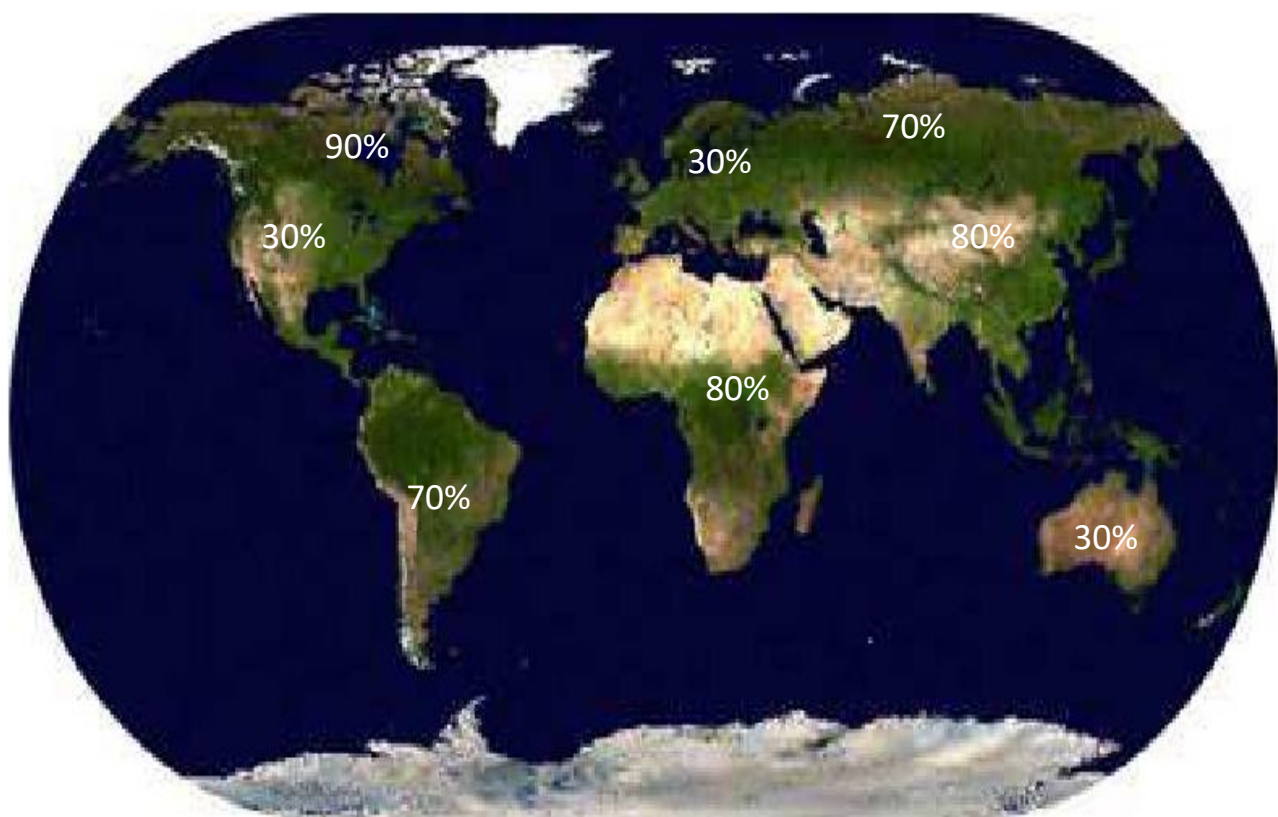


Figure 3: Prévalence de *H. pylori* dans le monde

(Source: Burucoa, 2012)

I- 4- Rappel de l'anatomie de l'estomac humain

Après l'infection, *H. pylori* se déplace jusqu'à la muqueuse gastrique à laquelle il est totalement inféodé. Il devient donc impératif de faire un rappel de la structure de l'estomac afin de montrer l'importance de la structuration de cet organe dans le mécanisme d'infection de la bactérie.

I-4-1- Structure de l'estomac

L'estomac est la portion du tube digestif en forme de poche, située entre l'œsophage et le duodénum. Chez l'adulte, il mesure 20 cm de long et se trouve en rapport avec le foie, la rate, le pancréas, le diaphragme et les intestins. L'estomac permet d'assurer une partie de la digestion par des fonctions mécaniques (brassage) et chimiques, et par mélange des aliments au suc gastrique. Le pH de l'estomac varie entre 1,5 et 5. Grâce à sa musculature, l'estomac malaxe les aliments et les transforme en substance semi-fluide constituée d'aliments partiellement digérés, d'eau, de diverses enzymes de digestion et d'acide chlorhydrique (HCl), le chyme. Celui-ci est éjecté dans le duodénum par relâchement du pylore. Le pylore a pour fonction essentielle la formation d'un réservoir assurant la continence gastrique.

L'estomac est constitué de plusieurs régions (**Figure 4**) qui se distinguent par une composition cellulaire et fonctionnelle différentes (**Helander, 1981**):

- le cardia: jonction entre l'œsophage et l'estomac
- le fundus ou grosse tubérosité: partie en forme de dôme faisant saillie au-dessus et à côté du Cardia.
- le corps: portion médiane de l'estomac
- l'antrum: portion terminale de l'estomac, terminée par le pylore qui régit l'évacuation gastrique via le muscle sphincter pylorique.

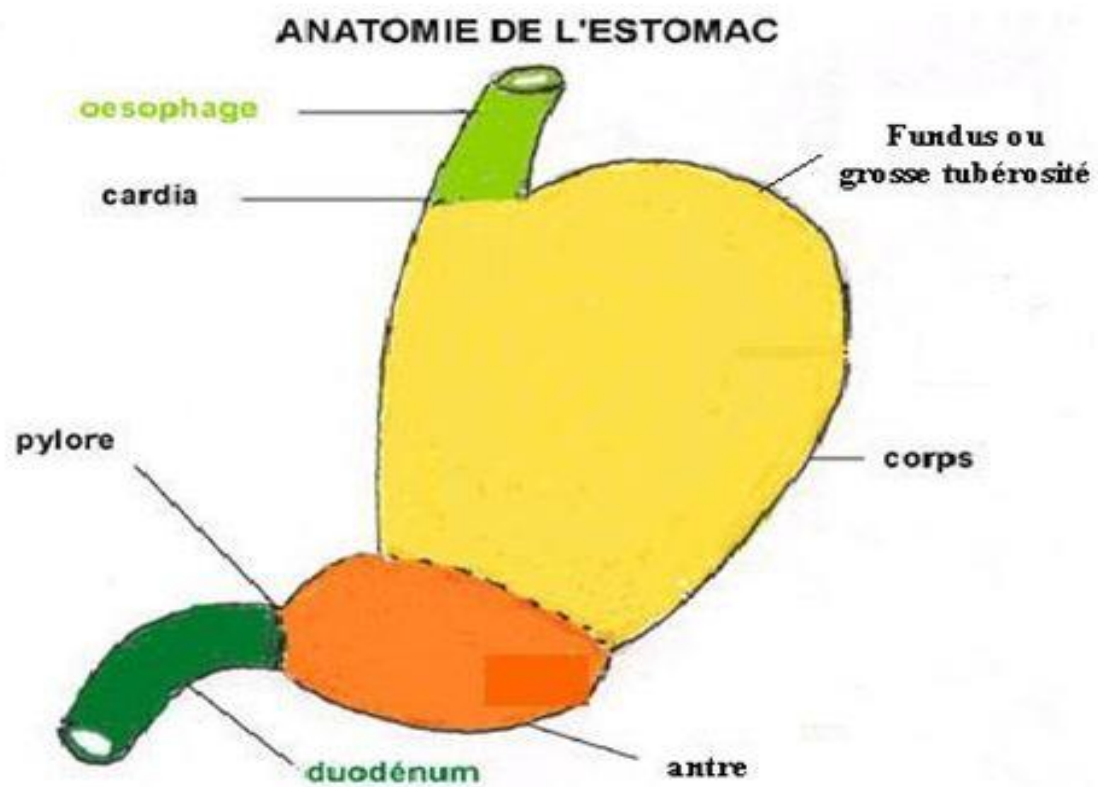


Figure 4: Schéma descriptif de l'anatomie de l'estomac humain

(Source: Helander, 1981)

I-4-2- Histologie de l'épithélium gastrique

Au plan histologique, la paroi interne de l'estomac est constituée de quatre couches concentriques caractéristiques de la majeure partie de tube digestif (**Figure 5**):

La muqueuse: en contact avec la lumière (ou cavité) gastrique, elle est formée d'une monocouche cellulaire ou épithélium gastrique qui s'invagine dans un tissu conjonctif appelé chorion et la lamina propria (composée de tissu conjonctif lâche) ainsi que d'une fine couche de muscle lisse la séparant de la sous-muqueuse. Les cellules de l'épithélium sont responsables de la sécrétion de suc gastrique (mucus).

La sous-muqueuse: tissu conjonctif fibreux et vascularisé assurant l'irrigation des cellules gastriques.

La musculieuse: tissu musculaire qui mélange et propulse les aliments dans l'estomac. La couche musculaire elle-même est constituée de 3 couches de fibres :

- La couche musculaire oblique interne est responsable du mouvement de brassage mécanique des aliments. Cette couche est spécifique à l'estomac et n'est présente dans aucun autre organe du système digestif. La paroi musculaire interne de l'antrum est plus épaisse que celle du fundus assurant des contractions plus forcées.
- La couche musculaire circulaire qui est également plus forte au niveau de l'antrum. Cette couche est concentrique à l'axe longitudinal de l'estomac.
- La couche musculaire longitudinale externe.

La séreuse: elle est composée de plusieurs couches de tissus conjonctifs en continuité avec le péritoine qui recouvre la totalité de la paroi externe l'estomac. Elle a un rôle protecteur.

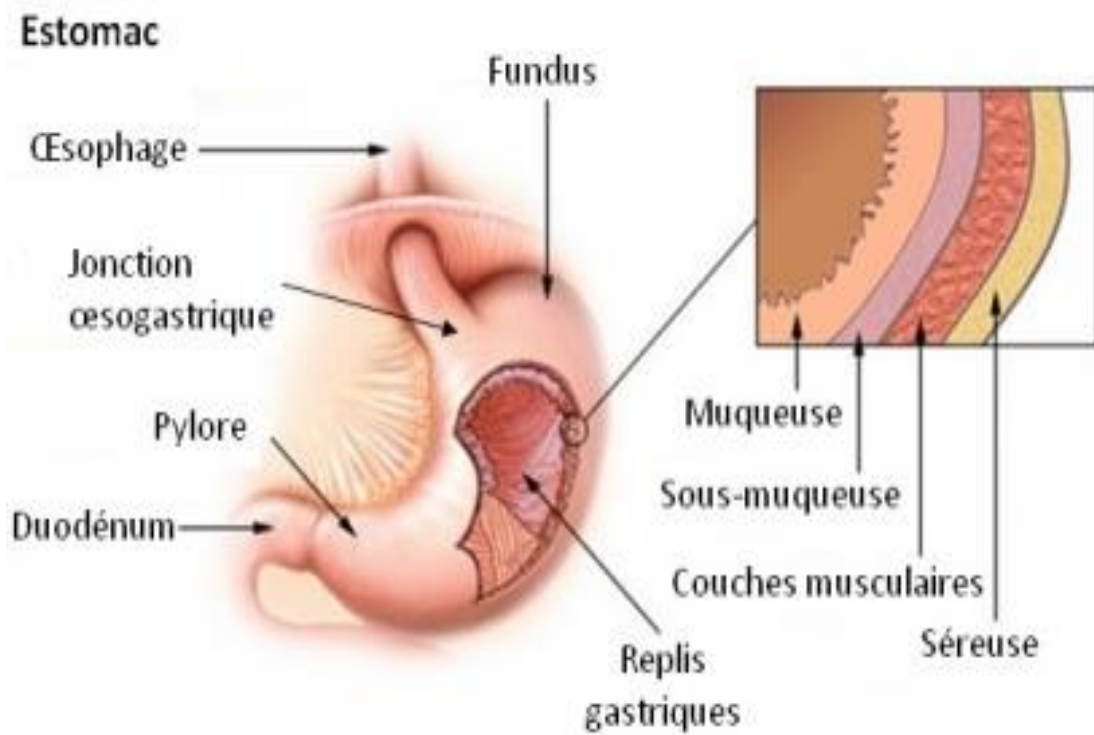


Figure 5: Schéma de l'histologie de l'estomac humain

(Source: Cours de Bactériologie médicale [Internet] [consulté le 12/07/2016])

<http://www.cnrchu.u-bordeaux2.fr>

I-5- Pouvoir pathogène

I-5-1- Facteurs de colonisation

H. pylori possède certaines propriétés qui favorisent son implantation sur la muqueuse gastrique. Ce sont :

➤ La grande mobilité et la morphologie spiralée.

H. pylori possède 4 à 6 flagelles unipolaires qui lui permettent, lors de la phase de contamination, d'abrèger son séjour dans le suc gastrique et de pénétrer la couche épaisse de mucus pour atteindre la surface de l'épithélium gastrique. La rotation des flagelles assure la propulsion de la bactérie à travers le mucus gastrique très visqueux lui conférant ainsi la capacité de se mouvoir facilement. Ces flagelles sont constitués de 2 protéines distinctes FlaA (sous unité majeure) et FlaB (sous unité mineure) recouvertes d'une gaine permettant une protection contre l'acidité gastrique (**Fauconnier, 2002**). La présence d'une forme tronquée de FlaA due à une mutation du gène *flaA* diminue *in vitro* la mobilité de *H. pylori* (**Josenhans et al., 1995**) *In vivo*, la présence de FlaA est indispensable pour la persistance de l'infection chez les rongeurs et porcelets gnotobiotiques (**Kavermann et al., 2003**) Contrairement à la flagelline des Salmonelles et autres pathogènes Gram- négatifs, FlaA de *H. pylori* possède une très faible capacité pour activer le Toll-like receptor 5 (TLR5), ce qui permet à *H. pylori* d'échapper à la réponse immunitaire et de persister dans la muqueuse gastrique (**Gewirtz et al., 2004; Andersen-Nissen et al., 2005**). La motilité de *H. pylori* est indispensable pour assurer une meilleure colonisation gastrique et contribue à la pathogenèse liée à la bactérie.

➤ La production d'uréase.

L'uréase est une métallo-enzyme présente dans la majorité des souches de *H. pylori*. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac permettant à la bactérie de résister à l'acidité gastrique (**Kuwahara et al., 2000**). L'uréase est un déterminant essentiel de la colonisation et de la persistance de la bactérie. Cette enzyme hydrolyse l'urée normalement présente dans l'estomac et libère de l'ammoniac. Il crée ainsi un microenvironnement tamponné qui le protège de l'acidité gastrique (qui sert à pré digérer les aliments, tout en tuant la plupart des bactéries). Malheureusement, l'ammoniac est toxique pour les cellules épithéliales, et va de concert avec d'autres produits sécrétés par *H. pylori* (protéases, catalases, phospholipases), endommager la surface des cellules épithéliales, enclenchant de ce fait le processus de formation d'ulcères (**Kuwahara et al., 2000**). Les gènes codant pour l'uréase sont organisés en deux opérons *ureAB* et *ure IIEFGH*. Le gène *ureAB* code pour les sous-unités structurales de l'enzyme et le gène *ure IIEFGH* code pour les protéines accessoires qui activent l'enzyme par incorporation des ions nickels

(Suerbaum et Achtman 1999) L'activité enzymatique de l'uréase dépend indirectement du gène ureI codant pour une porine membranaire qui forme un canal dont l'ouverture est contrôlée par le pH externe. Un pH acide induit l'ouverture du canal permettant le passage de l'urée hydrolysée par l'uréase dans le cytoplasme bactérien. L'augmentation du pH provoque la fermeture du pore et empêche le passage de l'urée (Weeks *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2002) Ainsi *H. pylori* peut atteindre les cellules de la muqueuse gastrique, là où le pH est voisin de la neutralité. L'inhibition de UreI pourrait être une cible pour l'éradication de *H. pylori* (Weeks *et al.*, 2000). Il faut noter que, les mutants de *H. pylori* à uréase négatif ne peuvent pas coloniser l'estomac (Lamouniatte *et al.*, 1992).

➤ Les propriétés d'adhérence.

L'adhérence est considérée comme une propriété indispensable à la multiplication et à la persistance de la bactérie au sein de la muqueuse. L'observation histologique de biopsies a montré que *H. pylori* est retrouvé majoritairement dans la couche du mucus, mais aussi à proximité de la surface des cellules épithéliales gastriques. La muqueuse colonisée présente un épithélium altéré, avec un effacement partiel des microvillosités à la surface apicale des cellules. La morphologie et les flagelles de *H. pylori* lui permettent de se déplacer dans le mucus et des adhésines (BabA, SabA) lui permettent d'adhérer aux cellules (Gerhard *et al.*, 1999) sur un récepteur cellulaire de nature glycolipidique ou autre. A ce jour, trois types d'adhésines ont été caractérisées génétiquement et biochimiquement.

- L'adhésine BabA2, impliquée dans l'interaction avec l'antigène de groupe sanguin Lewis exprimé à la surface de cellules gastriques.
- Les deux adhésines homologues AlpA et AlpB produites par tous les isolats de *H. pylori*, et permettant à cette bactérie d'interagir avec les tissus gastriques.
- L'adhésine SabA qui se lie à la structure sialylée de l'antigène Lewis exprimé à la surface des cellules épithéliales. Elle est associée au risque de développement de cancer gastrique mais pas au risque d'ulcère duodénal (Yamaoka *et al.*; 2006).

I-5-2- Pathogénicité

La diversité génétique permet à *H. pylori* d'adapter son génotype à celui de son hôte (Israel *et al.*, 2001; Giannakis *et al.*, 2008) et est probablement à l'origine de la variabilité de son pouvoir pathogène.

I-5-2-1-Facteurs de virulence majeurs

H. pylori colonise très efficacement la muqueuse grâce à sa motilité, son chimiotactisme, sa résistance à l'acidité gastrique et sa capacité d'adhésion aux cellules épithéliales. La persistance de l'infection par *H. pylori* est rendue possible par des stratégies d'échappement aux défenses immunitaires incluant des mécanismes enzymatiques, des capacités à faire varier les motifs antigéniques présents à sa surface et le relargage d'antigènes immuno-dominants servant de leurres aux anticorps (**Mustapha, 2011**). Les facteurs de virulence sont divisés en protéines pro-inflammatoires (dont la plus importante est codée par l'îlot de pathogénicité Cag), en cytotoxine vacuolisante et en lipopolysaccharide. Ces facteurs de pathogénicité vont expliquer la cascade de réactions inflammatoires locales à l'origine des lésions de gastrite aiguë et de gastrite chronique superficielle puis atrophique induite par *H. pylori*.

I-5-2-1-1-Îlot de pathogénicité Cag et ses constituants

L'îlot de pathogénicité cag (cag PAI) est un fragment d'ADN de 37 kb composé d'environ 29 gènes (**Covacci et al., 1999**). Cet îlot code un système de sécrétion de type IV (SSTIV) ainsi que des protéines de la famille Cag. Le SSTIV permet la translocation de la protéine CagA, du peptidoglycane (PG) ainsi que d'autres éléments à l'intérieur de la cellule épithéliale (**Asahi et al., 2000; Christie et Vogel, 2000; Covacci et Rappuoli, 2000; Odenbreit et al., 2000; Fischer et al., 2001**). Associé aux pathologies cliniques les plus sévères, cag PAI est un facteur de virulence déterminant de *H. pylori*. Les souches comportant cet îlot augmentent le risque de développement de gastrite atrophique et de cancer gastrique par rapport aux souches qui en sont naturellement dépourvues (**Parsonnet et al., 1997; Rudi et al., 1997; Torres et al., 1998**). L'îlot cag PAI code pour des protéines (Vir) qui possèdent des séquences similaires à celles de *Agrobacterium tumefaciens*. Ces protéines sont nécessaires pour l'induction de la sécrétion de l'interleukine 8 (IL-8) par les cellules épithéliales infectées par *H. pylori* (**Censini et al., 1996; Akopyants et al., 1998; Audibert et al., 2001**). L'ordre génétique dans cag PAI est en général conservé (**Fig. 6**) mais quelques variations de cet arrangement existent chez certaines populations. Des souches isolées chez des sujets amérindiens par exemple, possèdent une duplication du gène cagA (forme non fonctionnelle) et le cagB inséré entre cagP et cagQ (**Mane et al., 2010**). L'interaction d'une souche de *H. pylori* dont l'îlot Cag est pleinement fonctionnel avec une cellule gastrique humaine conduit successivement à

1) l'induction de la sécrétion d'interleukines IL8, IL10, IL12 par l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF-kappa B) (**Tummuru et al., 1995; Hida et al., 1999**).

- 2) La sécrétion et la translocation de la protéine CagA dans la cellule, puis sa phosphorylation sur les résidus de tyrosine.
- 3) Un réarrangement du cytosquelette des cellules en contact associé à la formation de structure à la forme de pédestales.
- 4) Une signalisation cellulaire associée à l'induction de facteurs transcriptionnels comme la protéine activatrice 1 (AP-1) (**Naumann *et al.*, 1999**).
- 5) l'expression de proto-oncogènes (**Meyer-Ter-Vehn *et al.*, 2000**).

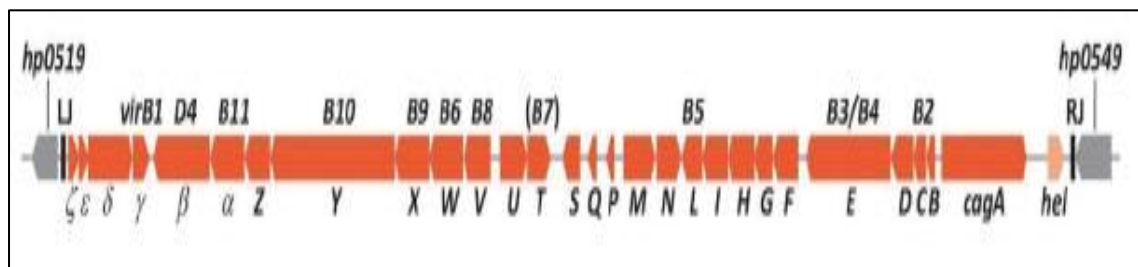


Figure 6: Arrangement génétique de l'îlot de pathogénicité *cag* de *H. pylori* 26695

(Source: Fischer, 2011)

➤ Le système de sécrétion de type IV (SSTIV)

Le SSTIV appartient à une famille de transporteurs responsables du transfert de diverses macromolécules (protéines, ADN, complexes protéiques) à travers la membrane cellulaire (**Chandran *et al.*, 2009; Fronzes *et al.*, 2009**). Le SSTIV possède une structure similaire à une seringue et permet l'injection ou la translocation de facteurs de virulence bactériens à l'intérieur de la cellule hôte (**Terradot et Zawilak-Pawlik, 2010**). L'appareil consiste en une douzaine de protéines (VirB 1-11 et VirD4) assemblées pour former 3 sous-parties interconnectées : un complexe cytoplasmique/intracellulaire, un canal couvrant la double membrane et un pilus externe (**Figure 7**). Les protéines constitutives du SSTIV peuvent former des complexes homo ou hétérotypiques (**Busler *et al.*, 2006; H. Wang *et al.*, 2012; Gopal *et al.*, 2015**) dont plusieurs sont indispensables au bon fonctionnement de la machinerie du système. Parmi les protéines essentielles pour la translocation de CagA et/ou l'induction de l'IL-8 au cours de l'infection, on peut citer les protéines Cag δ , CagZ, CagS et CagM (**Cendron *et al.*, 2011**).

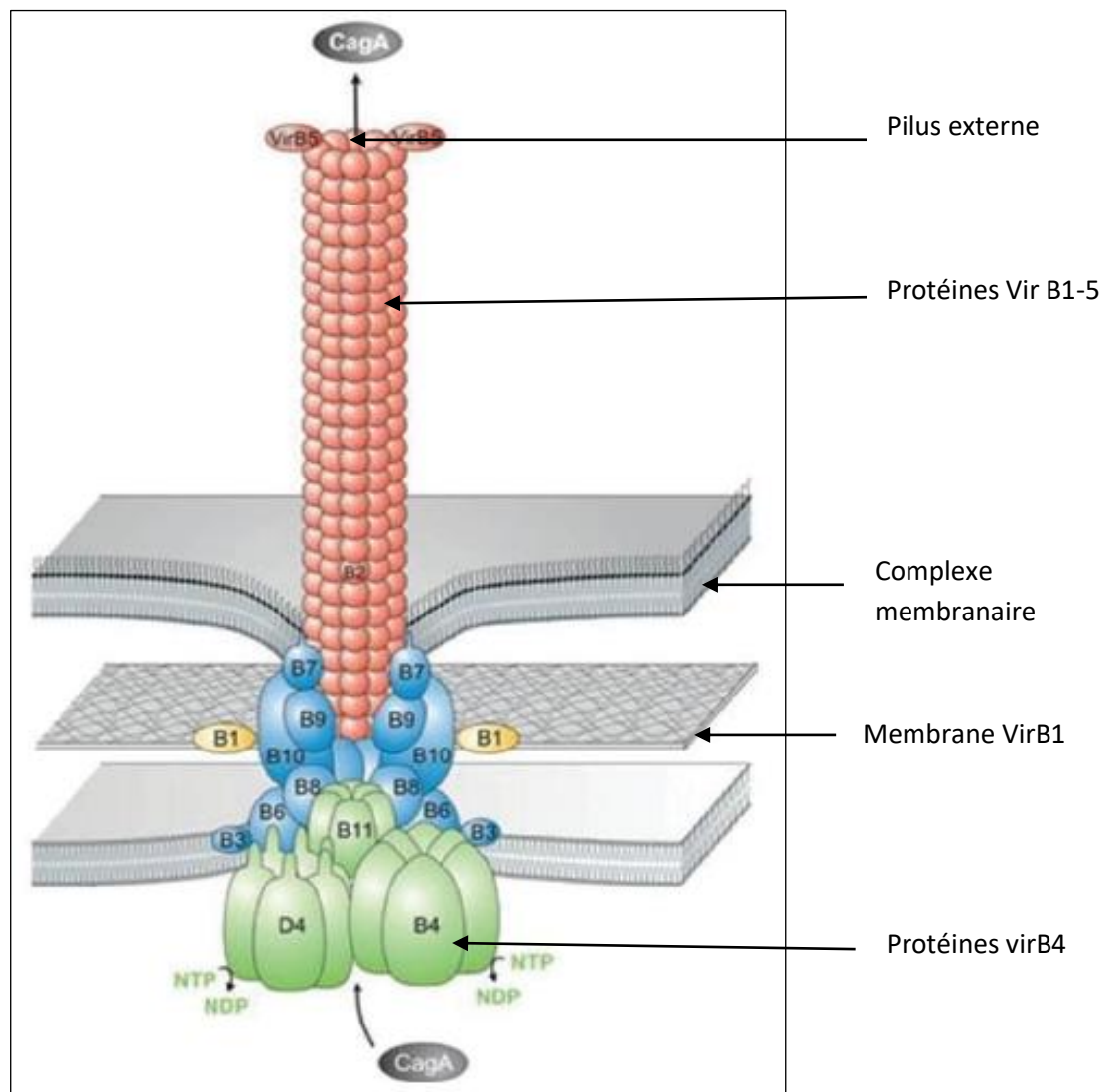


Figure 7: Architecture proposée du système de sécrétion de type IV de *H. pylori*

Le SSTIV permet la translocation de CagA et du peptidoglycane à l'intérieur de la cellule hôte

(Source: Terradot et Waksman, 2011)

➤ Protéine CagA

Les souches de *H. pylori* sont souvent classées en souches *cagA*⁺ ou *cagA*⁻, en fonction de la production ou non de la protéine bactérienne CagA codée par le gène *cagA* présent à l'extrémité de l'îlot Cag (Covacci *et al.*, 1993). Cette protéine de 120 à 240 kDa est injectée à l'intérieur de la cellule épithéliale par le SSTIV. Une fois injectée, elle est phosphorylée par les kinases de la famille Abl et Src au niveau de la tyrosine des motifs glutamate-proline-isoleucine-tyrosine-alanine (EPIYA) ce qui va entraîner des altérations morphologiques cellulaires nommés « becs de colibris » (Segal *et al.*, 1999; Asahi *et al.*, 2000; Odenbreit *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 2002). La protéine CagA phosphorylée interagit avec plusieurs effecteurs à l'intérieur de la cellule hôte. Son association avec la tyrosine phosphatase SHP-2 induit l'activation des "Extracellular Signalling regulating kinase" (ERK) 1 et 2 (Higashi *et al.* 2002)(Higashi *et al.*, 2002). Le taux de *cagA* phosphorylée est régulé négativement par sa propre interaction avec l'extrémité C-terminale de la kinase Src (Tsutsumi *et al.*, 2003; Higashi *et al.*, 2004). CagA perturbe également le cycle de la cellule épithéliale via l'activation du facteur de transcription AP-1 (Naumann *et al.*, 1999) qui est à l'origine de l'expression des proto-oncogènes tels que c-fos et c-jun (Meyer-ter-Vehn *et al.*, 2000). La protéine *cagA* non phosphorylée peut aussi avoir des effets pathogènes à l'intérieur de la cellule. Sa simple translocation entraîne l'activation aberrante de la β -caténine, des altérations au niveau des jonctions cellulaires apicales et une perte de polarité cellulaire (Bagnoli *et al.*, 2005; Franco *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005; Saadat *et al.*, 2007; Sougleri *et al.*, 2016).

I-5-2-1-2- Cytotoxine vacuolisante (VacA)

VacA est codée par le gène *vacA* présent chez toutes les souches de *H. pylori*. Cette protéine hautement immunogène induit *in vitro* une vacuolisation intracellulaire (Hotchin *et al.*, 2000) et est capable d'immunosuppression en bloquant l'activation des lymphocytes T; ce qui contribue à la persistance et à la longévité de l'infection (Boncristiano *et al.*, 2003; Gebert *et al.*, 2003; Sundrud *et al.*, 2004). La séquence de gène *vacA* présente du polymorphisme au niveau de deux régions, la région "centrale" (allèles m1 et m2) et la région codant la séquence "signal" (allèles s1 et s2). Les souches associant les allèles s1/m1 présentent une forte activité cytotoxique alors que celles de génotype s2/m2 n'ont pas d'activité cytotoxique (Cover et Blaser, 1992; Atherton *et al.*, 1995; Atherton *et al.*, 1997; Miehlik *et al.*, 2000; Rhead *et al.*, 2007). La protéine *vacA* altère la structure de la cellule épithéliale, agit sur le cycle cellulaire et joue un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire (Cover *et al.*, 2005). Elle peut s'accumuler au niveau de la membrane interne des mitochondries induisant une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial, une libération du cytochrome C, l'activation des capases 8 et 9 et l'induction de l'apoptose (Galmiche *et al.*, 2000; Cover *et al.*, 2003; Manente *et al.*, 2008).

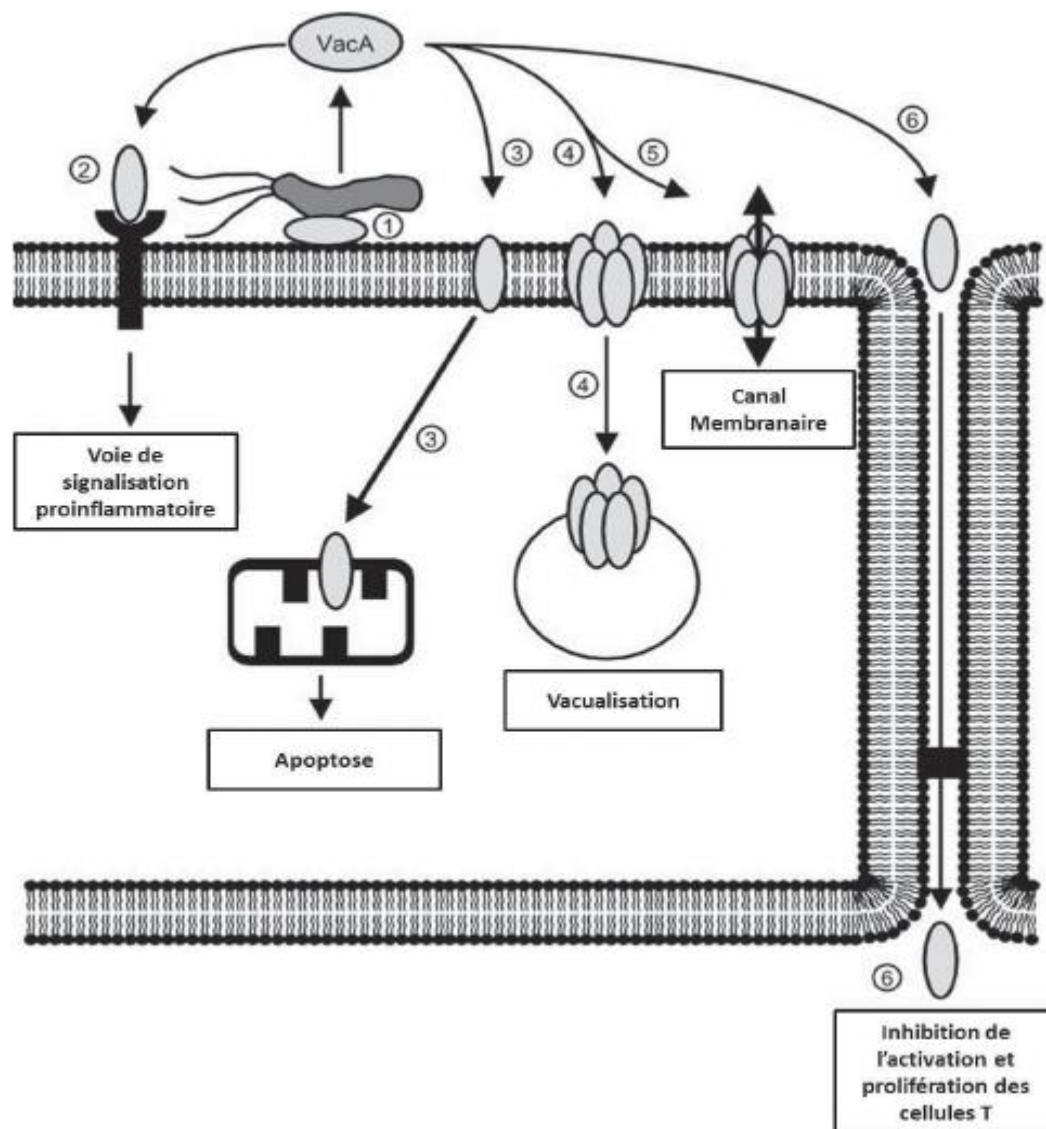


Figure 8: Différentes actions cellulaires de *vacA* au cours de l'infection chronique par *H. pylori*

(Source: Kusters, 2006)

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

I-5-2-1-3- Peptidoglycane (PG)

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. La translocation du PG de *H. pylori* à l'intérieur de la cellule épithéliale dépend de la présence chez la bactérie d'un SSTIV fonctionnel (Viala *et al.*, 2004). L'interaction du PG injecté avec la protéine intracellulaire motifs-reconnaissante Nod-1 (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1), détectrice spécifique du PG, induit l'activation d'une réponse inflammatoire Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) dépendante entraînant la sécrétion de l'IL-8 (Viala *et al.*, 2004) et de la β -défensine 2 (Grubman *et al.*, 2010).

I-5-2-1-4- Protéines de la membrane externe

L'oipA (Outer inflammatory protein)

La protéine OipA a été identifiée comme une protéine de la membrane externe capable d'induire la production d'IL8 sous sa forme fonctionnelle (Yamaoka *et al.*, 2004). Elle contribue également à l'induction de la métalloprotéase matricielle MMP-1(matrix metalloproteinase 1) fortement associée au cancer gastrique (Wu *et al.*, 2006) Ces observations confèrent à cette protéine des propriétés pro-inflammatoires.

Le dupA (Duodenal ulcer promoting gene)

Le gène dupA est situé dans la zone de plasticité du génome de *H. pylori* et semble être un marqueur de virulence. *In vitro*, DupA augmente la production d'IL-8 (Paredes-Osses *et al.*, 2017). L'association entre la présence de DupA et le risque élevé de développement d'ulcère duodénal et/ou cancer gastrique est très variable d'une population à l'autre (Wroblewski *et al.*, 2010).

I-5-2-1-5- Auto-immunité et lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS) de *H. pylori* a une faible activité biologique (activateur de la réponse immunitaire innée) comparée à celui des bacilles à Gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae (Muotiala *et al.*, 1992; Bliss *et al.*, 1998; Hynes *et al.*, 2004). La majorité des souches de *H. pylori* expriment le LPS qui contient des antigènes oligosaccharidiques fucosylés structuralement similaires aux antigènes du groupe sanguin humain. Ces antigènes bactériens (Lewis) présentent des variations antigéniques permettant à *H. pylori* d'échapper à la réponse immunitaire (Kusters *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2011).

I-5-2-2- Facteurs de persistance

Dès les premières étapes de l'infection, l'organisme infecté met en place une réponse humorale et cellulaire spécifique dirigée contre la bactérie. En dépit de cette réponse immunitaire, *H. pylori* est capable de persister et de se maintenir durant des décades. Trois enzymes permettent à *H. pylori* de résister au stress oxydatif généré par les cellules phagocytaires :

- la superoxyde dismutase qui décompose les ions superoxydes en peroxydes d'hydrogène et en oxygène (**Miller *et al.*, 1994**).
- la catalase qui dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. L'activité de la catalase semble être importante pour la survie de la bactérie au contact des cellules phagocytaires.
- l'alkylhydroxyperoxyde réductase qui intervient dans la résistance de *H. pylori* au stress oxydatif en dégradant également le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène dans le but d'éviter l'endommagement des biomolécules critiques.

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 immun dominants, tels que l'uréase et la catalase, pourrait saturer les anticorps locaux et rendre inefficace la réponse immunitaire locale.

I-5-2-3- Autres facteurs

La tipA (TNF alpha inducing protein A) codé par le gène Tip a été récemment décrite. Le rôle cancérigène de tipA a été montré dans plusieurs études de **Suganuma *et al.*, 2001, 2005, 2008, 2012**. En général, la protéine tipA se lierait à un récepteur: la nucléoline située à la surface des cellules des lignées cellulaires du cancer de l'estomac humain. Le complexe «nucléoline-tipA» est ensuite internalisé dans les cellules puis induit la progression tumorale du cancer gastrique (**Watanabe *et al.*, 2010**).

Tableau I: Principaux facteurs de virulence de *H. pylori* (Amir-Tidani, 2003)

Facteurs de virulence	Fonction	Présence dans toutes les souches :(+) oui, (-)non.
Facteurs de colonisation de la muqueuse gastrique		
Flagelles	• Mobilité	(+)
Uréase	• Résistante à l'acidité • Métabolisme azoté • Echappement à la réponse immunitaire • Effet cytotoxique (NH₃)	(+)
Bab A	• Adhérence aux antigènes Lewis b	(-)
Sab A	• Adhérence (se lie à un lipide particulier présent à la surface des cellules épithéliales)	(-)
Alp A, Alp B	• Adhérence (récepteurs non identifiés)	(+)
Facteurs d'inflammation et lésions cellulaires		
Cytotoxine vacuolisante Vac A	Cytotoxicité	(+)
Cag A	• Perturbation des voies de signalisation cellulaire • Modification de la morphologie épithéliale	(-)
Motifs antigéniques Lewis (x, y) (Lipopolysaccharides)	• Mimétisme moléculaire (échappement à la réponse immunitaire) • Adhérence	(-)
Oip A	• Activation des voies de signalisation pro-inflammatoires (libération d'IL-8) • Réorganisation du cytosquelette	(-)
NapA	• Recrutement de neutrophile et monocytes	(-)
Autres facteurs		
Catalase	• Détoxification (échappement à la réponse immunitaire)	(+)
Superoxyde-dismutase	• Détoxification (échappement à la réponse Immunitaire)	(+)
Tip	• Capacités de colonisation • Rôle carcinogène	(-)

I-5-3- Symptômes de l'infection à *H. pylori*

Les sujets infectés ont tous une réaction inflammatoire de la muqueuse (gastrite) et une réponse immunitaire humorale et cellulaire dirigée contre la bactérie. Un à 2% d'entre eux seulement présente suffisamment de symptômes pour consulter. Ce sont entre autres douleurs stomacales ou abdominales; reflux acide, régurgitation, vomissements; éructations; flatulences; nausées. L'éradication spontanée est rare et l'état inflammatoire persiste aussi longtemps que la bactérie est présente (souvent plusieurs décennies). L'infection peut être symptomatique ou asymptomatique (c'est-à-dire avec ou sans effets visibles). On estime que 70 % à 80 % des infections sont asymptomatiques (**Boyanova, 2011**).

I-5-4- Physiopathologie plurifactorielle

Le seul habitat de *H. pylori* est la muqueuse gastrique (**De Korwin et al., 2007; Mégraud 2010**). La bactérie a la particularité de fabriquer de grandes quantités d'uréase, nécessaire à la colonisation de la muqueuse gastrique. Cette enzyme hydrolyse l'urée diffusant de la paroi et permet la synthèse de l'ammoniac qui augmente le pH. *H. pylori* ainsi protégée par les ions H^+ , peut survivre dans l'estomac, à un pH inférieur à 2, là où la plupart des bactéries ne peuvent subsister (**Contreras et Labigne, 2003**). Une fois colonisée, la muqueuse est lésée par les facteurs de virulence de la bactérie et par la réponse inflammatoire qu'elle génère (**Pospai et al., 2007**). L'induction de cytokines par la muqueuse, l'activation des neutrophiles, la production locale des métabolites actifs de l'oxygène, les lésions épithéliales et la persistance de la bactérie dans la muqueuse conduisent à une infection chronique. Celle-ci se caractérise par l'infiltration des lymphocytes T et le développement d'une réponse humorale par l'immunoglobuline A et systémique par l'immunoglobuline G dirigée contre les protéines de *H. pylori*. L'infection se développe en surface, ce qui explique qu'elle échappe aux défenses de l'hôte. En effet, malgré la réponse humorale et cellulaire induite, l'infection devient chronique (**Pospai et al., 2007**). La physiopathologie est donc plurifactorielle et complexe. La colonisation par *H. pylori* entraîne une cascade de phénomènes inflammatoires aboutissant à l'ulcère.

Deux autres facteurs interviennent: la sécrétion acide et la colonisation de la muqueuse duodénale des îlots métaplasies gastriques (**Pospai et al., 2007**). La gastrite aiguë survient après une infection à *H. pylori*. Cette phase passe généralement inaperçue et évolue vers une phase chronique. Cette chronicité engendre principalement une modification de la sécrétion acide et de la physiologie gastrique. Cette dernière est associée à une augmentation de la prolifération cellulaire, ce qui explique le rôle primordial de *H. pylori* dans la carcinogénèse. L'évolution vers la maladie ulcéreuse gastroduodénale ou des métaplasies gastriques (10% des cas) est variable et

incomplètement élucidée. La majorité des patients ne présentera une conséquence délétère de cette gastrite chronique (De Korwin *et al.*, 2007).

I- 6- Pathologies liées à *H. pylori*

H. pylori provoque une gastrite aigue généralement asymptomatique au début de l'infection, qui évolue vers une gastrite chronique superficielle tout aussi asymptomatique. Cette gastrite chronique superficielle peut évoluer vers une gastrite chronique atrophique, point de départ de toutes les pathologies gastriques liées à *H. pylori* (dyspepsie non ulcéreuse, ulcère gastroduodénal et les cancers gastriques). Cette cascade symptomatique et pathologique de l'infection par *H. pylori* est résumée dans le schéma ci-dessous (**Figure 9**).

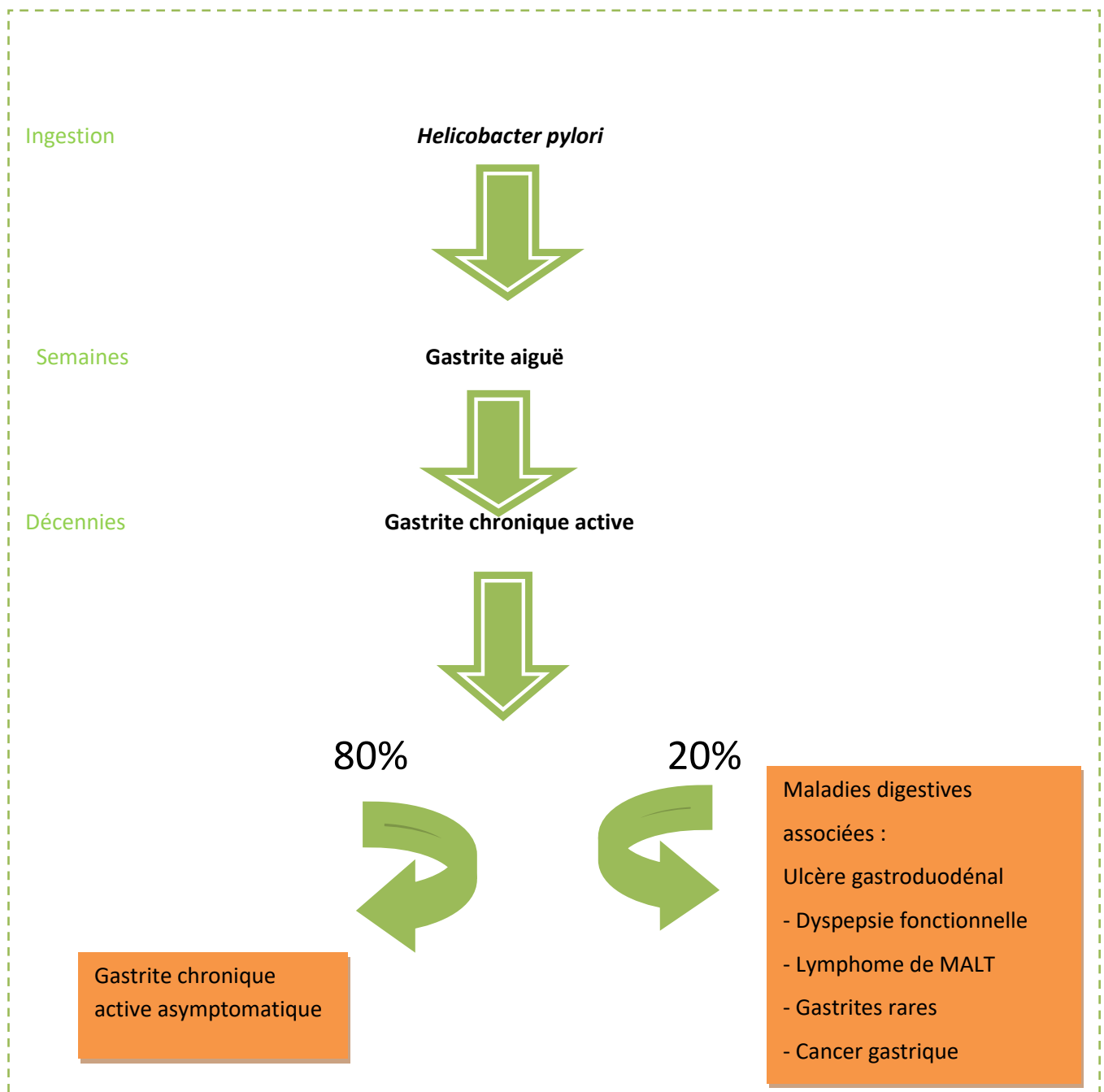


Figure 9: Schéma descriptif de l'infection par *H. pylori* et affections digestives associées

I-7- Déterminisme pathologique associé à *H. pylori*

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

1.7.1- Facteurs bactériens

Les facteurs de virulence bactériens jouent un rôle déterminant dans l'issue de l'infection et ceci est dû à la vaste hétérogénéité génétique présente chez *H. pylori*. Les polymorphismes génétiques touchant *vacA* et *cagA*, parmi d'autres, influent sur l'évolution clinique de la pathologie. Les souches associant les allèles *s1/m1* de *vacA* présentent une forte activité cytotoxique et sont associées aux lésions graves (Tee *et al.*, 1995). La présence de *cagA* est également associée au développement d'ulcère duodéal et d'adénocarcinome gastrique (Parsonnet *et al.*, 1997; Suriani *et al.*, 2008; Bommelaer et Stef, 2009).

I-7-2- Facteurs de l'hôte

Les facteurs de virulence bactériens ne sont pas les déterminants absolus de l'évolution de l'infection vers des stades pathologiques sévères. Les polymorphismes génétiques de l'hôte touchant les gènes impliqués dans la réponse inflammatoire sont associés à une prédisposition au cancer gastrique et sont aussi impliqués dans le déterminisme pathologique. Il semblerait en effet que le patrimoine génétique joue un rôle important dans l'infection à *H. pylori*. Ceci n'est pas encore bien élucidé. Dans une étude sérologique réalisée chez des jumeaux monozygotes et dizygotes suédois, l'infection était plus élevée dans le groupe des jumeaux monozygotes (81%) que dans celui des dizygotes (63%) (Malaty *et al.*, 1998). Le risque d'infection liée à cette prédisposition génétique pourrait passer par les antigènes de groupe sanguin qui modifieraient l'adhésion de la bactérie à la muqueuse gastrique (Boren *et al.*, 1993; Styer *et al.*, 2010)

I-7-3- Facteurs environnementaux

La consommation excessive de sel semble être associée à un risque plus élevé de développement de cancer gastrique (Wroblewski *et al.*, 2010; Peleteiro *et al.*, 2011; D'Elia *et al.*, 2014; Khatoon *et al.*, 2016) Des travaux effectués chez les gerbilles de Mongolie montrent un effet synergique entre un régime alimentaire riche en sel et le développement de lésions malignes et du cancer gastrique d'une part (Kato *et al.*, 2006; Gamboa-Dominguez *et al.*, 2007) et l'augmentation

de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6 et TNF- α d'autre part (**Sun *et al.*, 2006**). Les mécanismes via lesquels le sel augmenterait le risque de développement du cancer ne sont pas entièrement élucidés. Par ailleurs, des études récentes ont montrés une augmentation de l'expression de cagA en fonction de la concentration saline (**Loh *et al.*, 2007; Gancz *et al.*, 2008**).

Le tabagisme augmente aussi le risque de développement un cancer gastrique tandis que les antioxydants naturels joueraient au contraire un rôle protecteur (**Wroblewski *et al.*, 2010**). Aujourd'hui il est clairement établi que les effets combinatoires de plusieurs facteurs environnementaux tels la haute altitude (**Sharma *et al.*, 2014**) augmentent les risques de développement du cancer gastrique chez les sujets infectés par *H. pylori*. L'évolution vers le cancer gastrique est la conséquence d'une interaction complexe entre les facteurs bactériens, de l'hôte et environnementaux (**Figure 10**).

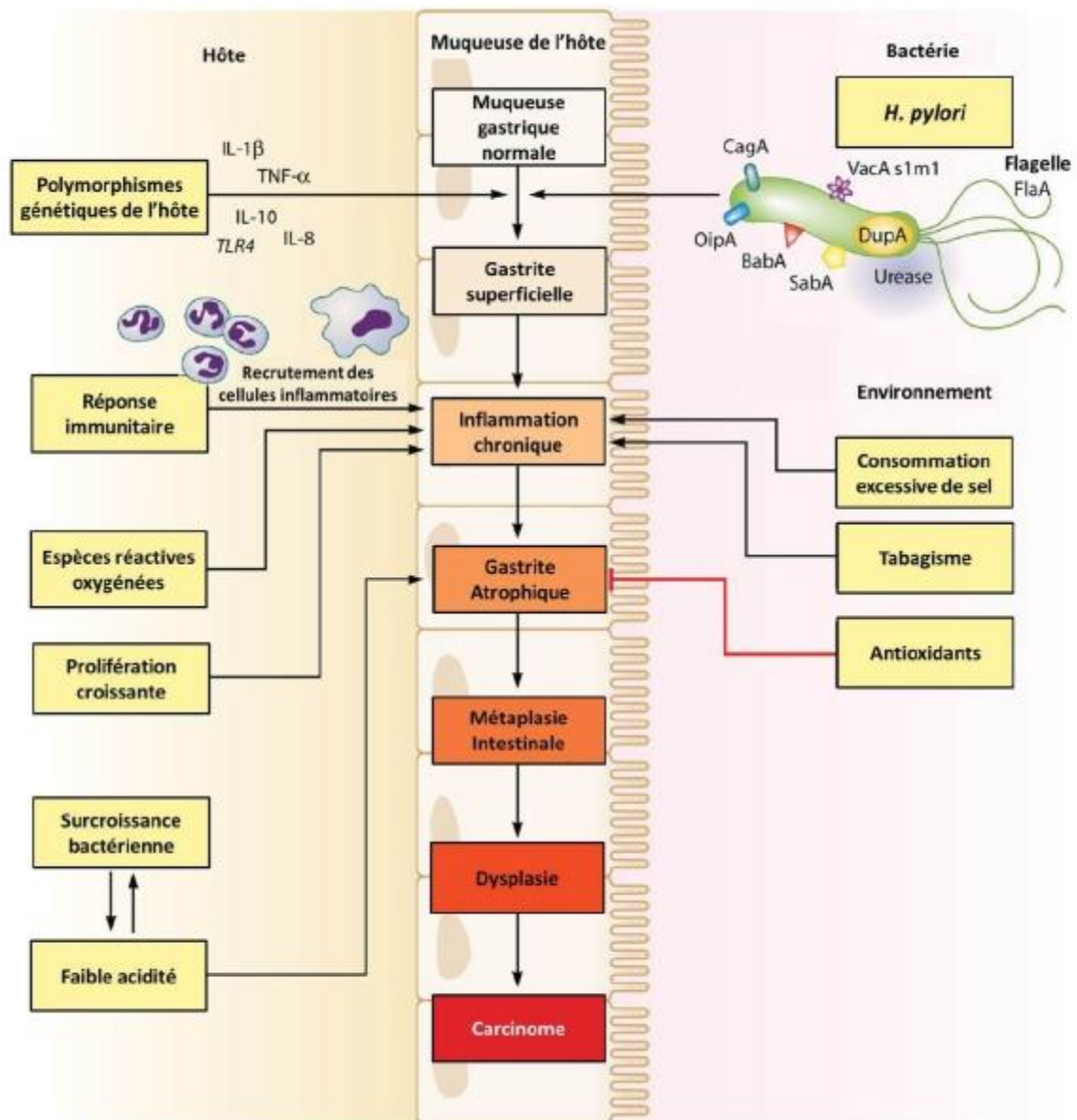


Figure 10: Déterminisme pathologique lié à *H. pylori*

(Source: Wroblewski *et al.*, 2010)

I-8- Resistance aux antibiotiques

I-8-1- Resistance naturelle

In vitro, *H. pylori* est sensible à la plupart des antibiotiques. Cependant, une résistance naturelle existe pour les glycopeptides, les sulfamides, les 2-4 diaminopyridines, les polymyxines, les quinolones de première génération et une β -lactamine: la cefsulodine (**Mégraud, 2000**).

I-8-2- Resistance acquise

Elle constitue un problème majeur dans le traitement de l'infection à *H. pylori*. Cette résistance est dite primaire quand elle est détectée avant le traitement. En fait, les mutants ont été sélectionnés par des traitements préalables en monothérapie pour d'autres infections: respiratoires pour les macrolides, parasitaires gynécologiques ou dentaires pour les nitroimidazolés. Ceci se comprend dans la mesure où l'infection à *H. pylori* persiste durant des dizaines d'années. Cette résistance peut être secondaire au traitement proposé pour éradiquer *H. pylori* (**Vakil, 2006; Raymond et al., 2010**). Pour les macrolides, il existe un gradient du nord au sud de l'Europe. Dans les pays scandinaves où les macrolides sont peu ou pas utilisés, les taux de résistance sont presque nuls. Ils sont de l'ordre de 5 à 10% en Angleterre et en Allemagne et montent à 10-15% dans les pays du sud (Espagne, France, Italie) ainsi que dans certains pays de l'est (**Raymond et al., 2010**). Les données existant pour les souches d'Afrique sont très limitées. En ce qui concerne le métronidazole, elles montrent un taux de résistance excessivement important, de l'ordre de 80-90% relié à la fréquence d'utilisation de cette substance dans les infections parasitaires, et ceci quelque soit l'endroit (**Seck et al., 2009; Kimang'a et al., 2010; Tanih et al., 2011**).

I-8-3- Mécanisme de résistance

Le mécanisme de la résistance aux macrolides est bien compris. Il s'agit d'un défaut de fixation de l'antibiotique sur son site d'action: le ribosome. Ce mécanisme est associé à la présence de mutations ponctuelles sur le gène de l'ARNr 23S. Ces mutations peuvent être détectées par amplification génique directement à partir d'une biopsie (**Marais et al., 1999**).

Pour ce qui concerne le mécanisme de la résistance aux nitroimidazolés, **Goodwin et al., (1998)** ont mis en évidence des mutations sur le gène d'une nitroréductase NADPH qui étaient associées à la résistance. Il n'est pas sûr que ce mécanisme explique tous les cas de résistance rencontrés. Un mécanisme de résistance par mutation ponctuelle a été mis en évidence pour les quinolones. Bien que toutes les souches soient à ce jour sensibles à l'amoxicilline, on assiste à l'apparition de souches à sensibilité diminuée dont le mécanisme, non encore déterminé, pourrait mettre en cause les protéines liant la pénicilline.

II- DIAGNOSTIC DE L'INFECTION A *HELICOBACTER PYLORI*

Le diagnostic n'a de sens qu'en vue de mettre en place un traitement d'éradication. Deux approches d'identification existent.

II-1- Méthodes directes ou invasives

Elle nécessite l'obtention de biopsies gastriques (au niveau de l'antrum et du fundus) lors d'une endoscopie. Elle a l'avantage d'associer les techniques diagnostiques les plus sensibles et les plus spécifiques à l'observation endoscopique qui permet d'identifier les lésions gastriques et d'évaluer leur étendue. Ce sont :

- l'anatomie pathologie
- le test rapide à l'urée
- la culture
- l'amplification génique

II-1-1- Anatomie pathologie

L'examen anatomo-pathologique est, en cas d'endoscopie, systématique pour détecter l'infection et évaluer les lésions (cancéreuses et précancéreuses: typage de la gastrite). L'observation de préparations histologiques de la muqueuse gastrique est en effet la méthode la plus utilisée (**De Korwin, 2013**). Acte courant du gastro-entérologue, le recueil des biopsies est effectué durant la gastroscopie. Cinq biopsies sont recommandées; deux antrales, une de l'angulus et deux fundiques (**Mégraud, 2010**). Elles sont fixées dans du formol. La coloration de Giemsa modifiée ou de crésyl violet facilite ensuite la reconnaissance de la bactérie au microscope. Sa sensibilité élevée en fait l'examen de référence pour le diagnostic invasif de l'infection. Le couple histologie-culture est le plus performant (**Fumat et al., 2011**).

II-1-2- Test rapide à l'uréase

Le test rapide à l'uréase (TRU) est considéré comme l'un des moyens diagnostiques de première ligne de l'infection à *H. pylori* chez les patients bénéficiant d'une endoscopie haute, et cela grâce à sa grande spécificité et sensibilité, à sa reproductibilité par rapport à l'étude histologique (**Peitz et al., 2004; Lee et al., 2015**). Ce test est basé sur la production abondante d'uréase par *H. pylori*. Une biopsie mise dans un milieu contenant de l'urée et qui fait virer le milieu du jaune au rose-violet, est signe de présence d'ammoniac qui a augmenté le pH. Ceci est caractéristique de la présence de *H. pylori* qui a hydrolysé l'urée. Ce test a l'avantage de pouvoir être pratiqué par le gastroentérologue dans la salle d'endoscopie aussitôt le prélèvement effectué. Il existe plusieurs tests commercialisés ayant une sensibilité et une spécificité excellente permettant

une lecture du résultat dans l'heure qui suit la réalisation du test (**Peitz *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2015**). Sa positivité est suffisante pour initier un traitement d'éradication. Sa négativité n'exclut pas une infection.

II-1-3- Culture

Seule méthode permettant de déterminer la sensibilité de *H. pylori* à tous les antibiotiques. Elle est recommandée chaque fois que possible et particulièrement après échec d'un traitement d'éradication. Deux biopsies de l'antrum et du fundus sont nécessaires. C'est la méthode qui présente une meilleure spécificité (100%) et une sensibilité de 70 à 90%. Elle est utile pour l'adaptation du traitement antibiotique.

II-1-4- Amplification génique

L'amplification génique par Polymerase Chain Reaction (PCR) est une technique très sensible et très spécifique, fondée sur la détection de l'ADN de *H. pylori* après amplification d'une séquence nucléotidique. Elle est réalisée à partir de biopsies gastriques, de liquide gastrique, voire de salive ou d'échantillon de selles. Une alternative à la culture est l'amplification génique de l'ADN de *H. pylori* qui détecte de faibles quantités de bactéries. L'intérêt de la méthode est de simplifier les conditions d'acheminement de la biopsie au laboratoire et d'offrir une sensibilité et une spécificité de plus de 90% (**Graham et Klein, 2000**). En cas de contrôle de l'efficacité ou non du traitement, le test est réalisé à distance d'un traitement d'éradication 15 jours minimum car la méthode détecte les fragments d'ADN des bactéries lysées ou pas après le traitement. Le développement d'une méthode de PCR en temps réel, réalisable sur les biopsies gastriques (**Oleastro *et al.*, 2003**) ou les selles (**Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2004**) permet de détecter une résistance à la clarithromycine (PCR en temps réel) et à la lévofloxacine (test HelicoDR)

II-2- Méthodes indirectes ou non invasives

Les méthodes indirectes ont l'avantage de ne pas nécessiter d'endoscopie et d'être des méthodes dites « globales », c'est-à-dire qui explorent la totalité de la muqueuse gastrique. Elles sont sensibles et spécifiques et permettent un suivi de l'infection. Cependant, elles ne permettent pas l'isolement des bactéries.

II-2-1- Test respiratoire à l'urée marquée ou analyse de l'air expiré

Cette méthode consiste à mettre en évidence l'activité uréasique de la bactérie en faisant ingérer au patient de l'urée marquée au ¹³C (isotope non radioactif), puis à détecter le CO₂ marqué dans l'air expiré. Le ¹³CO₂ doit alors être dosé par spectrométrie de masse. En présence de la

bactérie dans l'estomac, l'urée se scinde et libère le carbone 13 (ou 12) qui passe dans le sang puis les poumons et se retrouve dans l'air expiré. Ce test est fiable à plus de 98 % et présente l'avantage de rechercher la présence de la bactérie dans la totalité de l'estomac. Il présente les meilleures performances sous réserve d'être réalisé deux semaines après l'arrêt d'un traitement par anti sécrétoire gastrique et quatre semaines après les antibiotiques. Ce délai est particulièrement important à respecter après une tentative d'éradication.

II-2-2- Sérologie

La sérologie consiste à détecter les anticorps anti-*H. pylori* par des techniques de type ELISA ou Western Blot à partir de d'un prélèvement sanguin. Elle permet de définir des profils d'anticorps sériques avec la présence d'anticorps anti-CagA A (116 kD) et d'anticorps anti-VacA (89 kD). Elle trouve sa place non seulement dans les études épidémiologiques mais aussi dans le diagnostic dans certaines circonstances. C'est le seul test qui n'est pas influencé par un traitement préalable par les inhibiteurs de pompe à protons (IPP), contrairement aux autres dont une fenêtre thérapeutique d'au moins une semaine est nécessaire. De plus il existe des situations comme les hémorragies ulcéreuses, l'atrophie gastrique ou le lymphome gastrique du MALT pour lesquelles la sérologie s'avère la meilleure méthode (**Malfertheiner *et al.*, 2007**). Le sérodiagnostic est utile en dépistage mais a l'inconvénient de rester positif de nombreux mois après éradication de la bactérie, les anticorps étant toujours présents dans le sérum des patients.

II-2-3- Détection des antigènes bactériens dans les selles

Cette méthode récemment proposée, est un test ELISA qui consiste à rechercher les antigènes de *H. pylori* dans un échantillon de selles. Elle présente un intérêt indéniable. Chez des sujets dont l'infection était prouvée par fibroscopie/biopsie, le dosage immunologique des antigènes a révélé une sensibilité de 96% et une spécificité de 93%. Elle est indiquée dans le contrôle de l'éradication à condition de respecter un intervalle de 8 semaines après arrêt du traitement. Il est surtout très performant chez les enfants de tout âge : c'est la méthode non invasive de choix pour ce groupe de patients (**Amir Tidadini, 2003**). La recherche des anticorps anti-*H. pylori* dans la salive n'est pas encore passée dans la pratique courante mais pourrait être une méthode d'avenir car encore moins invasive que la recherche dans le sang. Plusieurs auteurs ont montré qu'il existait une bonne corrélation entre les IgG spécifiques sériques et salivaires.

III- PROTOCOLE THERAPEUTIQUE

III-1- Protocole d'éradication

Le traitement de l'infection à *H. pylori* inclut un inhibiteur puissant de l'acidité gastrique et deux antibiotiques parmi l'amoxicilline, la clarithromycine et le métronidazole pendant 7 jours. En première ligne, il est recommandé l'oméprazole (Inhibiteur des pompes (IPP)), l'amoxicilline et la clarithromycine. Cependant, ces recommandations de traitement de première ligne ont été révisées par rapport au niveau de résistance des antibiotiques observés (**Malfertheiner et al., 2012**). Ainsi, la trithérapie de 7 jours est proscrite, laissant place à des schémas thérapeutiques adaptés.

- 1ère ligne :
 - traitement orienté : trithérapie pendant 14 jours associant IPP et 2 antibiotiques parmi AML, MTZ et CLR selon le résultat de l'antibiogramme ou PCR
 - traitement probabiliste : quadrithérapie bismuthée (sel de bismuth+ métronidazole + tétracycline) pendant 10 jours ou quadrithérapie concomitante (IPP+AML+MTZ+CLR) pendant 14 jours
- 2ème ligne
 - traitement orienté : trithérapie pendant 14 jours ou quadrithérapie bismuthée pendant 10 jours
 - traitement probabiliste : quadrithérapie concomitante pendant 14 jours ou quadrithérapie bismuthée pendant 10 jours
- 3ème ligne
 - Recommandation de la Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP) et le Groupe d'Etude Français des Helicobacter (GEFH) (**Lamarque et al., 2017**).

En cas d'allergie aux lactamines, la quadrithérapie bismuthée est conseillée (**Burucoa, 2012**).

III-2- Mesures préventives

Les mesures d'hygiène collectives et individuelles rigoureuses, les précautions lors de la manipulation des endoscopes, l'amélioration des conditions de vie et du niveau socio-économique sont nécessaires à la lutte contre l'infection à *H. pylori*. L'incidence élevée de cette infection dans la population et les conséquences qu'elle implique, notamment le risque de développer un cancer de l'estomac, justifient la recherche soit d'un vaccin contre cette bactérie soit de nouvelles molécules capables de l'éradiquer tels les gènes de l'uréase dont les deux sous-unités, UreA et UreB administrées à des souris, ont permis de protéger 70% d'entre elles contre l'infection.

MATERIEL ET METHODES

I- MATERIEL

I-1- Matériel biologique

Le matériel biologique était constitué de biopsies gastriques qui sont des fragments de tissus de la muqueuse de l'estomac. Les biopsies ont été réalisées au niveau de l'antrum et du fundus chez chaque patient., l'antrum étant la partie inférieure de l'estomac et le fundus la partie supérieure (Cf schéma 4). Les biopsies ont été prélevées en salle d'endoscopie du Service de gastro-entérologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Cocody chez des patients adultes ambulatoires ou hospitalisés présentant des symptômes justifiant d'une endoscopie haute avec biopsie.

La souche 014F/IPCI02 a été utilisée comme témoin positif pour la PCR. Les séquences des souches de *H. pylori* 26695 et J99 ont été utilisées comme référence pour la comparaison des séquences des gènes de résistance aux antibiotiques .

I-2- Lieux d'étude

Cette étude a été menée sur les sites suivants :

- Service de gastro-entérologie du CHU de Cocody
- Département de Bactériologie-Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (site de Cocody)
- Plateforme de Biologie Moléculaire de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (site d'Adiopodoumé)

I-3- Matériel technique

I-3-1- Collecte des échantillons

La collecte des échantillons a été réalisée à l'aide d'une fiche d'enquête pour le recueil des données sociodémographiques (âge, sexe, profession, lieu de résidence), des résultats cliniques, des antécédents médicaux et familiaux (Cf. annexe).

I-3-2- Prélèvement et transport des échantillons

Les appareils utilisés pour la fibroscopies étaient les gastroscopes vidéo (**OLYMPUS GIF V70, Tokyo, Japon; GIF PQ20, Ronkonkoma, NY,USA**). Le xylocaïne gel a été utilisé comme anesthésie de l'oropharynx .

Des flacons stériles contenant 0,5-1 mL de sérum physiologique stérile, une glacière contenant des accumulateurs de froid à -4°C ont été utilisés pour le transport des échantillons dans un délai de moins de 4 heures.

I-3-3- Test rapide à l'uréase

Une pipette Pasteur, un tube permettant d'apprécier le virage et le milieu liquide Urée-Indole (BioRad®) ont été nécessaires pour la réalisation du test rapide à l'uréase.

I-3-4- Isolement et identification de *H. pylori* à partir de biopsies gastriques

Des broyeurs Potter, des boîtes de Pétri (90 mm de diamètre), des anses à usage unique, des jarres, des générateurs d'atmosphère micro aérophile **GENbox BioMérieux®, Marcy l'Etoile, France** (Concentration en oxygène : de 6,2 à 13,2% après une heure ; Concentration en dioxyde de Carbone: de 2,5 à 9,5% après 24 h) étaient nécessaires pour la culture de *H. pylori*.

Les milieux de culture que sont: la gélose Columbia (CM0331B; Oxoid, Basingstoke,UK) avec 7% de sang frais de cheval (SR0048; Oxoid) et un flacon de supplément *H. pylori* (SR0147E; Oxoid) et la gélose Columbia avec 7% de sang frais de mouton et un flacon de supplément *H. pylori* (SR0147E; Oxoid) ont été utilisés pour l'isolement. Le "*Helicobacter pylori* Selective Supplement" (SR0147E; Oxoid) était constitué de Vancomycine (5,0 mg), Cefsulodine (2,5 mg), Trimethoprim (2,5 mg) et Amphotéricine B (2,5 mg). Un incubateur à 37°C était nécessaire pour l'incubation des milieux ensemencés. Les disques d'oxydase, le milieu liquide Urée-Indole et l'eau oxygénée commercialisée ont été utilisés pour l'identification de *H. pylori*.

I-3-5- Détection des facteurs de la virulence et de l'antibiorésistance par PCR

I-3-5-1- Matériel d'extraction de l'ADN de *H. pylori*

Le matériel d'extraction de l'ADN de *H. pylori* était composé de réactifs tels que la Protéinase K, l'éthanol, l'acétone, le mélange Phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1,V/V/V), les solutions tampons (Tampon 1: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM pH 8,0, protéinase K 1 mg/ml; Tampon 2 : Tris 20mM, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, SDS 1% et Protéinase K 100µg/ml) et l'eau de qualité Biologie Moléculaire filtré stérilement ont été nécessaires pour réaliser les extractions d'ADN. De plus, une hotte (Hotte Faster Two 30, Italie), une centrifugeuse, un vortex et un bloc chauffant (**Thermomixer compact Eppendorf®, Hamburg Germany**) ont été utilisés comme appareillage. La verrerie d'usage dans la salle d'extraction était constituée de tubes Falcon, de microtubes Eppendorf, de micropipettes et d'embouts à usage unique.

I-3-5-2- Matériel d'amplification génique

Le matériel d'amplification génique était composé du kit d'amplification constitué d'eau de qualité Biologie Moléculaire filtré stérilement (**Eurobio®, Les Ulis, France**), de tampon 5X incolore, tampon 5X coloré, MgCl₂ 25 mM, dNTPs 10mM et GoTaq DNA polymérase 5U/µl

(Promega®, Madison, WI, USA) a servi pour l'amplification génique des échantillons. Les séquences oligonucléotidiques utilisés sont reportés dans les tableaux II et III. L'amplification a été réalisé dans un thermocycleur automate (**ABI 9700 96 Well PCR, Applied Biosystems GeneAmp, Hawthorne, NY, USA**). Le gel d'agarose (**Invitrogen®,USA**) préparé dans du tampon Tris Borate EDTA 1X (TBE) et contenant du Borate d'éthidium (BET) a permis la migration des produits d'amplification en présence de marqueur de poids moléculaire (**Bio-Rad®, USA**). La visualisation des bandes de migration s'est faite par un GelDoc™ XR System (**Bio-Rad® Laboratories, Hertfordshire, UK**). La verrerie était constituée de Erlen meyer, microtubes Eppendorf, de micropipettes et d'embouts à usage unique. Une balance de précision (**BEL Engineering, UK**), un four à micro onde (**Cookworks, USA**) et une cuve à migration ont également été utilisés.

Tableau II: Amorces pour l'amplification des gènes associés à la résistance aux antibiotiques

Gènes	Taille (pb)	Amorces	(séquences 5' - 3')	Références
<i>rdxA</i>	749	RDX1 RDX4	5'-GCCACTCCTTGAACCTTAATTTAGG-3' 5'-CGTTAGGGATTTTATTGTATGCTAC-3'	Marais <i>et al.</i> , 2003
<i>frxA</i>	913	FRXA1 FRXA4	5'-CGAATTGGATATGGCAGCCG-3' 5'-TATGTGCATATCCCCTGTAGG-3'	
23S <i>rRNA</i>	280	CLA1995F CLA2247R	5'-GTAACATAACGGTCCTAAG-3' 5'-GAAACATCAAGGGTGGTATC-3'	Ribeiro <i>et al.</i> , 2003
<i>pbp1</i>	953	PBP1F PBP1R	5'-CACGAGCACCGGTAAGATTT-3' 5'-CGCTATCGTCTGTTCTTTTGGG-3'	Nishizawa <i>et al.</i> , 2011

Tableau III: Amorces pour l'amplification des gènes associés à la virulence

Région	Amorces	séquences	taille (pb)	références
<i>CagA</i>	F1 B1	5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG-3' 5'-CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA-3'	349	Matsunari <i>et al.</i> , 2012
	D008 R008	5'-ATAATGCTAAATTAGACAACTTGAGCG-3' 5'-TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCA-3'	298	
<i>VacA</i> <i>Slr</i>	SS1-F VA1-R	5'-GTCAGCATCACACCGCAAC-3' 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'	190	Atherton <i>et al.</i> , 1995
<i>S</i>	SIGF SIGR	5'-ATGGAAATACAACAAACACACCG-3' 5'-CAACCTCCATCAATCTTACTGGA-3'	338	Van Doorn <i>et al.</i> , 1998
<i>m1a</i>	VA3-F VA3.1R	5'-GGGTCAAAATGCGGTCATGG-3' 5'-CTGTAGTGCCCGCAGAAAC-3'	290	Atherton <i>et al.</i> , 1995
<i>M</i>	VA6-F VA5-R	5'-TCAATATCAACAAGCTC-3' 5'-CCGCATGCTTTAATGTC-3'	787	Atherton <i>et al.</i> , 1995
<i>OipA</i>	HPO638F HPO638R	5'-GTTTTTGATGCATGGGATT-3' 5'-GTGCATCTCTTATGGCTT-3'	401	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
<i>TipA</i>	HP0596F HP0596R	5'-AGAGCATATGCTGCAGGCTTGCACTTGCCC-3' 5'-TCTCGGATCCTACATGGCTATAGGGACTTT-3'	519	Suganuma <i>et al.</i> , 2005

I-3-6- Séquençage

Le matériel utilisés pour le séquençage était constitué de tubes Eppendorf 1,5 mL, les amorces Foward (RDX1, FRXA1, cla1995F et pbp1F) (Tableau II) et les amplicons de PCR. Le kit de purification PCR QIAquick (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) et le spectrophotomètre NanoDrop Lite (Thermo Fischer Scientific, Madison, WI, USA) ont également été utilisés.

I-3-7- Conservation des biopsies

Le matériel utilisé pour la conservation des biopsies à -80°C était constitué de cryotubes. Cette conservation a été faite au centre de ressources biologiques (bio banque) de l'institut Pasteur de Côte d'Ivoire site d'Adiopodoumé.

I-4- Ethique

Cette étude a été validée par le comité éthique institutionnelle. Tous les patients étaient soumis à un questionnaire relatif aux données sociodémographiques (âge, sexe, profession, lieu de résidence) et aux antécédents médicaux. Une lettre d'information du patient était approuvée et un consentement éclairé était donné par chaque patient avant le prélèvement.

II- METHODES

II-1- Echantillonnage

II-1-1- Cadre de l'étude

Les biopsies ont été prélevées en salle d'endoscopie du Service de gastro-entérologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Cocody puis acheminés au laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (site de Cocody) précisément à l'Unité des Antibiotiques et de la Surveillance des Résistances des Microorganismes aux Anti Infectieux (ASSURMI) pour l'étude bactériologique. La détection des gènes a été réalisée à la plateforme de Biologie Moléculaire de l'Institut Pasteur d'Ivoire (site d'Adiopodoumé) et le séquençage à Eurofins, MWG/ opéron (Cochin, France).

II-1-2- Prélèvement et transport des échantillons

Les prélèvements ont été réalisés dans les services de gastro-entérologie après admission du patient en salle d'endoscopie. Après un interrogatoire et l'obtention du consentement éclairé des patients, les biopsies ont été prélevées à l'aide d'une pince endoscopique réutilisable après désinfection selon la procédure de la Société Nationale Française de Gastroentérologie (SNFGE). Les échantillons ont été immédiatement mis dans les flacons contenant 0,5ml du sérum

physiologique stérile. Les flacons ont été étiquetés et acheminés rapidement au laboratoire de Bactériologie-virologie de l'Institut Pasteur de Cote d'Ivoire (site de Cocody) dans une glacière contenant des accumulateurs de froid à environ -4°C dans un délai de 4h maximum. Par la suite, les biopsies ont été transférées à l'aide de pipettes de transfert stériles à usage unique dans des croutes stériles secs et conservées à -80°C.

II-1-3- Critères de collecte des échantillons

- Critères d'inclusion: les biopsies des patients adultes ambulatoires ou hospitalisés justifiant d'une endoscopie haute avec biopsie ont été collectés.
- Critères de non inclusion: les biopsies des patients n'ayant pas donné leur consentement pour participer à l'étude, présentant une hémorragie digestive, avec des signes d'hypertension portale et les femmes enceintes n'étaient pas pris en compte dans l'étude.

II-1-4- Détermination de la taille minimale d'échantillons

Au seuil alpha de significativité de 5%, avec une puissance statistique de 95%, la prévalence attendue de *H. pylori* dans les biopsies gastriques selon les données histologiques est de 75% (**Attia et al., 2001**). L'effectif minimum nécessaire pour assurer l'exploitation des données épidémiologiques est de:

Calcul de l'effectif (n): $n = \varepsilon^2 p (1-p)/i^2$

p = prévalence attendue = 75%

ε = risque de première espèce = 1,96

i = précision attendue = 5%

$n = 3,8416 \times 0,75 \times 0,25 / (0,05)^2 = 289$

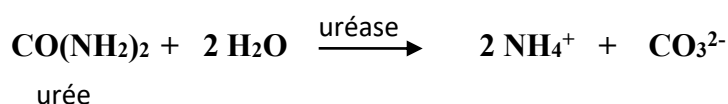
Nombre d'échantillons à inclure dans l'étude: **289**

Cette étude a inclus au total, 1352 échantillons à raison de huit (8) biopsies dont quatre (4) au niveau de l'antrum et quatre (4) au niveau du fundus par patient pour 169 patients inclus.

II-2- Test rapide à l'uréase

Principe : En présence d'une uréase bactérienne, l'urée est hydrolysée en ammoniac et CO_3^{2-} . La réaction s'accompagne de l'alcalinisation du milieu et du virage de l'indicateur de pH. Au bout de quelques minutes, le milieu passe du jaune-orangé au rose fuchsia.

L'uréase dégrade l'urée selon la réaction suivante :



Les ions NH_4^+ hydrolysés en NH_3 (ammoniac) vont entraîner une forte alcalinisation du milieu qui sera révélée par un virage de l'indicateur de pH (le rouge de phénol) à sa teinte basique (rose fushia).

Réalisation du test : un fragment de biopsie fraîchement prélevée est déposé dans un tube de 1,5 mL contenant 0,5 ml de milieu Urée-Indole dans l'heure qui suivait le prélèvement. Le test était positif lorsque le milieu Urée-Indole dans lequel était plongé la biopsie passait dans un délai 30 min à 1 heure, de la coloration jaune-orangé à la coloration rose fuchsia indiquant une activité uréasique. Il était donc négatif lorsque le milieu ne changeait pas de coloration au bout d'une heure. Les biopsies dont le test rapide à l'uréase était positif ont été retenues pour la recherche des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques. Notons que, lorsque l'antré et le fundus avaient leur test rapide à l'uréase positif, seul l'antré était utilisé pour la biologie moléculaire. Dans le cas où seul un des prélèvements avait le test positif, seul ce prélèvement était utilisé pour la biologie moléculaire.

II-3- Isolement et identification de *H. pylori*

Ensemencement : une biopsie a été décongelée sur de la glace pilée pendant 15min, transférée dans un tube Eppendorf de 1,5 mL contenant 0,3 mL de bouillon viande-foie stérile puis broyée à l'aide d'un broyeur Potter stérilisé. Le broyat obtenu a été inoculé à deux milieux coulés en boîte de Pétri ronde 90 mm de diamètre: la gélose Columbia contenant 7% de sang de cheval additionnée de supplément *H. pylori* et la gélose Columbia contenant 7% de sang de mouton additionnée supplément *H. pylori*.

Les milieux ensemencés sont ensuite été introduits dans des sachets avec générateur de gaz pour micro aérobiose puis dans une jarre pour incubation.

Incubation: Les jarres contenant les milieux ensemencés ont été incubées à 37°C pendant 14 jours. Le générateur de gaz pour micro aérobiose était renouvelé après 7 jours d'incubation pour éviter la saturation en oxygène de la culture.

Lecture: Après 14 jours d'incubation, les jarres étaient retirées de l'incubateur, les colonies de *H. pylori* isolées étaient repérées selon leur aspect très fin, translucide, non pigmenté et disposées en nappes brillantes non hémolytiques.

Identification: Les colonies bactériennes suspectes ont été soumises aux tests à l'uréase, à l'oxydase et à la catalase pour identification.

II-4- Détection des gènes de virulence et d'antibiorésistance

II-4-1- Extraction de l'ADN de *H. pylori* à partir des biopsies gastriques

Broyage des biopsies: Une biopsie a été décongelée à température ambiante pendant 15 min, transférée dans un tube Eppendorf stérile contenant 0,3 mL de de tampon PBS 1X puis broyée à l'aide d'un broyeur Potter de façon mécanique de sorte à obtenir un broyat homogène.

Pré traitement des biopsies: L'extraction de l'ADN de *H. pylori* s'est faite selon le protocole d'extraction d'ADN du kit NucliSENS® easyMAG® bioMérieux (Marcy-Étoile France) avec quelques modifications. Les broyats de biopsies ont été mis en suspension dans 500 µL de tampon contenant du Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM pH 8,0, protéinase K 1 mg/mL et incubés à 60°C pendant 24h.

Extraction de l'ADN: Après 24h d'incubation, L'ADN a été extrait avec 500 µL de tampon de lyse contenant du Tris 20mM, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, SDS 1% et Protéinase K 100 µg/mL pendant 1h à 60°C. Un millilitre (1mL) du mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) a été ajouté et le mélange a été passé au vortex pendant 30 s puis centrifugé à 13000 trs/min pendant 15 min. Le surnageant (la phase aqueuse) a été recueillie et le volume noté. Un volume d'Acétate de sodium 3M correspondant au dixième du volume du surnageant recueilli a été ajouté ainsi que 500 µL d'éthanol 100% glacé (absolu). Le mélange a été incubé à -80°C pendant une heure. Après centrifugation à 13000 tours/min pendant 10 min, le culot obtenu a été lavé avec 500µL d'éthanol glacé à 70%. Après centrifugation à 13000 tours/min pendant 5 min, le surnageant a été éliminé et le culot séché à 65°C pendant 15 min. Le pellet obtenu a été resuspendu dans 60 µl de tampon d'élution 10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 7.5 et l'ADN extrait a été conservé à -20°C (Figure11).

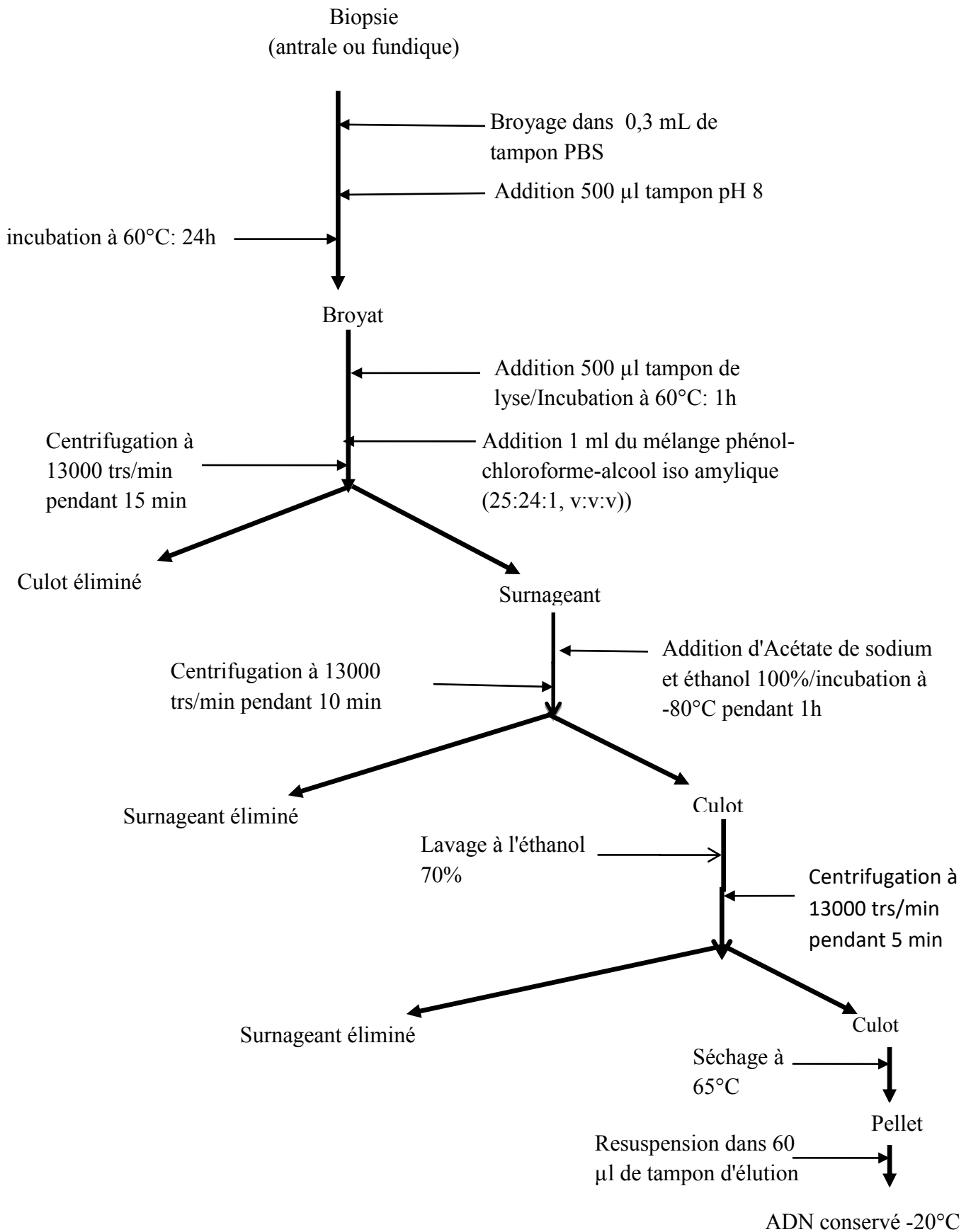


Figure 11: Schéma synoptique de l'extraction de l'ADN à partir de la biopsie

II-4-2- Amplification des gènes de virulence

L'amplification des gènes de virulence a été effectuée par PCR dans un milieu réactionnel de 50µL de volume. Il était constitué de 0,75µL de chaque amorce à 10 mM, 3µL d'ADN génomique, 1µL de dNTPs à 10 mM, 3µL de MgCl₂ 25 mM, 5µL de chaque tampon coloré et incolore 5X, et 0,3µL de Taq polymérase (Promega^(R), **Madison, WI, USA**). L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur automate (**ABI 9700 96 Well PCR, Applied Biosystems GeneAmp, Hawthorne, NY, USA**). Les gènes *cagA* et *vacA* ont été amplifiés dans les conditions suivantes: une étape de dénaturation initiale de 94°C pendant 5min, le programme était de 35 cycles constitués d'une étape de dénaturation de 94°C:1min d'une étape d'hybridation de 52°C:1min et d'une étape d'élongation de 72°C:1min par cycle d'amplification. Une phase d'élongation finale de 72°C pendant 7min terminait le programme. Pour les gènes *oipA* et *tipA*, après un étape de dénaturation initiale de 94°C pendant 5 min, le programme était également de 35 cycles constitués d'une étape de dénaturation de 94°C:1min d'une étape d'hybridation de 56°C:1min et d'une étape d'élongation de 72°C:1min par cycle d'amplification. Une étape d'élongation finale de 72°C pendant 7 min terminait également le programme.

II-4-3- Amplification des gènes associés à la résistance aux antibiotiques

La PCR a été réalisé tel que décrite par **Rasheed et al. (2014)** avec quelques modifications. Le mélange réactionnel était d'un volume de 50µL contenant 0,75µL de chaque amorce à 10 mM, 3µL d'ADN génomique, 1µL de dNTPs à 10 mM, 3µL de MgCl₂ 25 mM, 5µL de chaque tampon coloré et incolore 5X, et 0,3µL de Taq polymérase (Promega^(R), **USA**). L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur automate (**ABI 9700 96 Well PCR, Applied Biosystems GeneAmp, Hawthorne, NY, USA**). Les conditions de réalisation de la PCR pour la détection des gènes de résistance aux antibiotiques sont résumées dans le tableau IV.

Tableau IV: Conditions de réalisation des PCR pour la détection des gènes de résistance de *H. pylori*

Gènes	Taille (pb)	Amorces (séquences 5' - 3')	Conditions d'amplification (*)	Références
<i>rdxA</i>	749	RDX1-GCCACTCCTTGAACTTTAATTTAGG RDX4-CGTTAGGGATTTTATTGTATGCTAC	95°C: 1 min, 60°C: 1 min: 30 sec, 72°C: 1min	Marais <i>et al.</i> , 2003
<i>frxA</i>	913	FRXA1 -CGAATTGGATATGGCAGCCG FRXA4-TATGTGCATATCCCCTGTAGG		
23S <i>rRNA</i>	280	CLA1995F-GTAACTATAACGGTCCTAAG CLA2274R-GAAACATCAAGGGTGGTATC	95°C: 1 min, 55°C: 1 min: 30 sec, 72°C: 1 min	Ribeiro <i>et al.</i> , 2003
<i>pbpI</i>	953	PBP1F-CACGAGCACCGGTAAGATTT PBP1R-CGCTATCGTCTGTTCTTTTGGG	95°C: 1 min, 60°C: 1 min: 30sec, 72°C: 1min	Nishizawa <i>et al.</i> , 2011

* tous font 30 cycles (excepté *pbpI*, 35 cycles); avec une étape initial de dénaturation 95°C, 3 min (excepté *pbpI*, 5 min), et une étape final d'extension 72°C, 5 min (excepté *pbpI*, 7 min).

II-4-4- Analyse des produits d'amplification

Les amplicons obtenus ont été analysés après migration électrophorétique à travers un gel d'agarose à 1,5 % contenant du bromure d'éthidium (BET) à 0.5 µg/mL (**Sigma Chemical, St. Louis, MO., USA**). La migration a été réalisée pendant 1 heure à 120 V avec un marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (**Eurogentec, Hampshire, UK**). La visualisation des bandes de migration a été faite par un GelDoc™ XR System (**Bio-Rad Laboratories, Hertfordshire, UK**). Un témoin négatif ne contenant pas d'ADN et un témoin positif (souche 014F/IPCI 02) ont servi pour le contrôle qualité des amplifications.

II-5- Détermination des séquences nucléotidiques des gènes de résistance aux antibiotiques

Avant le séquençage de l'ADN, des amplicons des gènes associés à la résistance aux antibiotiques (rdxA, frxA, 23S rRNA et pbp1) produits par PCR ont chacun été aliquotés dans un tube Eppendorff de 2mL à raison de 13µL d'amplicons pour 2 µL d'amorce sens. L'ensemble a été purifié en utilisant un kit de purification PCR QIAquick (**Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne**). L'ADN a été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop Lite (Thermo Fischer Scientific, Madison, WI, USA) suivi du séquençage par Eurofins, MWG/ opéron (**Cochin, France**) selon le principe du séquençage par la méthode de Sanger.

II-5-1- Analyse des séquences néo synthétisées

L'analyse des séquences néo synthétisées s'est faite en convertissant les fichiers format séquence en format Fasta qui sont des formats facilement exploitables par les logiciels utilisés pour l'alignement. Les séquences sont alignées avec les séquences de référence en utilisant des logiciels appropriés.

II-5-2- Identification des mutations par alignement des séquences

Les séquences des gènes associés aux antibiotiques ont été superposées aux séquences des souches de *H. pylori* identifiées et disponibles à la banque des données Genbank du NCBI en utilisant les logiciels Seaview 64 bits et Bioedit (France). Les mutations ont été décrites en identifiant les différences observées dans les séquences nouvellement synthétisés par rapport aux séquences de référence.

II-6- Analyses statistiques des données

II-6-1- Collecte des données

Pour chacun des patients inclus dans l'étude, une fiche d'enquête relative aux données sociodémographiques (âge, sexe, profession) et aux antécédents cliniques ont été renseignés (cf.

annexes). Les résultats de l'examen endoscopique, du test rapide à l'urée, de la culture et de la biologie moléculaire ont également été reportés sur la fiche.

II-6-2- Traitement statistique des données

La saisie et la description des données ont été réalisées à l'aide d'un logiciel Epi-info version 3.5.4 de l'année 2012. Ces données ont été ensuite transcrites dans une base Excel facilitant ainsi leur analyse univariée. Les tests statistiques ont été interprétés au seuil de significativité correspondant à un risque alpha de 5%. Les variables qualitatives ont été comparées à l'aide du test de Chi-2 de Pearson ou avec le test exact de Fisher lorsqu'une des variables est inférieure à 5.

RESULTATS ET DISCUSSION

I- RESULTATS

I-1- Données épidémiologiques

I-1-1- Caractéristiques sociodémographiques

Les patients dont les biopsies gastriques ont été prélevées étaient à majorité des femmes avec une prévalence de 61,5% (104/169) et un sexe ratio H/F de 0,63. L'âge des patients variait entre 19 et 83 ans avec une moyenne de 43,5 ans. La tranche d'âge la plus représentée dans notre étude était celle des 51 ans et plus avec 33,1% (56/169). La classe professionnelle la plus représentée était le secteur informel avec 29,6% (50/169). Selon l'ethnie, la majorité des patients prélevés étaient des ivoiriens d'origine Akan (81/169 soit 47,9%). Par ailleurs , 55 % (93/169) des patients prélevés résidaient au nord de la ville d'Abidjan (Yopougon, Abobo, Cocody).

I-1-2- Mode de vie

La répartition des patients prélevés selon le mode de vie montrait que 79,9% (135/169) d'entre eux vivaient en promiscuité autrement dit, ces patients vivaient avec plus de 2 personnes par pièce par habitat. Aussi, 88,8% (159/169) des patients avaient pour mode d'approvisionnement en eau, la Société de Distribution d'Eau de Côte d'Ivoire (SODECI). Respectivement, 77,5% (131/169) et 95,3% (161/196) des patients prélevés ne consommaient ni alcool ni tabac.

I-1-3-Antécédents médicaux

Un taux de 47,3% des patients prélevés n'avaient pas consommé d'antibiotiques avant l'endoscopie et 53,3% n'avaient pas utilisé d'anti sécrétoires. Parmi les patients prélevés, 75,1% ont reconnu n'avoir déjà eu recours à une fibroscopie œsogastroduodénale (FOGD) et plus de la moitié soit 58,6% (99/169) avaient des antécédents familiaux de syndrome ulcéreux.

I-1-4- Données cliniques

Parmi les 169 patients prélevés dans l'étude, 58,8% (97/169) avait pour principal motif de fibroscopie œsogastroduodénale, les épigastralgies. Les douleurs abdominales, les ulcères, la dyspepsie non ulcéreuse et la recherche des signes d'Hypertension portale (HTP) étaient respectivement de 7,9% (13/169), 7,1% (12/169), 6,1% (10/169) et 5,5 (9/169)%. Les indications d'endoscopie tels que l'anémie chronique, l'halitose, les vomissements et autres (amaigrissement, Reflux gastro œsophagien (RGO), dysphagie, pyrosis, précordialgie) étaient peu fréquents et respectivement de 3,1% (5/169), 2,4% (4/169), 3,1% (5/169) et 3,1% (5/169). Selon l'aspect endoscopique décrite, la gastropathie érythémateuse et la pangatropathie étaient les principales lésions endoscopiques observées à 53,1% (86/169) et 23,5% (38/169) respectivement (**Tableau V**).

Tableau V: Répartition des patients prélevés selon l'aspect endoscopique observé

Aspect endoscopique	Effectif	Fréquence (%)
Normal	8	4,9
Gastropathie avec reflux gastrique	14	8,6
Gastropathie érythémateuse	86	53,1
Pangastropathie	38	23,5
Autres⁽¹⁾	16	9,9

⁽¹⁾Autres lésions : polype sessile du duodénum, bulbite, sténose antro-pylorique d'allure tumorale, antrobulbite, reflux biliaire duodéno-gastrique, Œsophagite de stade 2 de Savary Miller, duodénopathie congestive.

I-2- Présence de *H. pylori* dans les biopsies gastriques selon le test rapide à l'uréase

I-2-1- Prévalence de l'infection à *H. pylori* selon le test rapide à l'uréase

La prévalence de l'infection à *H. pylori* selon test rapide à l'uréase montre un taux de positivité de 58% (98/169). Selon le site de prélèvement des biopsies, les taux de positivité du test rapide à l'uréase dans l'antrum et dans le fundus étaient respectivement de 48,5% (82/169) et 50,3 % (85/169). Il n'y avait pas de différence significative entre la positivité test rapide à l'uréase des biopsies prélevées au niveau de l'antrum et celle des biopsies prélevées au niveau du fundus ($p > 0,05$) (**Tableau VI**).

I-2-2- Présence de *H. pylori* dans les biopsies gastriques selon les données épidémiologiques et cliniques

Les résultats du test rapide à l'uréase montraient une association significative entre la présence de *H. pylori* dans les biopsies et le mode d'approvisionnement en eau potable avec un $p < 0,001$. La réalisation antérieure ou non d'une fibroscopie était également associée à la présence de la bactérie ($p = 0,013$). Aussi, la présence de lésions au niveau de la muqueuse gastrique était fortement associée à la présence de *H. pylori* dans la muqueuse gastrique ($p < 0,001$) (**Tableau VII**).

Tableau VI: Positivité du test rapide à l'uréase selon le site de prélèvement de la biopsie

Site de prélèvement	Résultat du test rapide à l'uréase				p-Value
	Positifs		Négatif		
	Effectif	Fréquence (%)	Effectif	Fréquence (%)	
Antre	82	48,5	87	51,5	0,74
Fundus	85	50,3	84	49,7	

Tableau VII: Présence de *H. pylori* dans les biopsies gastriques selon les données épidémiologiques et cliniques

	Résultat du test rapide à l'uréase		p-Value
Mode d'approvisionnement en eau	Négatif	Positif	<0,001
Eau minérale	3	3	
Eau courante (SODECI)	58	92	
Puits	6	3	
Fibroscopie antérieure			0,013
OUI	22	16	
NON	45	82	
Aspect endoscopique			<0,001
Normal	8	8	
Gastropathie	54	83	
Autres	5	3	

I-3- Isolement et identification de *H. pylori*

Les conditions de conservation et de culture de *H. pylori* à partir des biopsies gastriques ont été respectées et appliquées selon les recommandations de la Société Française de Microbiologie (SFM). Les milieux ensemencés ont sortis des incubateurs et des jarres après 14 jours minimum d'incubation. Les primo cultures n'ont montrés aucune croissance bactérienne aussi bien sur les géloses Columbia au sang de cheval que sur les géloses Columbia au sang de mouton. Cependant, dans certains cas, lorsque les incubations des milieux étaient poursuivis au delà de 7 jours, les milieux ensemencés se retrouvaient contaminées par des levures et des bactéries d'origine exogène gênant le repérage des colonies suspectes sur des milieux d'isolement et rendant impossible l'identification des souches par les différents tests biochimiques (catalase, oxydase et uréase). Les contaminants étaient observés principalement sur les géloses Columbia au sang de mouton et généralement après 7 jours au minimum d'incubation. Finalement, Nous avons considéré comme positifs pour l'infection par *H. pylori* tous les patients dont le test rapide à l'uréase était positif. Les biopsies gastriques de ces patients ont donc été utilisées directement pour la recherche des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques.

I-4- Détection des gènes de virulence de *H. pylori*

Nous avons considéré comme positives pour l'infection par *H. pylori*, les 98 biopsies positives au test rapide à l'uréase correspondant à 98 patients et ont servis pour la PCR.

I-4-1- Caractéristiques générales des patients porteurs des gènes de virulence

Les biopsies qui avaient les PCR positives à l'un ou plusieurs gènes étaient 70/98 (71,4%) et 28/98 (28,6%) étaient négatives à tous les gènes (**Tableau VIII**). La population des patients porteurs des génotypes avait une prédominance féminine avec 43/70 (61,4%). Les hommes représentaient 27/70 soit 38,6%. La moyenne d'âge des 70 patients dont les biopsies avaient des souches porteurs de gènes de virulence était de 41,7 ans avec un minimum de 19 ans et un maximum de 72 ans (**Tableau VIII**). Cependant, la classe d'âge de patients chez laquelle les gènes de virulence ont été le plus identifiés était celle de ceux dont l'âge était compris entre 31 et 40 ans. Bien que certains gènes aient été détectés plus chez un sexe que chez l'autre, leur présence n'était pas significativement associée à l'âge ou au sexe des patients ($p>0,05$).

I-4-2- Gène *vacA*

Les tailles des produits d'amplification attendues pour les gènes *vacA sla* et *vacA mla* étaient de 190 pb et 290 pb respectivement. Selon le tableau VIII, sur les 70 patients dont la PCR était positive aux gènes de virulence, la région *vacA sla* était identifiée chez 11 patients soit 15,7% (11/70) et la région *vacA mla* chez 4 patients soit 5,7% (4/70). Pris ensemble, l'allèle *sla+/mla+* a été identifié à 55,7% (39/70). Une proportion de 22,9% (16/70) n'a pas pu être recherché dans notre étude (**Figure 12A**).

I-4-3- Gène *cagA*

Le gène *cagA* de *H. pylori* a été détecté à 72,9 % (51/70) dans les biopsies gastriques des patients dont la PCR était positive aux gènes de virulence et à 27,8% (19/70) dans lesquelles il était absent. Les produits d'amplification de taille 298 indiquaient la présence du gène *cagA* (**Figure 12B**).

I-4-4- Gène *oipA*

Le gène *oipA* de *H. pylori* a été détecté chez 26 patients sur les 70 patients dont la PCR dans les biopsies gastriques était positive aux gènes de virulence soit 37,1%. Les produits d'amplification de taille 401 pb qui indiquaient la présence du gène *oipA* sont représentés sur la **figure 12C**.

La répartition des différents génotypes de la virulence identifiés sont résumés dans le **tableau IX**.

Tableau VIII: Fréquence des gènes de virulence et caractéristiques des patients porteurs des gènes de virulence

Paramètres		Effectif	Fréquence ou moyenne
Présence des gènes de virulence	Positif	70	71,4%
	Négatif	28	28,6%
Sexe des patients à PCR positive aux gènes de virulence	Homme	43	61,4%
	Femme	27	38,6%
Age des patients à PCR positive aux gènes de virulence	Minimum	19	41,7 ans
	Maximum	72	

Tableau IX: Répartition des différents génotypes de virulence

Génotypes de virulence	Effectif (N=70)	Fréquence (%)
vacA sla+	11	15,7
vacA ml+	4	5,7
sla+/mla+	39	55,7
cagA+	51	72,8
oipA+	26	37,2

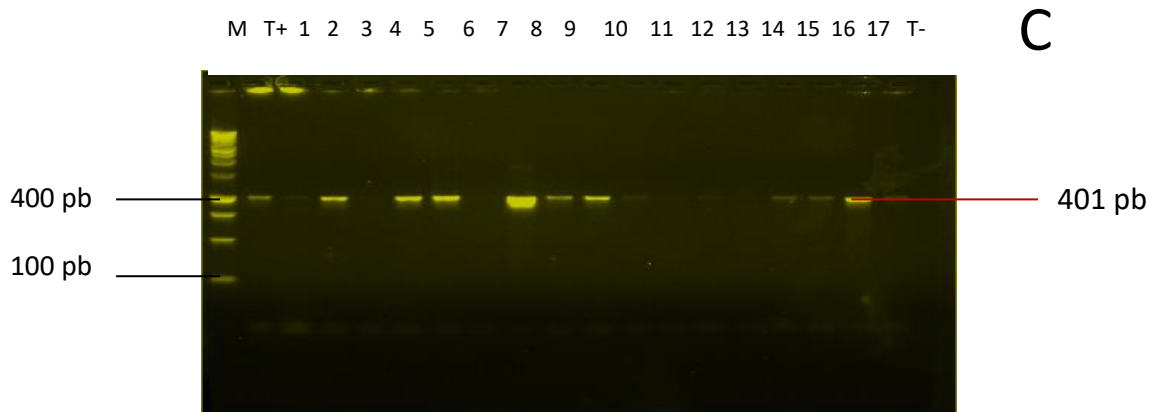
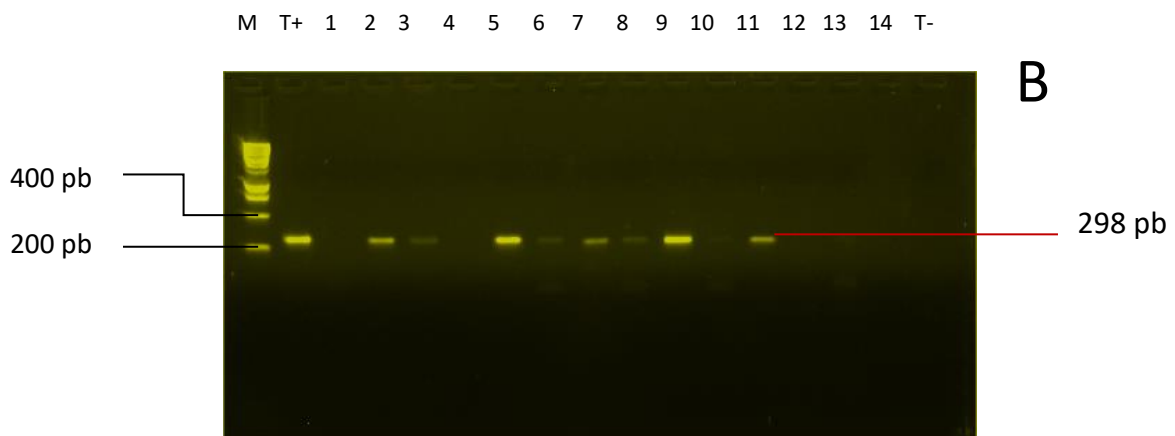
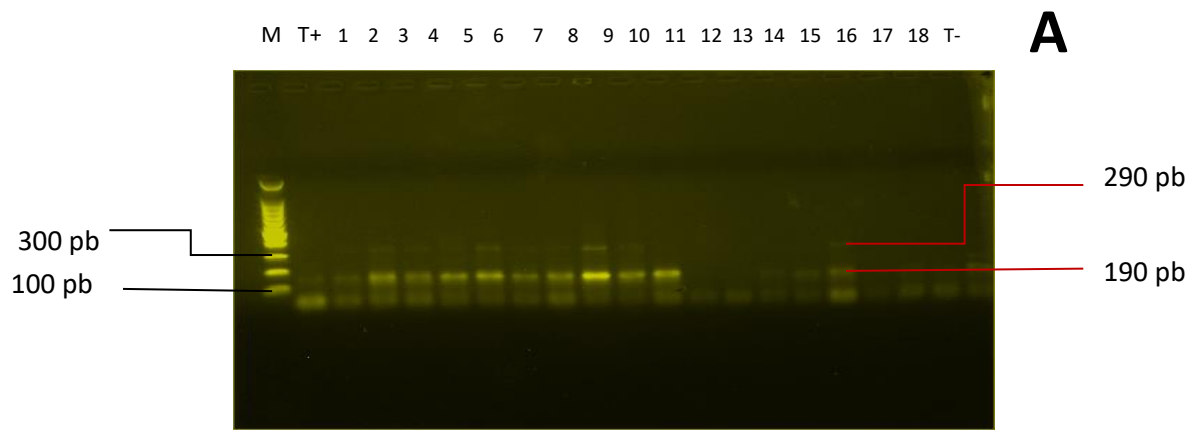


Figure 12: Profil électrophorétique de produits d'amplification des gènes *vacA*, *cagA* et *oipA*

A: Génotypage de *vacA*. M: marqueur de taille 100 pb. Puits 2-10, 16: génotype *vacA sla+/mla+*, Puits 1, 11, 14, 15, 17, 18: génotype *vacA sla+*. Puits 12, 13: gène *vacA sla/mla* négatif.

B: Génotypage de *cagA*. M: marqueur de taille 250 pb. Puits 2, 3, 5-11: gène *cagA* positif. Puits 1, 4, 12-14: gène *cagA* négatif.

C: Génotypage de *oipA*. M: marqueur de taille 100 pb. Ligne 1, 2, 5, 6, 7-10, 12, 14-17: gène *oipA* positif. Ligne 3, 6, 11 et 13: gène *oipA* négatif. T-: témoin négatif sans ADN. T+: témoin positif avec ADN de souche de référence. Pb: paire de base.

I-4-1-1-5- Génotypes identifiés chez *H. pylori* et antécédents familiaux de syndrome ulcéreux

Parmi les 70 patients dont la PCR à partir des biopsies gastriques était positive aux gènes de virulence, 41/70 (58,6%) avaient des antécédents familiaux de syndrome ulcéreux. La présence du génotypes *vacA* *sl*a+/m1a+ chez *H. pylori* était significativement associée aux patients qui avaient des antécédents familiaux de syndrome ulcéreux (p=0,012).

I-4-1-1-6- Répartition des génotypes de virulence identifiés chez *H. pylori* selon l'aspect endoscopique observé

Les génotypes *vacA* *sl*a+/m1a+, *cagA*+ et *oipA*+ ont été identifiés chez *H. pylori* à diverses fréquences selon les aspects endoscopiques des muqueuses gastriques. Les aspects endoscopiques ont été décrits chez les 39 patients portant le génotype *Sl*a+/m1a+, les 51 patients portant le génotype *cagA*+ et les 26 patients portant le génotype *oipA*+ (**Tableau IX**).

Les trois gènes ont été identifiés à plus de 10% dans la gastropathie avec reflux gastrique (*sl*a+/m1a+ (20,6%) ; *cagA*+ (11,8%) ; *oipA*+ (11,5%)), dans la gastropathie érythémateuse (*sl*a+/m1a+ (51,3%) ; *cagA*+ (56,8%) ; *oipA*+ (57,7%)) et dans la pangastropathie (*sl*a+/m1a+ (23,1%) ; *cagA*+ (25,5%); *oipA*+ (26,9%)). Cependant dans les aspects normaux et autres de la muqueuse gastrique, ces gènes ont été retrouvés chez *H. pylori* à des fréquences variant entre 0 à 3,9%.

Tous les génotypes de *H. pylori* ont été identifiés en majorité dans les cas de gastropathie érythémateuse et de pangastropathie alors que le génotype *oipA*+ était absent dans les biopsies qui avaient un aspect normal à l'endoscopie de l'estomac (**Tableau X**).

I-4-1-1-7- Combinaisons génotypiques de *H. pylori* selon l'aspect endoscopique observé

Sur la base de la recherche du gène *cagA*, de la région *vacA* (*sl*a et m1a) et du gène *oipA*, cinq différentes combinaisons génotypiques ont été identifiées. Ce sont: *Sl*a+/m1a+/cagA+/oipA+; *Sl*a+/m1a+/cagA+/oipA-; *Sl*a+/m1a+/cagA-/oipA+; *Sl*a+/m1a-/cagA+/oipA+ et *Sl*a-/m1a+/cagA+/oipA+. Le génotype le plus répandu était *sl*a+/m1a+/cagA+/oipA- à 30% (21/70) et la majorité des génotypes combinés de *H. pylori* ont été observés dans les cas de gastropathie érythémateuse et de pangastropathie (**Tableau. X**).

Tableau X: Fréquence des génotypes identifiés et génotypes combinés selon les antécédents familiaux de syndrome ulcéreux l'aspect endoscopique

	Génotypes			Génotypes combinés				
	S1a+/m1a+ N=39	CagA+ N=51	OipA+ N=26	S1a+/m1a+/ cagA+/oipA+	S1a+/m1a+/ cagA+/oipA-	S1a+/m1a+/ cagA-/oipA+	S1a+/m1a-/ cagA+/oipA+	S1a-/m1a+/ cagA+/oipA+
Antécédents familiaux syndrome ulcéreux	28 (71,8%)	29 (56,9%)	15 (57,7%)	7 (77,8%)	14 (66,7%)	3 (75%)	0 (0%)	1(100%)
Aspects endoscopiques								
Gastropathie avec reflux gastrique	8 (20,6%)	6 (11,8%)	3(11,5%)	0(0%)	5(23,8%)	1(25%)	0(0%)	0(0%)
Gastropathie érythémateuse	20 (51,3%)	29 (56,8%)	15(57,7%)	8 (88,9%)	7(33,3%)	2(50%)	1(100%)	1(100%)
Pangastropathie	9 (23,1%)	13 (25,5%)	7 (26,9%)	1(11,1%)	7(33,3%)	1(25%)	0(0%)	0(0%)
Normal	1 (2,6%)	1 (2%)	0(0%)	0(0%)	1(4,8%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Autres ⁽¹⁾	1 (2,6%)	2 (3,9%)	1 (3,9%)	0(0%)	1(4,8%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Total	39(100%)	51(100%)	26(100%)	9(100%)	21(100%)	4(100%)	1(100%)	1(100%)

⁽¹⁾Autres: Œsophagite de stade 2 de Savary Miller, duodénopathie congestive

I-4-2- Gène *tipA*

I-4-2-1- Prévalence du gène *tipA*

Le gène *tipA* a été recherché dans les 98 biopsies gastriques dont le test rapide à l'uréase était positif. Le gène a été détecté dans 57 biopsies soit à 58,2% (57/98). Les produits d'amplification obtenus et de taille 519 pb ont indiqué la présence du gène *tipA* (**Figure 13**).

I-4-2-2- Caractéristiques générales des patients porteurs du gène *tipA*

Les patients porteurs de *H. pylori* possédant le gène *tipA* avaient une prédominance féminine 34/57(59,7%) . Le gène était identifié à majorité chez les patients dont l'âge étaient compris entre 31-40 ans (31,6%). Les employés cadres représentaient 18/57 (31,6%) des porteurs et les épigastralgies étaient le premier motif indicatif d'endoscopie soit 35/57 (61,4%). Par ailleurs, 59,6% des patients chez qui *H. pylori* portant le gène *tipA* a été détecté dans les biopsies gastriques ont reconnus avoir des antécédents familiaux de syndrome ulcéreux (**Tableau XI**).

Le gène *tipA* de *H. pylori* était également détecté dans les biopsies gastrique en majorité chez des patients avec une gastropathie érythémateuse (56,1%) et une pangastropathie (24,6%) selon l'aspect endoscopique de la muqueuse gastrique. Il n'y avait pas de différence significative entre la présence du gène *tipA* chez *H. pylori* et l'aspect endoscopique de la muqueuse gastrique des patients porteurs de *H. pylori* possédant le gène *tipA* ($p>0,05$) (**Tableau XII**).

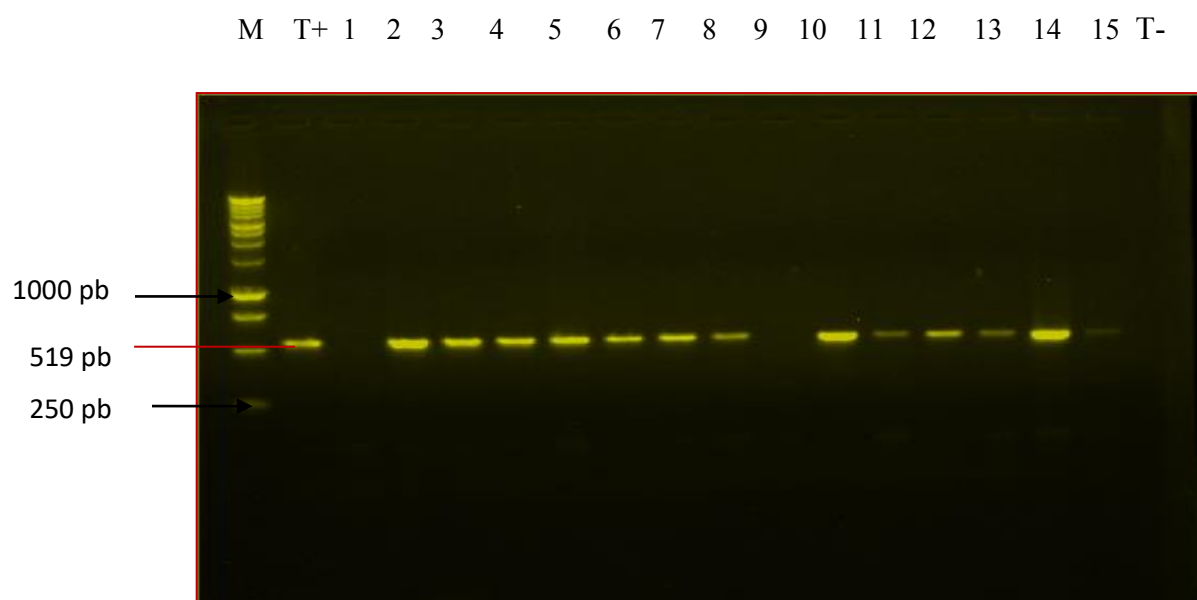


Figure 13: Profil électrophorétique des produits d'amplification du gène *tipA*

M: marqueur de taille, 250 pb. Puits 2-8, 10-15: gène *tipA* positif. Puits 1 et 9: gène *tipA* négatif. **T+:** témoin positif avec ADN de souche de référence. **T-:** témoin négatif sans ADN.

Pb: Paire de bases

Tableau XI: Patients porteurs du gène *tipA* selon les données sociodémographiques et l'indication endoscopique

Patients	Effectif (N=57)	Fréquence (%)
Sexe	Hommes: 23 Femmes: 34	40,3 59,7
Age	20-30 ans: 11 31-40 ans: 18 41-50 ans: 17 >50 ans: 11	19,3 31,6 29,8 19,3
Profession	Cadres : 18 Elèves-étudiants : 5 Employés : 9 Sans emploi : 11 Secteur informel : 14	31,6 8,7 15,8 19,3 24,6
Indication endoscopique	Epigastralgies: 35 Ulcère gastrique: 7 Dyspepsie non ulcéreuse: 4 Recherche d'HTP: 4 Halitose: 2 Autres ⁽¹⁾ : 5	61,4 12,3 7,0 7,0 3,5 8,8

*⁽¹⁾Autres : dysphagie, anémie, vomissement, odynophagie unilatérale, reflux gastro-
oseophagien (RGO)*

Tableau XII: Répartition du gène *tipA* de *H. pylori* selon l'aspect endoscopique de la muqueuse gastrique

	Présence du gène <i>tipA</i>		p-Value
	Effectif (N=57)	Fréquence (%)	
Antécédents familiaux de syndrome ulcéreux	34	59,6	0,78
Aspects endoscopiques			
Gastropathie avec reflux gastrique	8	14,1	>0,05
Gastropathie érythémateuse	32	56,1	
Pangastropathie	14	24,6	
Autres⁽¹⁾	2	3,5	
Normal	1	1,7	

⁽¹⁾ Autres: Œsophagite de stade 2 de Savary Miller, Duodénopathie congestive

I-4-2- Détection des gènes associés à la résistance aux antibiotiques

I-4-2-1- Caractéristiques générales des patients porteurs de *H. pylori* possédant des gènes de résistance aux antibiotiques

La population des patients porteurs de *H. pylori* possédant des gènes de résistance aux antibiotiques avait une prédominance féminine avec 61/98 (62,2%). Les hommes représentaient 37/98, soit 37,8%. La moyenne d'âge était de 42,6 ans avec un minimum de 19 ans et un maximum de 77 ans. La classe d'âge la plus représentée était celle des patients dont l'âge était compris entre 31 et 40 ans. La présence des gènes de résistance aux antibiotiques chez *H. pylori* n'était pas significativement associée à l'âge ou au sexe des patients, bien que certains gènes aient été détectés plus chez un sexe que chez l'autre, ($p > 0,05$).

I-4-2-2- Gène de résistance au métronidazole

Les gènes *rdxA* et *frxA* de *H. pylori* conférant la résistance au métronidazole (MTZ) ont été détectés respectivement aux tailles de 749 pb et 913 pb (**Figure 14A**) chez 12 patients parmi les 98 patients dont le test rapide à l'uréase était positif à partir des biopsies gastriques soit 12,2% (12/98). Le gène *frxA* seul a été détecté dans 5,1% (5/98).

I-4-2-3- Gène de résistance à la clarithromycine

Le gène 23S sRNA de *H. pylori* conférant la résistance à la clarithromycine (CLR) a été détecté à la taille de 280 pb chez 26 patients parmi les 98 patients dont le test rapide à l'uréase était positif à partir des biopsies gastriques soit 26,5% (26/98) (**Figure 14B**).

I-4-2-4- Gène de résistance à l'amoxicilline

Le gène *pbp1* de *H. pylori* conférant la résistance à l'amoxicilline (AML) de *H. pylori* a été détecté à la taille de 953 pb chez 57 patients parmi les 98 patients dont le test rapide à l'uréase était positif à partir des biopsies gastriques soit 58,2% (57/98) (**Figure 14C**).

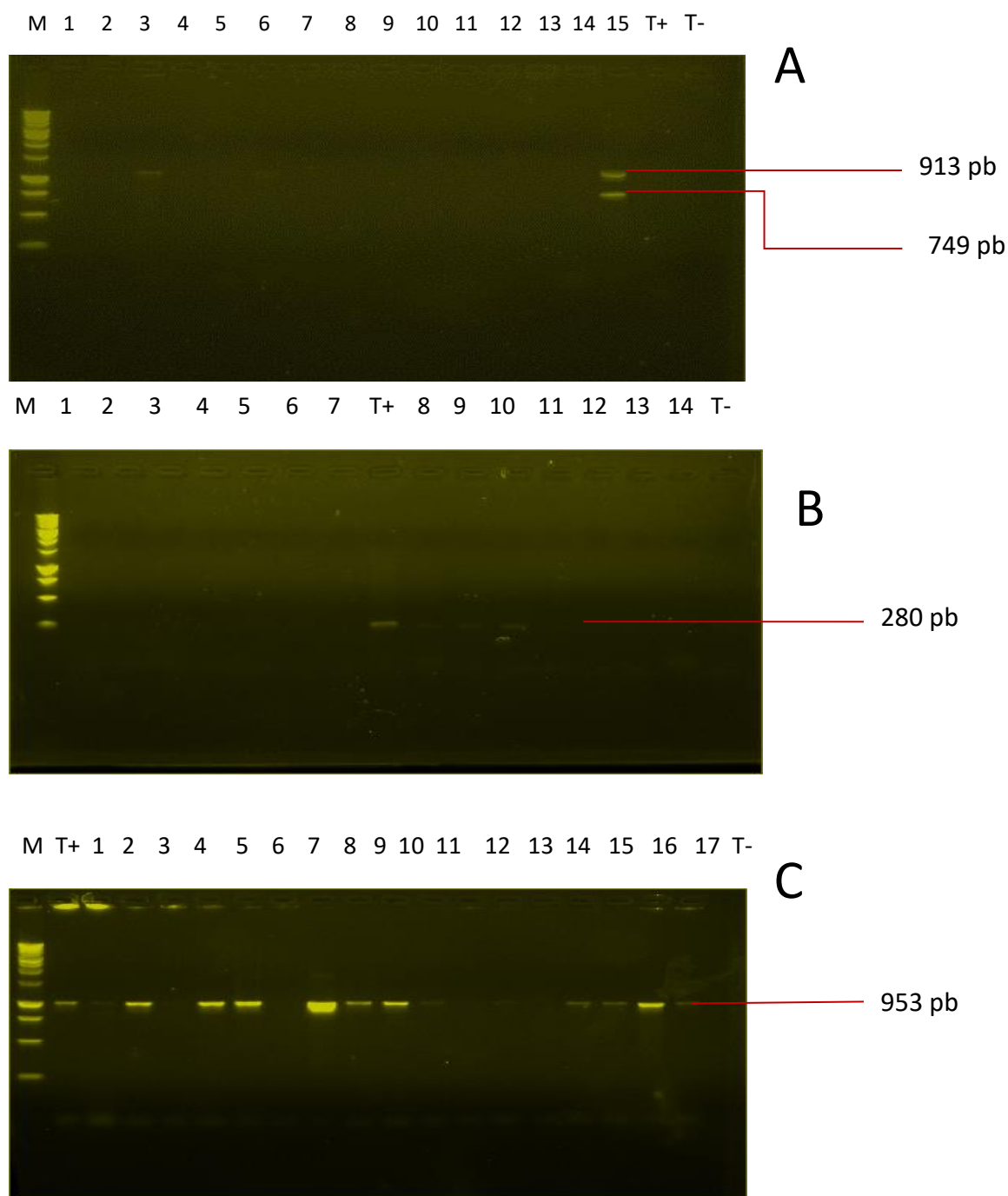


Figure 14: Profil électrophorétique des produits d'amplification des gènes *rdxA/frxA*, 23S rRNA et *pbp1*

A : gène *rdxA/frxA*. M: marqueur de taille, 200 pb. Puits 3 et 6: gène *frxA* positif. Puits 15: gènes *rdxA/frxA* positifs. Puits 1,2,4,5,7-14 : gènes *rdxA/frxA* négatif.

B : gène *23s RNA*. M: marqueur de taille , 200 pb. Puits 8-10: gène *23s RNA* positif. Puits 1-7,11-14: gène *23s RNA* négatif.

C : gène *pbp1*. M: marqueur de taille ,1kb. Puits 1,2,4,5,7-10,12,14-17 : gène *pbp1* positif. Puits 3,6,11,13: gène *pbp1* négatif.

T-: témoin négatif sans DNA. T+: témoin positif avec ADN de souche de référence. Pb: paire de bases

I-4-2-5- Présence des gènes de résistance aux antibiotiques chez *H. pylori* selon les antécédents et l'aspect endoscopique

Plus de la moitié des patients porteurs de *H. pylori* possédant des gènes de résistance aux antibiotiques, 75% pour le MTZ, 65,4% pour la CLR et 59,6% pour l'AML, ont reconnu avoir des antécédents familiaux de syndrome ulcéreux. Aucun des patients ne consommait du tabac. Cependant, La majorité des gènes de résistance aux antibiotiques, 58,3% pour le MTZ, 57,7% pour la CLR et 52,6% pour l'AML a été observée dans les cas de gastropathie érythémateuse et de pangastropathie. Les gènes de résistances aux antibiotiques n'ont pas été détectés dans les biopsies gastriques de patients avec une muqueuse gastrique normale selon l'aspect endoscopique observé (**Tableau XIII**).

I-4-2-6- Résistances croisées aux antibiotiques

La résistance à deux ou plusieurs familles d'antibiotiques constitue une résistance croisée. Ainsi, les trois gènes de résistance aux antibiotiques AML, CLR et MTZ ont été identifiés à la fois chez *H. pylori* dans huit (8) biopsies gastriques sur les 98 biopsies dont le test rapide à l'uréase était positif, soit à 8,2% (8/98). Deux gènes de résistance aux antibiotiques AML/CLR et AML/MTZ ont été identifiés à la fois chez *H. pylori* dans 18 et 4 biopsies gastriques respectivement sur les 98 biopsies soit à 18,4% (18/98) et à 4,1% (4/98). Il n'y avait aucune résistance croisée pour le couple CLR et MTZ (**Tableau XIV**).

Toutes les souches de *H. pylori* qui possédaient les trois gènes de résistance aux antibiotiques possédaient également les gènes *oipA* et *tipA*. Aussi, les souches de *H. pylori* possédant le gène *cagA* et *tipA* avaient une résistance croisée modérément élevée au couple d'antibiotiques AML et CLR respectivement de 31,4% et 29,8% (**Tableau XIV**).

Tableau XIII: Présence des gènes de résistance aux antibiotiques chez *H. pylori* selon les antécédents et selon l'aspect endoscopique de la muqueuse gastrique

	Gènes			p value
	MTZ (n=12)	CLR (n=26)	AML (n=57)	
Prévalence des gènes de résistance (n/N)	12,2%	26,5%	58,2%	
Antécédents des patients				
Alcool consommation	4 (33,3%)	7 (26,9%)	14 (24,6%)	0,48
Tabac consommation	0	0	0	
Antécédent de fibroscopie	2 (16,6%)	5 (19,2%)	10 (17,5%)	0,5
Antécédent familial de syndrome ulcéreux	9 (75%)	17 (65,4%)	34 (59,6%)	0,33
Aspects endoscopiques				
Gastropathie avec reflux gastrique	2 (16,7%)	2 (7,7%)	9 (15,8%)	>0,05
Gastropathie érythémateuse	7 (58,3%)	15 (57,7%)	30 (52,6%)	
Pangastropathie	3(25%)	7 (26,9%)	15 (26,3%)	
Autres⁽¹⁾	0	2 (7,7%)	3 (5,3%)	

⁽¹⁾**Autres:** Œsophagite de stade 2 de Savary Miller, duodénopathie congestive, biance cordiale sans œsophagite

n: nombre de biopsies dans lesquelles le gène de résistance de *H. pylori* a été détecté

N: nombre total de biopsies dans lesquelles les gènes de résistance aux antibiotiques ont été recherchés égal à 98

Tableau XIV: Profil génétique de la résistances croisées de *H. pylori* aux antibiotiques

	Génotypes croisées			
	AML+/CLR+	AML+/MTZ+	CLR+/MTZ+	AML+/CLR+/MTZ+
Nombre de biopsies (n)	18	4	0	8
Prévalence des génotypes croisés n/N (%)	18,4%	4,1%)	0%	8,2%

n: nombre de biopsies dans lesquelles la résistance croisée de *H. pylori* a été détecté

N: : nombre total de biopsies dans lesquelles les gènes de résistance aux antibiotiques ont été recherchés égal à 98

Tableau XV: Répartition des génotypes de résistance croisée de *H. pylori* selon les génotypes de virulence identifiés

Génotypes de virulence	Génotypes de résistance croisées			
	AML+/CLR+ (n=18)	AML+/MTZ+ (n=4)	CLR+/MTZ+ (n=0)	AML+/CLR+/MTZ+ (n=8)
Vaca s1A+/m1a+	8 (20,5%)	4 (10,3%)	0(0%)	5 (62,5%)
CagA+	16 (31,4%)	4 (7,8%)	0(0%)	7 (87,5%)
OipA+	6 (23,1%)	2 (7,7%)	0(0%)	8 (100%)
TipA+	17 (29,8%)	3 (5,3%)	0(0%)	8 (100%)

I-4-3- Identification des mutations ponctuelles dans les gènes de résistance aux antibiotiques séquencés

I-4-3-1- Analyse des séquences des gènes de résistance *rdxA* et *frxA* (MTZ)

Les gènes de résistance *rdxA* et *frxA* détectés dans deux (2) biopsies ont faits l'objet d'un séquençage. Des substitutions ont été identifiées dans la séquence *rdxA* conférant la résistance de *H. pylori* au MTZ comparativement à la souche de référence *H. pylori* 225923 (**Tableau XIV**) (**Figure 15**). Aussi, quatre substitutions d'acides aminés ont elles été identifiées dans le gène *frxA* conférant également la résistance de *H. pylori* au MTZ de ces mêmes deux biopsies. Ce sont K32R, I59K, L149S et A251E (Fig. 18). Les souches de référence utilisées pour la comparaison des séquences des gènes *rdxA* et *frxA* ont été sélectionnées dans la banque de données Genbank du NCBI avec respectivement les numéros d'accession AF315501.1 et AF225923.1.

I-4-3-2- Analyse de la séquence du gène *23S rRNA* (CLR)

Le gène de résistance *23S rRNA* conférant la résistance à la CLR détecté dans trois (3) biopsies ont faits l'objet de séquençage. Une nouvelle substitution T > C non rapportée a été identifiée à la position 2616 (T2616C) comparativement à la souche de référence. Cette mutation en terme d'acide aminé était silencieuse (même sens) à la position 872 et concerne la sérine (S872). Les autres types de mutations ont été décrits dans le tableau XV (**Figure 16**). La souche de référence utilisée pour la comparaison des séquences a été sélectionnée dans la banque de données Genbank du NCBI avec le numéro d'accession U27270.1.

I-4-3-3- Analyse de la séquence du gène *pbp1* (AML)

Le gène de résistance *pbp1* conférant la résistance à AML détecté dans treize (13) biopsies ont faits l'objet de séquençage. La substitution de la Lysine par la Leucine en position 102 (K102L) était prédominante (53,8%). Une substitution à la position 62 de la glycine par l'alanine (G62A) a été également retrouvé chez 6/13 soit 46,2% des souches. Parmi les souches, 5/13 (38,5%) avaient toutes des substitutions d'acides aminés par la Lysine. Ce sont F45K, D54K, H60K et I117K (**Tableau XV**). Les souches de référence utilisées pour la comparaison des séquences ont été sélectionnées dans la banque de données Genbank du NCBI avec les numéros d'accession AY 743230.1 à AY 743236.1 (**Figure 17**).

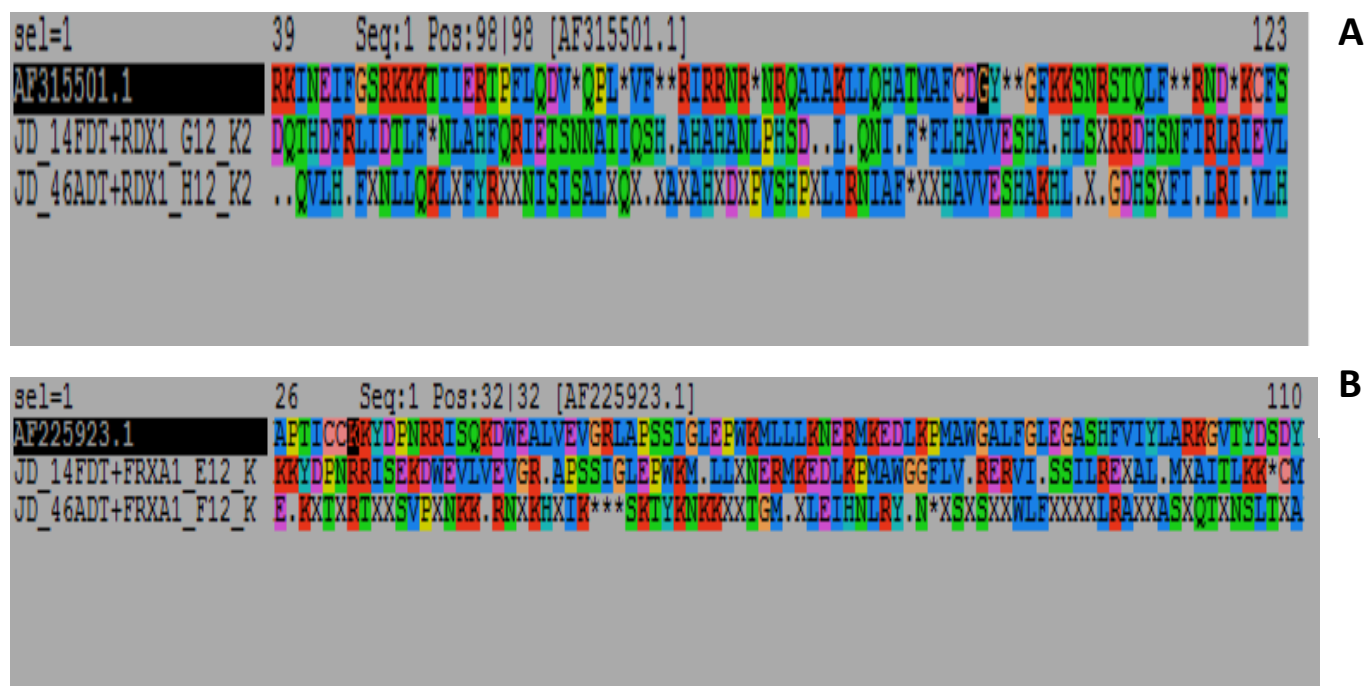


Figure 15: Alignement des protéines de *RdxA* et *FrxA* des souches sélectionnées résistantes aux antibiotiques

A: Visualisation des mutations des protéines de *RdxA*

B: Visualisation des mutation des protéines de *FrxA*

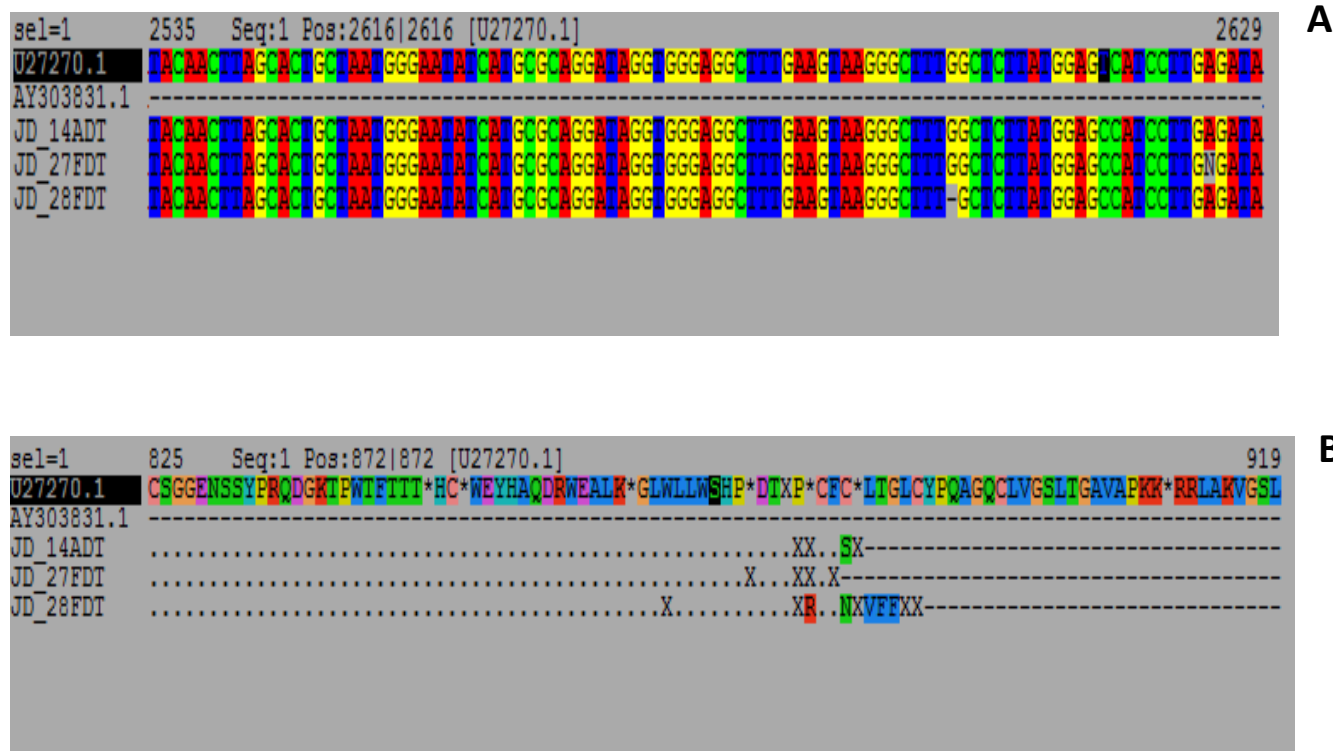


Figure 16: Alignement des protéines 23S *rRNA* des souches sélectionnées résistantes aux antibiotiques

A: Visualisation de la mutation T2616C dans le gène 23S *rRNA*

B: Visualisation de la mutation silencieuse en position 872 dans le gène 23S *rRNA*

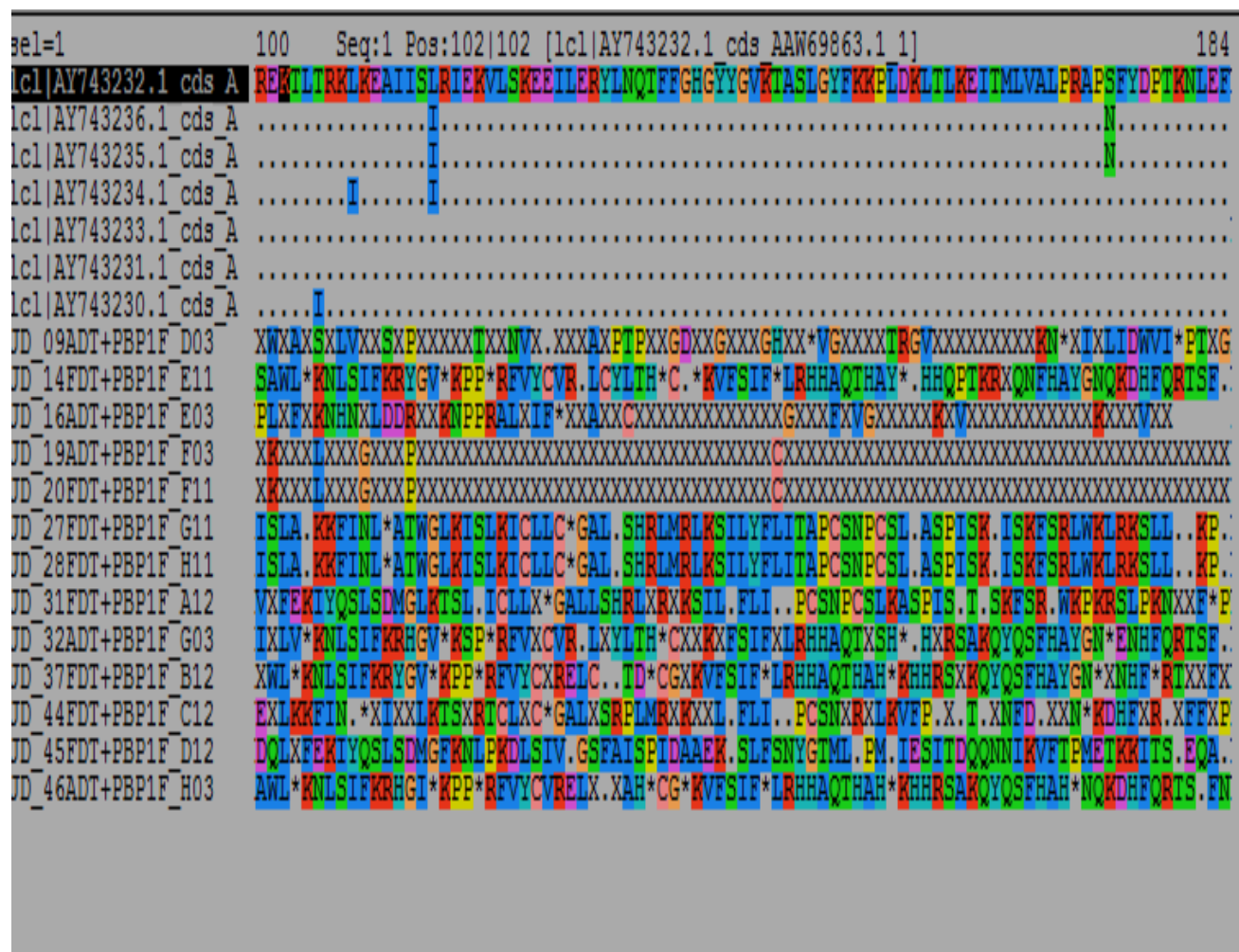


Figure 17: Alignement des protéines Pbp1 des souches sélectionnées résistantes aux antibiotiques

Tableau XVI: Différents types de mutation identifiés dans les séquences des gènes *rdxA/frxA*, *23S rRNA* et *pbp1*

Souches de <i>H. pylori</i>	Gènes	Changement d'acide aminé	Type de mutation
14FDT 46ADT	<i>rdxA</i>	K50L, G98V, V149S, L150S, P156A, R164L, N213S	substitution
14FDT 46ADT	<i>frxA</i>	K32R, I59K, L149S, A251E	substitution
14FDT 27FDT 28FDT	<i>23S rRNA</i>	S872S, C883S S872S S872S, G810, C883N	Substitution 'silencieuse' délétion
09ADT 14FDT 16ADT 19ADT 20FDT 27FDT 28FDT 31FDT 32ADT 37FDT 44FDT 45FDT 46ADT	<i>pbp1</i>	K60L (n=7) G62A (n=6) F45K, D54K, H60K et I117K (n=5) V12F, I24R, D29L, R33K, F34S, A36L, E40I, I41P, P42R, R44L, D232K (n=4)	Substitution

II- DISCUSSION

Cette étude a été réalisée pour déterminer la base moléculaire de la pathogénicité et la résistance aux antibiotiques de *H. pylori* à partir de biopsies gastriques de patients symptomatiques en Côte d'Ivoire. Dans ce pays en voie développement, la fréquence de l'infection par *H. pylori* reste élevée et l'émergence de la résistance aux antibiotiques demeure un problème de santé publique.

Caractéristiques générales des patients prélevés

Une prévalence féminine de 61,5% a été observée parmi les patients dont les biopsies gastriques ont été prélevées contrairement à certains auteurs qui observaient une prévalence de l'infection à *H. pylori* légèrement plus élevée chez le sexe masculin que chez le sexe féminin (**Woodward et al., 2000**). Cela montre bien que hommes et femmes courent le même risque d'infection (**Malaty, 2007**).

La moyenne d'âge des patients dont les biopsies ont été collectées était de 43,5 ans avec un minimum de 19 ans et un maximum de 83 ans. Ces patients ont été regroupés en quatre tranches d'âge: 19-30, 31-40, 41-50, 51 et plus. Le groupe d'âge le plus représenté était celui des 51 ans et plus avec 33,1%. Cela montre que les symptômes de l'infection à *H. pylori* surviennent chez le jeune adulte et que c'est à cet âge qu'ils sont assez persistants pour nécessiter une consultation en Gastrologie. Ainsi, la contamination se ferait chez les jeunes enfants pour atteindre une prévalence élevée à la vie adulte car il a été montré que *H. pylori* pouvait survivre pendant des décennies dans l'estomac humain de façon asymptomatique (sans effets visibles). En effet, l'acquisition de la bactérie dans l'enfance s'accompagne dans la grande majorité des cas de gastrite chronique qui évolue sans autre conséquence et reste asymptomatique (**Deltenre et al., 2000; Nabwera et al., 2000; Bagheri et al., 2013**).

Les patients qui travaillaient dans le secteur informel représentaient la majorité de la population de cette étude à 29,6%. Il semblerait que cette situation soit beaucoup plus associée au niveau d'instruction bas qui caractérisent ce groupe. L'association entre situation socio-économique et infection par *H. pylori* a été documentée à plusieurs reprises. Aussi, la précarité sociale d'une population est toujours associée à une forte prévalence dans cette population, sans doute à cause de la promiscuité et de l'hygiène précaire qui caractériseraient ce type de population (**Woodward et al., 2000**).

la majorité de la population étudiée était Akan (47,9%) et résidait principalement au nord de la ville d'Abidjan (Yopougon, Abobo, Cocody). Cela serait lié au mode alimentaire qui caractériserait ce peuple de l'Est de la Côte d'Ivoire réputé pour avoir une alimentation très épicée. Cependant, aucune étude démontrant ce lien n'a été rapporté à ce jour.

Aussi, le manque de service de gastroentérologie dans les centres hospitaliers à l'intérieur du pays pousse les populations à se déplacer vers la ville d'Abidjan principalement vers le service gastroentérologie de Cocody qui constituait jusqu'alors, la seule structure publique fonctionnelle. Aussi, le faible taux de représentativité des populations du sud de la Côte d'Ivoire (Port-Bouët, Koumassi, Marcory, Treichville) pourrait s'expliquer par le fait de leur orientation première vers le CHU de Treichville. Notons néanmoins que les services de Gastroentérologie du CHU de Treichville (Abidjan sud) et de Yopougon (Abidjan nord) étaient fermés pendant la réalisation de cette étude. Les populations étaient donc tous référées au CHU de Cocody ou dans des structures privées.

Près de 80% de la population d'étude vivait en promiscuité c'est-à-dire avec plus de 2 personnes par pièce par habitat. La promiscuité est un facteur de risque à considérer dans la caractérisation de l'infection à *H. pylori* en Côte d'Ivoire sachant que, les contacts étroits entre les individus, la vie confinée dans les espaces réduits, avec un équipement sanitaire limité, constitue un risque d'infection par *H. pylori* (**Woodward et al., 2000**).

Parmi les patients prélevés, 77,5% (131/169) et 95,3% (161/196) respectivement ne consommaient ni alcool ni tabac. Ce qui permet de ne pas les considérer comme des facteurs de risque de l'infection à *H. pylori* dans cette étude.

Ceux qui n'avaient pas consommés d'antibiotiques avant l'endoscopie étaient de 47,3% et ceux qui n'avaient pas utilisé d'anti sécrétoires étaient de 53,3%. Ces taux élevés augmentaient les chances de détection de la bactérie car peu de patients ont tentés une éradication de la bactérie et la majorité réduisait les risque d'infection en ne consommant ni alcool ni tabac.

Environ 75,1% des patients n'avaient jamais subi de fibroscopie œsogastroduodénale (FOGD) auparavant. L'endoscopie dans ce cas ne représenterait pas un facteur de risque de contamination par *H. pylori*. Aussi, ces proportions pourraient indiquer que les troubles gastroduodénaux persisteraient dans la majorité des cas en Côte d'Ivoire d'où le recours à la fibroscopie. En effet, l'examen de FOGD est généralement conseillé et réalisé en cas de

troubles gastroduodénaux persistants même après une antibiothérapie. Cette valeur permet de prévoir également une prévalence élevée de l'infection par *H. pylori* en Côte d'Ivoire liée généralement aux échecs thérapeutiques.

Les patients qui avaient des antécédents familiaux de syndrome ulcéreux étaient de 58,6%. *H. pylori* étant la première cause de la maladie ulcéreuse gastroduodénale et vu que la transmission de ce germe est interhumaine nous pouvons donc incriminer l'environnement familial de ces patients comme étant celui ayant favorisé l'infection et parle en faveur de la notion de contamination en milieu familial comme facteur de risque majeur dans la dissémination des souches de *H. pylori* (Okuda *et al.*, 2015; Osaki *et al.*, 2015; Bui *et al.*, 2016). Notons que ce facteur est plus ou moins négligé dans nos contextes familiaux du fait du niveau d'instruction bas de nos populations et probablement d'un manque d'information.

Les épigastralgies représentaient la principale indication de la FOGD avec un taux de 58,8%. Ce taux est différent de ceux trouvés par Attia *et al.* (2001) en Côte d'Ivoire et Ilboudo *et al.* (1997) au Burkina Faso qui représentaient respectivement 64,7% et 69,6%. Ce contraste montre que l'épigastralgie ne serait pas que le seul motif d'indication endoscopique aujourd'hui et qu'il faudrait inclure d'autres motifs certes mineurs mais tout aussi indicatifs tels que l'halitose (mauvaise haleine) et la recherche de signes d'hypertension portale devenant de plus en plus fréquents.

Au plan endoscopique, aucune lésion n'était observée dans 4,9% (aspect normal de la muqueuse gastrique) des cas. Parmi les lésions observées, l'aspect érythémateux de la muqueuse gastrique était la plus observée à un taux de 53,1%. Ce taux est plus élevée que celui indiqué par Attia *et al.* (2001) en Côte d'Ivoire. Cet auteur avait rapporté dans une étude sur les gastrites chroniques, une fréquence élevée de l'érythème muqueux de 42,2%. Ces résultats indiqueraient une augmentation dans la fréquence d'apparition des lésions endoscopiques justifiées par le passage de l'infection à *H. pylori* de la gastrite simple à la gastrite chronique. Cette chronicité de l'infection caractérisée par des lésions et des inflammations au niveau de la muqueuse gastrique dues à la présence de la bactérie (Ernst et Gold, 2000; Avilés-Jiménez *et al.*, 2012).

Prévalence de l'infection selon le test rapide à l'uréase

L'infection à *H. pylori* constitue un défi majeur de santé publique dans certains pays en voie de développement en raison de la morbidité et de la mortalité importante. Dans notre

population d'étude, la prévalence de 58% selon le test rapide de l'uréase reste stable et bas par rapport à celles rapportées par **Malfertheiner et al. (2012)**, **Calvet et al. (2013)** et **Gbonon et al. (2016)** dans les pays en voie de développement (PVD) et en Côte d'Ivoire . En effet, une réelle prise de conscience de l'origine infectieuse des maladies gastroduodénales a été observée au sein de la population des PVD probablement due aux recherches réalisées sur ces maladies ces dernières décennies principalement sur le rôle étiopathogénique de la bactérie. Cela a engendré une prise en charge thérapeutique à base d'anti-infectieux des infections gastroduodénales et a énormément contribué à faire baisser la prévalence de l'infection bien que demeure la problématique de l'émergence de la résistance aux antibiotiques utilisés pour le traitement (**Hu et al., 2017**; **Caliskan et al., 2015**). .

Les résultats du test rapide à l'uréase montraient une association significative entre la présence de *H. pylori* dans les biopsies et le mode d'approvisionnement en eau potable avec $p < 0,001$. Par ailleurs, 94% des patients dont les tests rapides à l'uréase étaient positifs, consommaient de l'eau potable courante fournie par la SODECI. Ces résultats indiquent que l'eau pourrait effectivement être une source de contamination par *H. pylori* tel que décrit par **Aziz et al., (2015)** et que la contamination serait survenue dans les conduites d'acheminement de l'eau vers les foyers. En effet, la proximité des canalisations d'approvisionnement en eau et les égouts d'eaux usées pourrait expliquer la contamination des eaux acheminées dans les foyers surtout en cas de vétustés des installations. Cependant, il serait difficile à ce stade d'incriminer exclusivement l'eau. Il serait envisageable d'associer d'autres sources telles que la contamination interhumaine, l'environnement.

La réalisation antérieure d'une fibroscopie était également associée à la présence de la bactérie ($p = 0,013$). Le taux de positivité du test rapide à l'uréase était plus élevé chez les patients n'ayant pas d'antécédents de fibroscopie. Cela pourrait suggérer une persistance des troubles gastroduodénaux probablement due à la présence de *H. pylori* détectée par le test rapide à l'uréase d'où la nécessité d'une fibroscopie. Aussi, la présence de lésions au niveau de la muqueuse gastrique était fortement associée à la présence de *H. pylori* dans cette muqueuse ($p < 0,001$) et traduit bien le rôle majeur de *H. pylori* dans l'étiopathologie des maladies gastroduodénales connues (**Attia et al., 2001**).

Culture primaire de *H. pylori*

La culture de *H. pylori* est une méthode lourde et coûteuse. Bien qu'ayant un potentiel très important et l'avantage de permettre l'étude de la sensibilité aux antibiotiques, elle souffre

dans la pratique de limites dans sa mise en place. En effet, des conditions de transport des biopsies draconiennes sont nécessaires pour maintenir la viabilité de bactéries fragiles, sensibles à la dessiccation, à l'oxygène, aux variations de température et ceci est souvent difficile à mettre en œuvre (**De Korwin, 2003**). De plus, au laboratoire, il est souhaitable d'utiliser des milieux spécifiques fraîchement préparés ou milieux prêt à l'emploi et d'avoir du personnel dédié à cette recherche ce qui peut poser problème aussi bien dans les petites que dans les grosses structures. **Cassel-Béraud et al., (1997)** à Madagascar avaient eu un taux de réussite de 10,7% à la culture (soit 15 souches isolées sur 140 biopsies) pour une prévalence globale de 59%.

L'échec des cultures dans cette étude pourrait être dû au fait que, les bactéries n'aient pas été suffisamment revivifiées après un long séjour à -80°C avant la mise en culture ou même qu'elles soient mortes et cela vient corroborer l'argument des conditions drastiques de culture de *H. pylori*. Par conséquent, il serait donc envisageable d'utiliser des milieux de transport et de conservation des biopsies tel que Portagerm pylori en cas de délai d'analyse supérieur à 4 heures et d'intégrer dans le protocole de la technique de culture, une courte période de revivification des microorganisme dans un milieu liquide au sang pendant la préparation de l'inoculum. Quant à la conservation des biopsies, l'azote liquide pourrait être nécessaire pour une conservation à long terme des bactéries à -80°C. Aussi, l'utilisation de milieux prêts à l'emploi serait-elle un atout pour la réussite del'isolement de *H. pylori*.

La culture étant une méthode longue, difficile et coûteuse même pour les centres hospitaliers spécialisés dans les pays développés, il se présente comme alternative pour une notion de rapidité des résultats, la biologie moléculaire qui sont des tests d'amplification génique permettant la détection rapide de *H. pylori* et la détermination de sa sensibilité aux antibiotiques.

Diversité génétique des facteurs de virulence chez *H. pylori*

H. pylori possède une multitude de facteurs de virulence codés par des gènes dont le polymorphisme est à la base d'un déterminisme pathologique plus ou moins sévère (**Ogura et al., 2000**). Ces facteurs de pathogénicité peuvent déclencher et moduler la nature de la réponse inflammatoire et altérer l'intégrité de la muqueuse gastrique conférant à cette bactérie un caractère carcinogène et pro-inflammatoire (**Wen et Moss, 2009**).

La présente étude a rapportée la prévalence des gènes *vacA*, *cagA* et *oipA* de *H. pylori* dans les biopsies gastriques avec une prédominance féminine de 62% tel que **Ben Mansour et al. (2010)** qui rapportait dans une étude menée en Tunisie sur les gènes de virulence une prédominance féminine de 84% dans la population d'étude. La majorité des génotypes a été identifiée chez les patients dont l'âge était compris entre 31 et 40 ans. Cette moyenne d'âge est de loin inférieure à celle des pays développés qui est autour de 60 ans (**Pilotto et Malfertheiner, 2002**). Cela confirmerait que dans les pays en voie de développement, la contamination par *H. pylori* se ferait à l'enfance pour atteindre une forme chronique assez persistante à l'âge adulte pour nécessiter une consultation dans un service spécialisé (gastroentérologie). En effet, des études tendent à montrer qu'un individu a très peu de risques d'être infecté après l'âge de 10 ans (**Mégraud, 1998**). Les facteurs de risque de l'acquisition de l'infection par *H. pylori* sont fréquemment liés à la pauvreté. Ils comprennent la promiscuité, le manque d'hygiène, le partage de lits pendant l'enfance et le faible niveau d'éducation des parents (**Traoré et al., 1994; Andoulo et al., 2013**).

Le génotype prédominant dans cette étude était *cagA*⁺ avec 72,8%. Ce résultat corrobore celui de **Breurec et al. (2002)** qui a rapporté une prévalence de 73,3% du génotype *cagA*⁺ au Sénégal alors que **Ben Mansour et al. (2010)** rapportaient une prévalence de 61,6% du génotype *cagA*⁺ chez des patients tunisiens. Cela montre une grande aire de répartition en Afrique de la bactérie sûrement en raison de l'adaptation à son environnement et aux conditions climatiques. En effet, concernant la Côte d'Ivoire et le Sénégal, il existe une proximité géographique et climatique entre ces deux pays par rapport à la Tunisie. L'absence de ce gène chez certaines bactéries confirme que toutes les bactéries n'en sont pas porteuses. La détection du gène *cagA* marque la présence de l'îlot de pathogénicité sur le génome des bactéries. Cet îlot contient un certain nombre de gènes dont les produits sont associés à l'augmentation de la virulence de *H. pylori*, comme l'induction de la production de cytokine dans la muqueuse gastrique, avec pour résultat des gastrites sévères.

Pour le gène *vacA*, l'allèle *vacA* s1a+/m1a+ fortement associé à la production élevée de cytotoxine vacuolisante était dominant à 55,7% (**Moss et Malfertheiner, 2007; Alfizah et al., 2012**). Une étude menée en Afrique du sud rapportait l'absence de cet allèle chez les souches de *H. pylori* isolées (**Letley et al., 1999**). Il existerait donc une disparité au niveau de la répartition géographique des souches de *H. pylori* (**Yamaoka, et al., 1998; ramelah et al., 2005; Tan et al., 2005; Ahmad et al., 2009; Li et al., 2009; Yakoob et al., 2009; Saxena et al., 2011**).

Dans cette étude, le gène *oipA* a été trouvé à 37,2% alors que **Ben Mansour et al. (2010)** trouvaient le gène *oipA* à 90,8% en Tunisie. Ce contraste expliquerait certes la capacité d'adaptation de *H. pylori* à son environnement et aux conditions climatiques, mais également, sa capacité d'adaptation au système de défense de son hôte. En effet, *oipA* est fortement impliqué dans la réponse immunitaire (**Yamaoka et al., 2002; Lu et al., 2005**).

Parmi les patients porteurs des génotypes, 41/70 (58,6%) avaient des antécédents familiaux de syndrome ulcéreux et le génotype *vacA sla+/mla+* était significativement associé ($p=0,012$). Autrement dit, le même génotype est retrouvé chez les membres d'une même famille car le génotype *vacA sla+/mla+* est un sous-type spécifique de *H. pylori*. Ces résultats montrent bien la notion de contamination interhumaine et que l'environnement familial contribuerait à la disséminations de la bactérie (**Okuda et al., 2015; Osaki et al., 2015; Bui et al., 2016**).

Profil génétique des facteurs de virulence dans la chronicité de l'infection

Les génotypes *sla+/mla+*, *cagA+* et *oipA+* identifiés étaient prépondérants dans les cas de gastropathie érythémateuse et de pangastropathie caractérisées par une inflammation et des lésions au niveau de la muqueuse gastrique généralement dues la chronicité de l' infection à *H. pylori* (**Sibony et Jones, 2012**). Cela exprime bien la relation entre le statut génique et les symptômes cliniques dans les populations de patients étudiés.

La présence simultanée des différents gènes *vacA*, *cagA* et *oipA* illustre la composition en mosaïque du génome de *H. pylori*. La combinaison des différents génotypes a permis d'observer un génotype *sla+/mla+/cagA+/oipA+* exclusivement présent dans les cas de gastropathie érythémateuse et de pangastropathie. Cela montre bien la nécessité pour *H. pylori* de posséder sinon d'exprimer plusieurs facteurs de virulence à la fois dans le mécanisme d'infestation de la muqueuse gastrique. Cela serait nécessaire pour sa persistance dans la muqueuse gastrique (**George et al., 2003**). Ce caractère multifonctionnel serait probablement à l'origine de la capacité de *H. pylori* à causer plusieurs affections gastroduodénales (ulcère gastroduodénal, dyspepsie fonctionnelle, lymphome de MALT, cancer gastrique).

Aussi, la détection de génotypes multiples implique-t-elle la présence de souches multiples dans les échantillons cliniques. En effet, 22,9% de souches n'avaient pas pu être identifiées dans cette étude avec les amorces *sla* et *mla* utilisés. Ces souches seraient

probablement d'autres allèles que ceux identifiés dans cette étude à savoir s1b, s2, m2. Il serait possible que plus d'une souche soit acquise dans l'enfance, en particulier dans les pays où la prévalence de *H. pylori* est élevée. Cependant, rien n'indique dans cette étude que plusieurs souches colonisent simultanément (co-infection) l'estomac d'un même individu (**Van Doorn et al., 1998; Gonzalez-Valencia et al., 2000**).

La prévalence élevée du gène *tipA* (58,2%) de *H. pylori* dans notre étude relance la notion de "l'énigme africaine" qui stipulait que malgré le taux élevé de l'infection à *H. pylori* en Afrique, le taux de cancer gastrique était relativement bas (**Holcombe, 1992**). En effet, une étroite implication de la protéine tipA dans la carcinogenèse gastrique a été récemment montré (**Suganuma et al., 2005; 2008**). Aussi, de nombreuses études ont-elles été menées dans le but d'élucider le mécanisme par lequel, *tipA* induirait le cancer gastrique (**Suganuma et al., 2012; Watanabe et al., 2013**). Les données concernant ce gène ne sont pas disponibles en Côte d'Ivoire étant donné sa récente découverte.

Par ailleurs, une prédominance féminine avec un ratio homme/femme de 0,67 confirme les données de l'Alliance Mondiale Contre le Cancer (AMCC). En effet, cette alliance rapportait que concernant l'incidence du cancer dans les pays en voie de développement, les enfants et les femmes jeunes surreprésentés dans les populations apparaissaient proportionnellement plus touchés (**Perrier-Bonnet, 2011**). Cependant, selon l'OMS (**2014**), le cancer gastrique a un taux plus élevé chez l'homme que chez la femme en Côte d'Ivoire avec des facteurs de risques majeurs tels que le tabagisme et l'alcool. En effet, en faisant les rapports au sein du genre (le nombre de femmes porteuses du gène *tipA* et le nombre total de femme chez qui ce gène a été recherché et de même pour les hommes), nous avons des ratios de 0,56 et 0,62 chez la femme et chez l'homme respectivement. Ces résultats montrent bien un facteur de risque du cancer gastrique élevé chez les hommes que chez les femmes comme rapporté par l'OMS. Cette similitude de résultats au niveau du genre pourrait expliquer l'espérance de vie plus basse chez l'homme (52 ans) que chez la femme (54 ans) dans le contexte sanitaire actuel de la Côte d'Ivoire (**OMS, 2014**).

Le gène *tipA* de *H. pylori* était présent chez les patients dont l'âge était compris entre 31 à 40 ans avec une moyenne d'âge de 42 ans (31,6 %). Cela suggère que la contamination par *H. pylori* dans la population ivoirienne se fait dans l'enfance et que l'infection est restée prédominante chez les jeunes adultes (**Konaté et al., 2007; Assi et al., 2010**). Il y aurait donc un réel risque pour l'ivoirien, de développer un cancer gastrique avant l'âge 50 ans, ce qui

pourrait justifier entre autre l'espérance de vie totale de la population ivoirienne qui selon **OMS (2014)**, est de 53 ans à la naissance

Cette étude a révélé que les employés cadres représentaient 31,6% des porteurs du gène *tipA*. Le gène était donc plus représentatif chez les personnes avec une bonne situation socio-économique, car la plupart de ces personnes étaient capables financièrement de faire un examen endoscopique qui coute chère (50 000 frs Cfa $\approx$ 82 dollars $\approx$ 77 euros). La plus grande partie de la population à faible revenu n'en a pas les moyens quant on sait que le taux de pauvreté en Cote d'Ivoire est de 49% et que un ivoirien sur deux vit avec moins de 1 dollar par jour (ou 1 euro/jour) (**PNUD, 2012**). Quoique pris ensemble, le taux global des personnes à faibles revenus (élève-étudiant, sans emploi secteur informel, employés) est beaucoup plus élevé soit à 68,4%. Ces personnes ont néanmoins déboursé la somme pour la réalisation de l'endoscopie. Ce résultat indiquerait plutôt que la fibroscopie est le dernier recours pour les cliniciens en terme de diagnostique dans le suivi du traitement surtout en cas d'échec thérapeutique (**Woodward et al., 2000**).

Par ailleurs, les épigastralgies représentaient la première indication d'endoscopie chez les porteurs du gène *tipA* de *H. pylori* soit 61,4% et que 59,6% avaient des antécédents familiaux de syndrome ulcéreux. Ce qui confirme le rôle étiopathologique primaire de *H. pylori* dans les pathologies gastroduodénales et plus particulièrement dans le cancer gastrique. L'hérédité génétique du cancer et la transmission interhumaine de *H. pylori* seraient des éléments en faveur d'un risque de survenu du cancer gastrique chez ces patients. Des récentes études ont montrés qu'il existe un lien entre les cellules gastriques humaines cancéreuses et le gène *tipA* dans la progression de la tumeur (**Suganuma et al., 2012; Watanabe et al., 2013**). L'implication de *H. pylori* dans l'évolution de l'infection vers les formes les plus sévères telles que le cancer gastrique a été bien établie (**Suerbaum et Michetti, 2002; Malfertheiner et al., 2009**). Il a été constaté dans cette étude que plus de la moitié des patients porteurs du gène *tipA* (56,1%) avait une gastropathie érythémateuse à l'endoscopie; autrement dit, une présence massive de la bactérie chez les patients avec les muqueuses gastriques où persistaient l'inflammation d'où les rougeurs sur ces muqueuses stomacales. En effet, ces formes de gastrites sont généralement associées au stress oxydatif généré au cours de l'infection par *H. pylori* contribuant ainsi au dysfonctionnement cellulaire et à des dommages oxydatifs directs au niveau de l'ADN (**Obst et al., 2000**).

Tous ces données relatives au gène *tipA* de *H. pylori* pourrait suggérer la présence de ce gène comme bio marqueur dans la détection précoce et la prévention du cancer gastrique.

La prévalence moléculaire et diversité génétique de la résistance aux antibiotiques utilisés

L'une des principales causes de l'échec thérapeutique est la résistance des microorganismes aux antibiotiques utilisés tels que l'amoxicilline (AML), la clarithromycine (CLR) et le métronidazole (MTZ) (Paul *et al.*, 2001; Gerrits *et al.*, 2006; Matteo *et al.*, 2006; Abdollahi *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2013;). En Côte d'Ivoire, il était important de connaître le niveau de résistance de *H. pylori* à AML, CLR et MTZ du faite que ces molécules soient utilisées dans l'éradication de *H. pylori* et principalement, à cause du véritable problème de santé publique que constitue cette résistance. Dans certains pays tel que la Colombie, cette résistance a entraîné le remplacement de ces antibiotiques par les fluoroquinolones (Trespacios-Rangél *et al.*, 2016).

Le pourcentage de résistance au métronidazole en Côte d'Ivoire (12,2 %) est bas par rapport à celui des pays en voie de développement (Sénégal : 90 % (Seck *et al.*, 2009), Nigéria: 55 % (Suck *et al.*, 2011), Afrique du sud: 95,5 % (Tanih *et al.* 2011)) et des pays développés tels que la France (23,9 %) (Raymond *et al.*, 2010), le Canada (32 %), l'Angleterre (25 %). La résistance au MTZ est actuellement le type de résistance le plus fréquent chez *H. pylori* et est, ainsi que d'autres types de résistance aux antibiotiques, l'une des principales causes de l'échec thérapeutique (Marais *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004). Ces différences dans les niveaux de résistance sont aussi bien associées à l'utilisation de l'imidazole dans le traitement de diverses maladies parasitaires et troubles gynécologiques que à l'accès non contrôlé de cette molécule dans certains pays. Des études ont montré un taux plus élevé de résistance au MTZ chez les patients sud-africains parce qu'il était l'un des antibiotiques les plus couramment utilisés dans leurs systèmes de santé (Tanih *et al.*, 2011). Par conséquent, une faible résistance (12,2 %) de *H. pylori* au MTZ dans cette étude par rapport aux pays développés serait probablement due à l'usage modérée de cette molécule en Côte d'Ivoire. Cela favoriserait l'utilisation du MTZ en traitement de première intention par rapport à l'amoxicilline comme suggérer par Zaki *et al.*, (2016) qui rapportait un taux 12,8 % en Egypte similaire à celui de cette étude.

Le pourcentage de résistance à la clarithromycine (26,5%) situe la Côte d'Ivoire légèrement au dessus des taux moyens européens et américains qui sont compris entre 23 et

25% (**Mégraud, 2004**) mais largement supérieur au taux des pays africains (13%) où la molécule a été testée (**Hunt et al., 2011**). La fréquence des résistances suivant les pays est liée à l'utilisation des macrolides, en particulier dans le traitement des infections respiratoires (**Kato et al., 2002**). Ceci a été montré par l'étude de **De Koster et al. (1997)** en Belgique où le taux de résistance est passé de 2,2 % en 1990 à 11,1 % en 1996. Ce taux de 26,5 % en Côte d'Ivoire est certainement dû à une utilisation antérieure des macrolides et qui sont de moins en moins prescrits car de manière générale, les taux de résistance à la clarithromycine reflètent la consommation annuelle d'agents macrolides dans la population.

L'amoxicilline semblait jusque là épargnée par le problème de résistance. En effet, le taux de résistance le plus élevé décrit en 2004 était inférieur à 1% (**Mégraud, 2004**). Cependant, la présente étude rapporte un taux de résistance élevé de 58,2% à l'amoxicilline. Une des raisons serait la pression médicamenteuse vis-à-vis de cette molécule en médecine humaine. En effet, l'amoxicilline est utilisée en Côte d'Ivoire en première intention pour le traitement d'infections bénignes des voies respiratoires chez l'adulte et chez l'enfant ainsi que dans certains troubles gastrointestinales. Des études menées en 2013 dans des infections urinaires communautaires en Côte d'Ivoire rapportaient un taux de résistance de plus 85% à l'amoxicilline chez des souches d'*Escherichia coli* (**Abo-Traoré, 2013**) et de 51 à 85% chez les entérobactéries (**Rabirad et al., 2014**). Cette large utilisation de la molécule et l'automédication observée dans nos populations du fait de la non réglementation de l'achat des antibiotiques constituerait un facteur majeur dans le taux important de résistance à l'amoxicilline.

Ces données devraient être utilisées pour orienter le médecin à utiliser la quadruple thérapie avec un IPP, le bismuth, les tétracyclines et le métronidazole comme alternative à la trithérapie en première intention, la première étant utilisée pour la population avec des taux de résistance inférieurs à 15-20 % pour la clarithromycine et l'amoxicilline.

Une résistance croisée (8,2%) aux trois antibiotiques étudiés et sous entendu aux trois familles d'antibiotiques a montré qu'à l'évidence, l'automédication, le non-respect des protocoles d'antibiothérapie, l'instauration d'un traitement antibiotique en l'absence probable d'antibiogramme standard favorisent l'émergence de bactéries résistantes à une ou plusieurs antibiotiques. Il devient plus que nécessaire de sensibiliser les populations au bon usage des antibiotiques.

Par ailleurs, une faible résistance croisée à l'amoxicilline et au métronidazole (4,1%) a été observé et aucune résistance croisée à la clarithromycine et au métronidazole n'a été identifiée dans cette étude. Cela pourrait orienter le protocole du traitement de *H. pylori* vers l'association en priorité de ces deux molécules (clarithromycine et métronidazole) surtout en cas d'allergies aux bêta-lactamines.

Le taux de détection des gènes de virulence était élevé dans les cas de résistance croisée à AML et CLR (>30%). Ce qui indiquerait qu'une telle association d'antibiotiques (AML et CLR) devrait être proscrit dans le traitement de *H. pylori* en Côte d'Ivoire sous réserve d'un antibiogramme ou de la recherche des gènes de résistance. De plus, les génotypes oipA+ et tipA+ étaient exclusivement détectés dans les cas de résistance croisée aux trois antibiotiques AML, CLR et MTZ. Ce résultat pourrait suggérer que les souches les plus persistantes seraient les plus résistantes aux antibiotiques et donc impliquées dans l'évolution de l'infection vers les formes les plus sévères car la persistance de *H. pylori* dans l'estomac constitue une étape clé dans le passage de la gastrite aiguë vers une gastrite chronique (Kusters *et al.*, 2006; Augusto *et al.*, 2007; Peek *et al.*, 2010; Chaturvedi *et al.*, 2014)

Les facteurs de risque infectieux associés à la résistance aux antibiotiques utilisés

La consommation d'alcool et de tabac n'avaient pas de liens significatives avec la présence des gènes étudiés ($p=0,48$). Nous ne pouvons donc pas attribuer la résistance à ces facteurs car aucun des patients ne consommait du tabac. La majorité des patients n'avait jamais subi une endoscopie avant, peu de patients l'avaient déjà faite (moins de 20%), ce qui suggère que la résistance détectée dans cette étude était primaire et qu'il s'agirait de nouveaux cas d'infections par *H. pylori*. Par ailleurs, la majorité des porteurs des gènes avaient des antécédents familiaux de syndrome ulcéreux confirmant ainsi la dissémination intrafamiliale de *H. pylori* (Mégraud, 1998; Osaki *et al.*, 2015; Bui *et al.*, 2016). Cependant, les cas de contamination par la même souche n'ont pas été prouvés dans cette étude.

Les patients porteurs des gènes de résistance présentaient en majorité des lésions de "gastrite endoscopique" (gastropathie érythémateuse et une pangastropathie) caractérisées par une inflammation et des rougeurs au niveau de la muqueuse gastrique liés à la présence et à la persistante de *H. pylori* dans la muqueuse telles que décrites par Attia *et al.* (2001) et Ohata *et al.* (2004). Les cas de muqueuse gastrique normale à l'endoscopie n'ont pas été décrits. Ainsi, la présence des gènes de résistance aux antibiotiques utilisés pour le traitement conférerait à *H. pylori* la capacité de déjouer toutes les tentatives d'éradication et de persister

dans la muqueuse. Par conséquent, les gènes de résistance ne sont observés que dans les cas de pathologies et non dans la muqueuse gastrique à aspect normal (**Jeong *et al.*, 2000 ; Gerrits *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2009**). La résistance aux antibiotiques de *H. pylori* favoriserait la persistance de l'infection et son évolution chronique vers les formes sévères.

Identification des mutations ponctuelles dans les gènes de résistance aux antibiotiques utilisés

Les schémas classiques de la trithérapie pour l'éradication de *H. pylori* ont récemment montré une efficacité décevante due principalement à l'émergence de souches résistantes à MTZ et CLR (**O'Connor *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2014**). Le mécanisme de résistance aux antibiotiques chez *H. pylori* est associé à des mutations ponctuelles et des substitutions d'acides aminés dans des gènes clés spécifiques à la résistance au niveau de l'*ARNr 23S* (**Abdollahi *et al.*, 2011**), *rdxA/frxA* (**Ho *et al.*, 2010**) et *pbp1* (**Kim et Kim, 2013**).

La résistance au MTZ dans cette étude était peu élevée et liée à des substitutions d'acides aminés (K50L, G98V, V148S, L150S, P156A, R164L, N213S et K32R, I59K, L149S, A215E) pas encore rapportées dans le gène *rdxA* et *frxA*. Les substitutions dans les protéines associées à la résistance au MTZ (*rdxA* et *frxA*) ont été identifiées seulement dans deux biopsies. En outre, il est très difficile lorsque plusieurs mutations sont présentes, de déterminer celles qui sont significatives en particulier étant donné que l'analyse structurale de *rdxA* a montré que certains changements d'acides aminés notés ne peuvent être responsables de la résistance antibiotiques (**Martínez-Júlvez *et al.*, 2012**).

La plupart des résistances au MTZ proviennent de l'inactivation de RdxA comme l'ont montrés des rapports antérieurs de **Jeong *et al.* (2001)** dans le développement de la résistance au MTZ chez des canadiens. En effet, ces auteurs ont conclu que le développement de la résistance au MTZ nécessite l'inactivation de *rdxA* seule ou de *rdxA* et *frxA* en fonction du génotype bactérien. La résistance au MTZ se produit rarement à la suite de l'inactivation de *frxA* seul (**Jeong *et al.*, 2001**), mais les mutations dans *frxA*, qui code pour la NADPH flavine oxydoréductase améliore la résistance de MTZ en présence de mutations *rdxA* (**Kwon *et al.*, 2000; Binh *et al.*, 2015**).

Par ailleurs, les nombreuses mutations ponctuelles dans le gène *rdxA/frxA* du MTZ dans la présente étude corrobore celle de **Sisson *et al.* (2000)** qui soulignait que l'utilisation extensive de MTZ contre d'autres agents pathogènes chez les personnes avec une infection chronique

par *H. pylori* peut stimuler la fréquence accrue de la mutation chez *H. pylori*, induisant ainsi l'émergence d'une résistance contre le MTZ et d'autres antibiotiques.

Globalement, les substitutions nucléotidiques les plus fréquemment rapportées au sein du gène du 23S ARNr responsables de la résistance au CLR dans les isolats cliniques de *H. pylori* sont 2142A>C, 2142A> G et 2143A> G (Avec 2116A> G et 2182T> C) (**Versalovic *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2009, Abdollahi *et al.*, 2011**). La présente étude n'a pas pu identifié ces substitutions décrites ci-dessus mais a identifié une nouvelle substitution nucléotidique (2616 T> C) dans le gène de l'ARNr 23S des trois souches présentant des gènes de résistance au CLR. Cette mutation en termes d'acides aminés correspond au remplacement d'un codon de la sérine par un autre codon de la sérine. Une telle mutation est silencieuse (même sens) et est à surveiller car pourrait engendrer dans des générations futures des clones mutants avec des mutation silencieuse ou pas. En effet, pendant le processus de réplication chez les eucaryotes, un don du fragment portant la mutation entrainera la synthèse d'un nouveau brin complémentaire qui conduira à la synthèse d'ADN d'individu dit muté du fait de l'insertion d'une nouvelle liaison. L'apparition de telles mutations pourraient être à l'origine d'apparition de clones "hyper résistants".

Concernant l'amoxicilline (AML) la substitution de la Lysine par la Leucine en position 102 (K102L) était prédominante (53,8%). Une substitution à la position 62 de la glycine par l'alanine (G62A) a été également retrouvé chez 6/13 soit 46,2% des souches. Par ailleurs, la plupart des mutations décrites 5/13 souches étaient des substitutions par la Lysine. Ces substitutions n'ont pas été rapporté dans des études antérieures, car les taux de résistance à AML sont très rares voire inexistant dans d'autres pays (**Mégraud, 2004; Nishizawa et Suzuki, 2014**) tels que le Brésil (**Picoli *et al.*, 2014**) et l'Israël (**Peretz *et al.*; 2014**).

Étant donné que les substitutions de nucléotides ne sont pas toujours liées aux résistances aux antibiotiques associées aux gènes, elles peuvent ne pas être responsables de la pharmaco résistance. Ainsi, d'autres études notamment une analyse mutagène par transformation s'avèrent nécessaires pour justifier toute association directe de ces nouvelles variations nucléotidiques dans les gènes étudiés et la capacité de conférer la résistance à *H. pylori*.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

I- CONCLUSION

Cette étude avait pour but de déterminer la diversité génétique de la virulence et de la résistance aux antibiotiques de *H. pylori* impliqué dans les infections gastroduodénales chroniques. Les génotypes *vacA*, *cagA*, *oipA* et *tipA* de *H. pylori* ont été identifiés à partir de biopsies gastriques et les profils génotypiques *sla+/mla+/cagA+/oipA+* et *tipA+* étaient impliqués dans la chronicité de l'infection. La présence de multiples génotypes seraient donc nécessaires à la colonisation et la persistance de *H. pylori* dans la muqueuse gastrique.

Les données relatives au gène *tipA* de *H. pylori* rapportées dans cette étude pourrait suggérer la recherche de ce gène comme marqueur dans la détection précoce et la prévention du cancer gastrique en Côte d'Ivoire.

La prévalence moléculaire de la résistance aux antibiotiques utilisés pour le traitement de *H. pylori* en Côte d'Ivoire a également été déterminée et les résultats ont montré un niveau de résistance relativement élevée de *H. pylori* (58,2%) vis-à-vis de l'amoxicilline. Une résistance croisée de *H. pylori* aux trois antibiotiques amoxicilline, clarithromycine et métronidazole utilisés pour le traitement de l'infection a été observée à 8,2%.

Par ailleurs, aucune résistance croisée au couple clarithromycine et métronidazole associé n'a été identifiée dans cette étude. Cela pourrait orienter le protocole du traitement de *H. pylori* vers l'association en priorité de ces deux molécules (clarithromycine et métronidazole) dans le contexte hospitalier ivoirien surtout en absence d'antibiogramme et en cas d'allergies aux bêta-lactamines.

Les patients porteurs de *H. pylori* possédant des gènes de résistance aux antibiotiques présentaient en majorité des lésions caractérisées par une inflammation et des rougeurs au niveau de la muqueuse gastrique liées à la présence et à la persistance de *H. pylori*. Ce qui vient étayer sinon confirmer l'implication de *H. pylori* dans la pathogenèse des pathologies gastroduodénales

La présence de mutations ponctuelles dans les gènes conférant la résistance aux antibiotiques utilisés pour le traitement ont été observés et des substitutions d'acides aminés ont été décrites. Cependant, cette étude ayant porté sur un nombre réduit d'échantillons, des études ultérieures seront nécessaires pour justifier toute association de ces nouvelles variations nucléotidiques à la résistance aux antibiotiques et élucider les conséquences directes de ces mutations.

II- PERSPECTIVES

Du point de vue scientifique, il semble pertinent d'étendre les investigations à la recherche des relations entre facteurs de virulence et données histologiques. Cette étape permettra certainement d'utiliser ces facteurs comme marqueurs prédictifs des pathologies sévères telles que le cancer gastrique.

Il serait par la suite intéressant d'envisager la mise en routine de la détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques. Cette approche offrira aux prescripteurs et aux populations démunies un plateau technique local avec une technique performante de pointe telle que la biologie moléculaire pour le diagnostic et le suivi de ces pathologies gastriques. Ceux-ci étant confrontés à de véritables problèmes d'échecs thérapeutiques avaient jusque là recours à l'expédition des échantillons vers la France via des laboratoires privés locaux pour ces diagnostics. Elle permettra également d'orienter les cliniciens dans la prescription de traitement d'éradication de *H. pylori* en attendant d'améliorer les techniques de culture en vue de la réalisation de tests de sensibilité.

Une étude multidisciplinaire visant une plus grande population d'étude pourrait être envisagée et réunirait microbiologistes, biologistes moléculaires, anatomo-pathologistes et gastro-entérologues avec pour résultat final, aboutir à la constitution une base de données suffisantes pour la mise en place d'un consensus national dans la prise en charge de l'infection à *H. pylori* dans les pathologies gastriques en Côte d'Ivoire. Cette mise en place serait d'autant plus facilitée que les parties prenantes auraient été acteurs du projet d'étude.

La recherche de substances naturelles actives sur les souches de *H. pylori* pourrait être bénéfique dans la lutte pour l'éradication de *H. pylori* et la prévention du cancer gastrique.

Une recommandation particulière serait à nos autorités sanitaires de mener des actions de sensibilisation des populations du réel risque de l'infection par *H. pylori* surtout en environnement familial et chez l'enfant. Aussi, elles pourraient accorder une attention particulière à la régulation des antibiotiques fréquemment consommés.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Abdollahi H., Savari M., Javad Zahedi M., Darvish Moghadam S. et Hayatbakhsh Abasi M., 2011 - Detection of A2142C, A2142G, and A2143G Mutations in 23s rRNA Gene Conferring Resistance to Clarithromycin among *Helicobacter pylori* Isolates in Kerman, Iran. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 36 (2): 104-10.

Abo-Traore A. V., 2013 - Résistance des souches d'*Escherichia coli* responsables d'infection urinaire communautaire collèges chez l'adulte de 2008 à 2010 à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. *Bibliothèque Virtuelle de l'Enseignement Supérieur et Recherche Scientifique*, p1.

Ahmad T., Sohail K., Rizwan M., Mukhtar M., Bilal R. & Khanum A., 2009 - Prevalence of *Helicobacter pylori* pathogenicity-associated cagA and vacA genotypes among Pakistani dyspeptic patients. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 55: 34–38.

Akopyants N. S., S. W. Clifton, D. Kersulyte, J. E. Crabtree, B. E. Youree, C. A. Reece, N. O. Bukanov, E. S. Drazek, B. A. Roe, et D. E. Berg., 1998 - Analyses of the Cag Pathogenicity Island of *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology*, 28 (1): 37-53.

Alfizah H., Ramelah M, Rizal A.M., Anwar A.S., Isa M.R., 2012 - Association of Malaysian *Helicobacter pylori* virulence polymorphisms with severity of gastritis and patients' ethnicity. *Helicobacter*, 17:340–349.

Amir Tidadini Z.C., 2003- Pathologies gastriques et infections à *Helicobacter pylori* : Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat d'état en sciences médicales à la faculté de Médecine d'Alger. pp 13-34.

Andersen L.P. & Lone R., 2009 - *Helicobacter pylori*-Coccoid Forms and Biofilm Formation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 56 (2): 112-15.

Andersen-Nissen E., Kelly D. S., Katie L. S., S.L. Rassoulia Barrett, B.T. Cookson, S.M. Logan, et A. Aderem. 2005 - Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* .102 (26) : 9247-52.

Andoulo F.A., Noah Noah D., M. Tagni-Sartre, E. Claude Ndjitoyap Ndam, et K. Ngu Blackett, 2013. - « Epidémiologie de l'infection à *Helicobacter pylori* à Yaoundé: de la particularité à l'énigme Africaine ». *The Pan African Medical Journal* 16 (novembre).

- Asahi M., T. Azuma, S. Ito, Y. Ito, H. Suto, Y. Nagai, Tsubokawa M., 2000** - *Helicobacter pylori* CagA Protein Can Be Tyrosine Phosphorylated in Gastric Epithelial Cells ». *The Journal of Experimental Medicine*, 191 (4): 593-602.
- Assi C., Ndah, K.J., Allah-Kouadio, E., 2010** - Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* et lésions précancéreuses du cancer gastrique chez les patients souffrant d'épigastralgies chroniques. *Revue Africaine de Pathologie*, 9: 25-31.
- Atherton J.C., 1998** - *H. pylori* virulence factors. *British Medical Bulletin*, 54: 105-2.
- Atherton J.C., 2006** - The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. *Annual Review of Pathology*, 1: 63-96.
- Atherton J.C., Peek R.M. Jr., Tham K.T., 1997** - Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 112: 92-99.
- Atherton J.C., Peek R.M. Jr., Tummuru M.K., Blaser M.J., Cover T.I., 1995** - Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 17771-7.
- Attia K.A., N'dri Yoman T., Diomande M.I., Mahassadi A., Sogodogo I., Bathaix Y.F., 2001** - Aspects cliniques, endoscopiques et histologiques des gastrites chroniques à *Helicobacter pylori* en Côte d'Ivoire: étude de 102 patients. *Bulletin Society of Pathology Exotic*, 94: 5-7.
- Attia K.A., N'dri Yoman T., Mahassadi A., Diomande M.I., 1999** - Ulcères gastroduodénaux et infection à *Helicobacter pylori* en Côte d'Ivoire: à propos de 64 cas. Presses Universitaires de Côte d'Ivoire. *Revue Interne de Science Médicale*, 1: 13-18.
- Audibert C., C. Burucoa, B. Janvier, et Fauchère J.L., 2001** - Implication of the Structure of the *Helicobacter pylori* cag Pathogenicity Island in Induction of Interleukin-8 Secretion. *Infection and Immunity* 69 (3): 1625-29.
- Augusto A.C., F. Miguel, S. Mendonça, Pedrazzoli J Jr., et Gurgueira S.A., 2007** - Oxidative stress expression status associated to *Helicobacter pylori* virulence in gastric

- diseases. *Clinical Biochemistry* , 40 (9–10): 615–22.
- Avilés-J., Reyes-Leon F.A., Nieto-Patlán E., Hansen L.M., J. Burgueño, Ramos I.P., Camorlinga-PonceM., 2012.** In Vivo Expression of *Helicobacter pylori* Virulence Genes in Patients with Gastritis, Ulcer, and Gastric Cancer. *Infection and Immunity*, 80 (2): 594–601.
- Aziz R.K., Khalifa M.M., Sharaf R.R.. 2015.-** Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *Journal of Advanced Research* 6 (4): 539–47.
- Bagheri N., Rahimian G., Salimzadeh L., Azadegan F., Raffieian-Kopaei M., Taghikhani A., et Shirzad H.. 2013 -** Association of the virulence factors of *Helicobacter pylori* and gastric mucosal interleukin-17/23 mRNA expression in dyspeptic patients. *EXCLI Journal*, 12 (1): 5–14.
- Bagnoli F., Buti L., Tompkins L., Covacci A. et Amieva M. R. 2005.** *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (45): 16339–44.
- Banatvala N., Lopez C.R, Owen R., Abdi Y., Davies G., 1993 -** *Helicobacter pylori* in dental plaque. *Lancet*,; 341: 380.
- Belair C., Baud J., Chabas S., Sharma C.M., Vogel J., Staedel C., Darfeuille F. 2011 -** *Helicobacter pylori* interferes with an embryonic stem cell micro RNA cluster to block cell cycle progression. *Science*, 2 (Octobre): 7.
- Bellack N.R., M.W. Koehoorn, Y.C. Macnab, M.G. Morshed. 2006 -** A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. *Epidemiology and Infection*, 134 (3): 439–49.
- Ben Mansour K., Fendri C., Zribi M., Masmoudi A., Labbene M., Fillali A., Benmami N., Najjar T., Meherzi A., Sfar T., Burucoa C., 2010 -** Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, iceA and oipA genotypes in Tunisian patients. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9:10–17.
- Bigard M.A., 1994 -** Peut-on contaminer les malades par *Helicobacter pylori* lors d'une

gastroscopie ? Gastrographie, Laboratoire Astra (France), numéro spécial hors série Janvier. 17-18.

- Binh T.T., Suzuki R., Huyen Trang T.T., Kwon D.H. et Yamaoka Y. 2015.** - Search for Novel Candidate Mutations for Metronidazole Resistance in *Helicobacter pylori* Using Next-Generation Sequencing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59 (4): 2343-48
- Blaser M.J., 1997** - Ecology of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Journal of Clinical Investigation*, 100: 759-62.
- Bliss C.M., Golenbock D.T., Keates S., Linevsky J.K. et Kelly C.P., 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. *Infection and Immunity*, 66 (11): 5357-63.
- Bobby B., 2009** - Diagnostic bactériologique et moléculaire de *Helicobacter pylori* dans les biopsies gastriques de 79 patients du service de gastroentérologie du CHU de Cocody. Thèse de médecine, UFR des Sciences médicales d'Abidjan, Côte d'Ivoire, 120p.
- Boehnke K.F., Eaton K.A., Valdivieso M., Baker L.H. et Xi C., 2015.** Animal Model Reveals Potential Waterborne Transmission of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 20 (5): 326-33.
- Boren T., Falk P., Roth K.A., Larson G., 1993** - Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, 262 (5141): 1892-5.
- Boyanova L., 2011** - Role of *Helicobacter pylori* virulence factors for iron acquisition from gastric epithelial cells of the host and impact on bacterial colonization. *Future Microbiology*, 6 (8): 843-46.
- Breurec S., R. Michel, A. Seck, S. Brisse, D. Côme, F. B. Dieye, B. Garin, M. Huerre, M. Mbengue, C. Fall, D. N. Sgouras, J. M. Thiberge, D. Dia And J. Raymond., 2012** - Clinical relevance of *cagA* and *vacA* gene polymorphisms in *Helicobacter pylori* isolates from Senegalese patients. *Clinical Microbiology and Infectious*, 18: 153-9.

- Boncristiano M., Paccani S. R., Barone S., Ulivieri C., Patrussi L., Ilver D., Amedei A., D'Elios M. M., Telford J.L. et Baldari C.T. 2003.** - The *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin Inhibits T Cell Activation by Two Independent Mechanisms. *The Journal of Experimental Medicine*, 198 (12): 1887-97.
- Brugmann D., Laville M.F., Cantet F., Broutet N., 1996.**- Is the nurse's work in an emergency ward a risk factor for *Helicobacter pylori* infection? *Gastroenterology* (abst).
- Bui D., Brown H.E., Harris R.B., et Oren E., 2016** - Serologic Evidence for Fecal–Oral Transmission of *Helicobacter pylori*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94 (1): 82-88.
- Burucoa C., 2010** - [Diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection in children]. *Archives de Pédiatrie: Organe Officiel de la Société française de Pédiatrie*, 17 (6): 814-15.
- Burucoa C., 2012** - Actualités *Helicobacter pylori*. *FMC Val de Creuse. Argenton-sur-Creuse*. pp 1-47.
- Busler V.J., Torres V.J., McClain M.S., Tirado O., Friedman D.B. et Cover T.L. 2006.** - Protein-Protein Interactions among *Helicobacter pylori* Cag Proteins. *Journal of Bacteriology*, 188 (13): 4787-4800.
- Caliskan R., Tokman H.B., Erzin Y., Saribas S., Yuksel P., Bolek B.K., Sevuk E.O., 2015** - Antimicrobial Resistance of *Helicobacter pylori* Strains to Five Antibiotics, Including Levofloxacin, in Northwestern Turkey. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 48 (3): 278-84.
- Calvet X., Ramirez Lazaro M.J., Lehours P., Megraud F., 2013** - Diagnosis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 18(Suppl. 1):5–11.
- Cassel-Beraud A.M., Peghini M., Mouden J.C., Rajaonarison P., 1997** - Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* à Tananarive, Madagascar. *Bulletin Society of Pathology Exotic*; 90(1):6-9.
- Cendron L.& Zanotti G., 2011** - Structural and functional aspects of unique type IV Secretory components in the *Helicobacter pylori* cag-pathogenicity island. *FEBS Journal*, 278(8): 1223-1231.

- Censini S., C. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, et Covacci A., 1996** - Cag, a Pathogenicity Island of *Helicobacter pylori*, Encodes Type I-Specific and Disease-Associated Virulence Factors . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (25): 14648-53.
- Chandran V., Fronzes R., Duquerroy S., Cronin N., Navaza J., et Waksman G., 2009** - Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature*, 462 (7276): 1011-15.
- Chaturvedi R., M. Asim, M. B. Piazuelo, F. Yan, D.P. Barry, J.C. Sierra, Delgado A.G., 2014** - Activation of EGFR and ERBB2 by *Helicobacter pylori* Results in Survival of Gastric Epithelial Cells With DNA Damage ». *Gastroenterology*, 146 (7): 1739-1751.
- Chey W.D. & Wong B.C., 2007** - American College of Gastroenterology, Guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *American Journal of Gastroenterology*, 102: 1808-25.
- Christie P. J. & Vogel J. P., 2000** - Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends in microbiology*, 8 (8): 354-60.
- Contreras M. & Labigne A., 2003** - Virulence factors of *Helicobacter pylori*: what are they?. *Gastroenterology of Clinical Biology*.27(3 Pt 2):401-8.
- Covacci A., Telford J.L., Del Giudice G., Parsonnet J., 1999** - *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, 284: 1328-33.
- Covacci A. & Rappuoli R., 2000** - Tyrosine-Phosphorylated Bacterial Proteins: Trojan Horses for the Host Cell. *The Journal of Experimental Medicine*, 191 (4): 587-92.
- Cover T.L. & Blanke S.R. 2005** - *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature Review of Microbiology*, 3(4): 320-332.
- Cover T.L., Krishna U.S., Israel D. A. et Peek R. M., 2003.** - Induction of Gastric Epithelial Cell Apoptosis by *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin. *Cancer Research*, 63 (5): 951-57.
- Cover T. L. & Blaser M.J., 2009** - *Helicobacter pylori* in health and disease.

Gastroenterology, 136 (6): 1863-73.

Cover T.I., Tummuru M.K., Cao P., Thompson S.A., 1994 - Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *Journal of Biology and Chemistry*, 269: 10566-73.

D'Elia L., Galletti F., et Strazzullo P., 2014 - Dietary Salt Intake and Risk of Gastric Cancer. *Cancer Treatment and Research* 159: 83-95.

De Korwin J.D. & Lozniewski A. 2000 - *Helicobacter pylori*: notions fondamentales et perspectives. *Encyclopédie Médical de Chirurgie, Gastroénerologie*, 9-000-B-60, 8p.

De Korwin J.D., 2004 - Infection à *Helicobacter pylori* et résistance aux antibiotiques. *La revue de médecine interne*, 25: 54-64.

De Korwin J.D., 2013 -Nouvelles recommandations pour le diagnostic et le traitement de l'infection à *Helicobacter pylori*. *La Presse Médicale*, 42(3): 309-17.

De Korwin JD. 2007. *Helicobacter pylori* infection: what's new after the Nobel Prize? *Revue de Médecine Interne*, 28(6): 359-62.

De Korwin JD., 2003 - *Helicobacter pylori*. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 31,12: 1110-7.

De Korwin J. D., 2003 - Avantages et inconvénients des différentes méthodes diagnostiques de l'infection à *H. pylori*. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 27(3-C2): 380-390.

De Koster E., Cozzoli A. & Vanderborre C., 1997 - *H. pylori* resistance to macrolide increases, to imidazoles remains stables. *Gastroenterology*, 112(A): 99.

Delchier J.C., 2007 - Quelles recommandations après la troisième conférence de consensus européenne (Maastricht III)? *La lettre de l'hépto-gastroentérologue*, 10(5-6): 87-90.

Deltenre M., De Koster E., Caucheteur Otero J. & Jonas C ., 1996 - Comment éradiquer *Helicobacter pylori* en 1995 ? Revue critique des traitements disponibles. *Gastroentérologie. Cliniclal Biology*, 20: 44-52.

Deltenre M. & Dekoster E., 2000 - How come I've got it? (A review of *Helicobacter pylori*

- transmission). *European Journal of Gastroenterology Hepatology*, 12 (5): 479-82.
- Deltenre M., Nyst J.F., Jonas C., Glupzynski Y., De Prez C., Burette A., 1989** - Données cliniques, endoscopiques et histologiques chez 1100 patients dont 574 colonisés par *Campylobacter pylori*. *Gastroenterology of Clinical Biology*, 13(B): 89-95.
- Dewhirst F.E., Fox J.G. & On S.L., 2000** - Recommended Minimal Standards for Describing New Species of the Genus *Helicobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6): 2231-37.
- Donze N., Peter O., Riand R., Beloeil N., Consilia, Sion., 2005** - Détection de la présence d'*Helicobacter pylori*. *Caduceus express*, 7- Numéro 9.
- Dooley CP, Cohen H, Fitzgibbons PL, Bauer M.** Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *New England Journal Medical*; 321(23): 152-6.
- Effi A.B., Koffi KE, Aman NA, Doukouré B., N'dah K.J., Koffi K.D., Kouyaté M, Kouï BB, Hondé M., Diomandé M.I. 2013** - Descriptive epidemiology of cancers in Cote d'Ivoire. *Bulletin du Cancer*, 100(2): 119-25.
- Ekaza E., Coulibaly N'golo M-D.G., Boka BM, Ehuie P., Diomande M.L., Dosso M., 2007** - Présence du gene cag A et activité de *H. pylori* au niveau de la muqueuse chez 30 patients présentant une symptomatologie clinique à Abidjan. *Bio Africa*, 4: 37-42.
- Engstrand L., 2001** - *Helicobacter* in Water and Waterborne Routes of Transmission ». *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)*, 30(S): 80-84.
- Enroth H., Wreiber K., Rigo R., Risberg D., Uribe A. & Engstrand L., 1999** - In Vitro Aging of *Helicobacter pylori*: Changes in Morphology, Intracellular Composition and Surface Properties. *Helicobacter*, 4 (1): 7-16.
- Ernst P.B. & Gold B.D., 2000** - The Disease Spectrum of *Helicobacter pylori*: The Immunopathogenesis of Gastroduodenal Ulcer and Gastric Cancer. *Annual Review of Microbiology*, 54 (1): 615-40.
- Ertem D., 2013** - Clinical Practice: *Helicobacter pylori* Infection in Childhood. *European*

Journal of Pediatrics, 172 (11): 1427-34.

Fauconnier A., Chapron C., Dubuisson J-B., Vieira M., Dousset B. et Bréart G. 2002. - Relation between Pain Symptoms and the Anatomic Location of Deep Infiltrating Endometriosis. *Fertility and Sterility*, 78 (4): 719-26.

Feldman R.A., 2001- Epidemiologic observations and open questions about disease and infection caused by *Helicobacter pylori*. In: Achtman M, Suerbaum S, eds. *Helicobacter pylori: molecular and cellular biology*. Wymondham, United Kingdom: Horizon Scientific Press, 29-51.

Ferrand J. et Ménard A., 2009- *Helicobacter pylori* dans un modèle de carcinogénèse gastrique impliquant les cellules souches mésenchymateuses : Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat à l'Université Bordeaux 2, France, pp 32-49.

Ferrand J., Roumanes D., Pitard V., Moreau J.F., Mégraud F., Lehours P., 2008 - *Helicobacter*, 13(3): 167-73.

Fischer W., Püls J., Buhrdorf R., Gebert B., Odenbreit S., et Haas R., 2001 - Systematic Mutagenesis of the *Helicobacter pylori* Cag Pathogenicity Island: Essential Genes for CagA Translocation in Host Cells and Induction of Interleukin-8. *Molecular Microbiology*, 42 (5): 1337-48.

Fischer W., 2011 - Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion apparatus. *FEBS Journal*, 278(8): 1203-1212.

Ford A.C., Gurusamy KS, Delaney B., Forman D., Moayyedi P., 2016 - Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori*-positive people. *Cochrane Database System Review*. Apr 19; 4: CD003840.

Fox J.G., 1995 - Réservoirs non humains d'*Helicobacter pylori*. *Pharmacology therms*. 9 (suppl 2) 92-103.

Franco A.T., Israel D. A., Washington M. K., Krishna U., Fox J. G., Rogers A.B., Neish A.S., 2005. - Activation of β -catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (30): 10646-51

- Fronzes R., Christie P. J., et Waksman G., 2009** - The structural biology of type IV secretion systems. *Nature reviews.Microbiology*, 7 (10).
- Fumat C., Denis F., Ploy M.C., 2011** - Bactériologie médicale techniques usuelles. 2^e édition. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson.
- Gamboa-Dominguez A., Ubbelohde T., Saqui-Salces M., Romano-Mazzoti L., Cervantes M., Domínguez-Fonseca C., Estreber M. L. et Ruíz-Palacios G.M., 2007.-** Salt and Stress Synergize *H. Pylori*-Induced Gastric Lesions, Cell Proliferation, and P21 Expression in Mongolian Gerbils. *Digestive Diseases and Sciences*, 52 (6): 1517-26.
- Gancz H., Jones K.R. et Merrell D. S., 2008.** - Sodium Chloride Affects *Helicobacter pylori* Growth and Gene Expression. *Journal of Bacteriology*, 190 (11): 4100-4105.
- Galmiche A., Rassow J., Doye A., Cagnol S., 2000** - The N-terminal 34 KDa Fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome C release. *EMBO Journal*, 19: 6361-70.
- Gbonon Mbengue V.C., Diplo T.F. B., Guessennd N., Coulibaly N. D., Kakou N.S., Djaman A. J. And Dosso M. 2016** - Gene *cag* and other risk factors in *helicobacter pylori* infection in Abidjan (Ivory Coast). *International Journal of Biology Research*. 1 (4) : 32-35.
- Gebert B., Fischer W., Weiss E., Hoffmann R. et Haas R., 2003.** - *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin Inhibits T Lymphocyte Activation. *Science (New York, N.Y.)*, 301 (5636): 1099-1102.
- George J.T., P.K. Boughan., 2003** - "Host anti-microbial response to *Helicobacter pylori* infection. *Molecular Immunology*, 40(7): 451-456.
- Gerhard M., Lehn N., Neumayer N., Borén T., Rad R., Schepp W., Miehke S., Classen M., et Prinz C.. 1999** - « Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (22): 12778-83.
- Gerrits M.M., Godoy A.P., Kuipers E.J., Ribeiro M.L., Stoof J., Mendonca S., Van Vliet A.H., Pedrazzoli J., Jr., Kusters J.G., 2006** - Multiple mutations in or adjacent to the

- conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 11: 181–187.
- Gewirtz A.T., Y. Yu, U.S. Krishna, D.A. Israel, S.L. Lyons, et Peek .M., 2004** - *Helicobacter pylori* Flagellin Evades Toll-like Receptor 5-Mediated Innate Immunity . *The Journal of Infectious Diseases*, 189 (10): 1914-20.
- Giannakis M., S.L. Chen, S.M. Karam, L. Engstrand, et J. I. Gordon, 2008** - *Helicobacter pylori* evolution during progression from chronic atrophic gastritis to gastric cancer and its impact on gastric stem cells . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (11): 4358-63.
- Glupczynski Y., Bourdeaux L., De Prez C., Devos D., Devreker T., Balegamire B., 1991** - Prevalence of *Helicobacter pylori* in rural Kivu, eastern Zaïre: a prospective endoscopic study. *European. Journal of. Gastroenterology and Hepatology*, 3: 449-455.
- Gonzalez-Valencia G., Atherton J.C., Munoz O., Dehesa M., La Garza A.M., Torres J., 2000** - *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in Mexican adults and children. *Journal of Infectious Diseases*, 182: 1450-1454.
- Goodwin A., Kersulyte D., Sisson G., Veldhuyzen Van Zanten S.J.O., Berg D.E., And Hoffman P.S., 1998** - Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Molecular Microbiology*, 28:383-393.
- Goodwin S., Kassar-Juma W., Jazrawi R., Bensom M., 1998** - Non ucler dyspepsia and *Helicobacter pylori*, with comment on post eradication symptoms. *Digestive Diseases Science*, 43 (suppl 9) 67-71
- Goodwin C. S., et B. W. Worsley. 1993** - Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*, 22(1): 5-19.
- Gopal G.J., Pal J., Kumar A. et Mukhopadhyay G. 2015.** - C-Terminal Domain of CagX Is Responsible for Its Interaction with CagT Protein of *Helicobacter pylori* Type IV Secretion System. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(1): 98-103

- Graham D.Y. & Klein P.D., 2000** - Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*, 13C-urea breath test. *Gastroenterology Clinical of North. America*, 29: 903-915.
- Graham D.Y., Malaty H.M., Evans D.G., Evans D.J. Jr., 1991** - Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology*, 110 (6): 1495-501.
- Grübel P., Hoffman J.S., Chong F.K., Burstein N.A., Mepani C., Cave D.R. 1997** - Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (6): 1300-1303.
- Grubman A., M. Kaparakis, J.Viala, C. Allison, L. Badea, A. Karrar, Ivo G. Boneca, 2010** - The Innate Immune Molecule, NOD1, Regulates Direct Killing of *Helicobacter Pylori* by Antimicrobial Peptides. *Cellular Microbiology*, 12 (5): 626-39.
- Hafidi R., Oubaha S., El Gamrani Y., Diffaa A., Samlani , Krati K., 2013** - Infection à *Hélicobacter pylori* : aspects épidémiologiques, cliniques et endoscopiques. *Journal Africain d'Hépatologie Gastroentérologie*, 7: 74-77.
- Hasosah M., Satti M., Shehzad A., Alsahafi A., Sukkar G., Alzaben A., Sunaid A., 2015** - Prevalence and Risk Factors of *Helicobacter pylori* Infection in Saudi Children: A Three-Year Prospective Controlled Study. *Helicobacter*, 20 (1): 56-63.
- Havaei S.A., Mohajeri P., Khashei R., Salehi R., Tavakoli H., 2014** - Prevalence of *Helicobacter pylori vacA* different genotypes in Isfahan, Iran. *Advanced Biomedical Research*, 3: 48.
- Helander H. F. 1981.** - The Cells of the Gastric Mucosa. *International Review of Cytology* 70: 217-89.
- Hida N., Shimoyama J. Jr., Neville P., Dixon M. F., 1999** - Increased expression of IL-10 and IL-12 (p40) mRNA in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa: relation to bacterial Cag status and peptic ulceration. *Journal of Clinical Pathology*; 52: 658-64.
- Higashi H., Tsutsumi R., Muto S., Sugiyama T., Azuma T., Asaka M. et Hatakeyama M., 2002.** - SHP-2 Tyrosine Phosphatase as an Intracellular Target of *Helicobacter pylori* CagA Protein ». *Science (New York, N.Y.)* 295 (5555): 683-86.

- Higashi H., Nakaya A., Tsutsumi R., Yokoyama K., Fujii Y., Ishikawa S., Higuchi. M., 2004.** - *Helicobacter pylori* CagA Induces Ras-Independent Morphogenetic Response through SHP-2 Recruitment and Activation. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (17): 17205-16.
- Holcombe C., Omotara B.A., Eldridge J., Jones D.M., 1992** - *Helicobacter pylori*, the most common bacterial infection in Africa: a random serological study. *American Journal of Gastroenterology*, 87, 28-30.
- Holcombe C., 1992** - *Helicobacter pylori*: the African enigma. *Gut*, 33: 429-431.
- Hopkins R.J., Vial P.A., Ferrecio C., Ovalle J., Prado P., Sotomayor V., 1993** - Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. *Journal of Infectious Diseases*, 168: 222-226.
- Hu Y., Zhu Y., et Nong-Hua L., 2017a** - Primary Antibiotic Resistance of *Helicobacter Pylori* in China ». *Digestive Diseases and Sciences*, 62 (5): 1146-54.
- Hu Y., Zhu Y., et Nong-Hua L., 2017b** - Novel and Effective Therapeutic Regimens for *Helicobacter pylori* in an Era of Increasing Antibiotic Resistance ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7 (mai).
- Hunt R.H., Xiao S.D., Mégraud F., 2011** - *Helicobacter pylori* in developing countries. World Gastroenterology Organisation Global Guideline. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 20:299-304.
- Hynes S. O., J.A. Ferris, B. Szponar, T. Wadström, J G. Fox, J. O'Rourke, Larsson L., 2004** - Comparative Chemical and Biological Characterization of the Lipopolysaccharides of Gastric and Enterohepatic *Helicobacters*. *Helicobacter*, 9 (4): 313-23.
- IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1994** -: Some industrial chemicals. Lyon, 15-22 February 1994. IARC Monographic Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans , 60: 1-560.
- Imamura S., Kita M., Yamaoka Y., Yamamoto T., Ishimaru A., Konishi H., Wakabayashi N., Mitsufuji S., Okanoue T. et Imanishi J., 2003.**- Vector Potential of Cockroaches for *Helicobacter pylori* Infection. *The American Journal of*

Gastroenterology, 98 (7): 1500-1503.

Israel D.A., N. Salama, C.N. Arnold, S.F. Moss, T. Ando, H.P. Wirth, Tham K.T., 2001
- *Helicobacter pylori* Strain-Specific Differences in Genetic Content, Identified by Microarray, Influence Host Inflammatory Responses. *The Journal of Clinical Investigation*, 107 (5): 611-20.

Ito T., Kobayashi D., Uchida K., Takemura T., Nagaoka S., Kobayashi I.; 2008 -
Helicobacter pylori invades the gastric mucosa and translocates to the gastric lymph nodes. *Laboratory Investigation*, 88: 664-81.

Jeong J.Y., Mukhopadhy A.K., Dailidienė D., 2000 - Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*, 182: 5082–5090.

Jeong J.Y., Mukhopadhyay A.K., Akada J.K., Dailidienė D., Hoffman P.S., Berg D.E.; 2001 - Roles of *FrxA* and *RdxA* nitroreductases of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to metronidazole. *Journal of Bacteriology*, 183: 5155–5162.

Jiang Q., Hiratsuka K., Taylor D.E., 1996 - Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Molecular Microbiology*, 20 (4): 833-42.

Josenhans C., A Labigne, et S Suerbaum, 1995 - Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, *FlaA* and *FlaB*, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *Journal of Bacteriology*, 177 (11): 3010-20.

Kato S., Fujimura S., Udagawa H., Shimizu T., Maisawa S., Ozawa K. et Iinuma K., 2002. - Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* Strains in Japanese Children. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (2): 649-53.

Kato S., Nakajima S., Nishino Y., Ozawa K., Minoura T., Konno M., Maisawa S., 2006. - Association between Gastric Atrophy and *Helicobacter Pylori* Infection in Japanese Children: A Retrospective Multicenter Study ». *Digestive Diseases and Sciences*, 51 (1): 99-104.

- Khatoon J., Rai R. P. et Kashi N.P., 2016** - Role of *Helicobacter pylori* in gastric cancer: Updates. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 8 (2): 147-58.
- Kavermann H., B. P. Burns, K. Angermüller, S. Odenbreit, W. Fischer, K. Melchers, et Haas R., 2003** - Identification and Characterization of *Helicobacter pylori* Genes Essential for Gastric Colonization. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(7): 813-22.
- Kim J.S., Ji J.S., Lee B.I., Choi H., Kim J.H., 2014** - Sequential therapy or triple therapy for *Helicobacter pylori* infection in Asians: systematic review and meta-analysis. *Clinical Research Hepatology and Gastroenterology*, 38:118–125.
- Kim J.Y., N. Kim, R.H. Nam, J.H. Suh, H. Chang, J.W. Lee, Kim Y.S., 2014** - Association of Polymorphisms in Virulence Factor of *Helicobacter pylori* and Gastroduodenal Diseases in South Korea. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 29 (5): 984-91.
- Kimang'a N., Revathi G., Kariuki S., 2010** - *Helicobacter pylori*: Prevalence and antibiotic susceptibility among Kenyans. *AS African Medical Journal*, 100:53-7.
- Klein P.D., Graham D.Y., 1991** - Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Lancet I*, 1503-1506.
- Konate A., Diarra, M., Soucko-Diarra, A., 2007** - Gastrites chroniques à l'ère d'*Helicobacter pylori* au Mali. *Acta Endoscopica*, 37; 315-320.
- Krejs G.J., 2010** - "Gastric cancer epidemiology and risk factors." *Digestive Diseases* **28** (4-5): 600-603.
- Krumbiegel P., Herbath O., Fritz G., Schlink U., 2000** -. *Helicobacter pylori* prevalence in Leipzig 1998 school entries: methodology and first results. *International Journal of Hygien and Environnemental health*, 203 (1): 11-6.
- Kusters J.G., A.H.M. van Vliet, et Kuipers E.J., 2006** - Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (3): 449-90.
- Kuwahara H., Yoichi M., Takaaki A., Tatsuo K., Tomohiro S., Shinichiro O., et Hiroshi M., 2000** - *Helicobacter pylori* Urease Suppresses Bactericidal Activity of Peroxynitrite

- via Carbon Dioxide Production. *Infection and Immunity*, 68 (8): 4378-83.
- Kwon D.H., M. Kato, F. A. El-Zaatari, M. S. Osato, et D. Y. Graham, 2000** - Frame-Shift Mutations in NAD(P)H Flavin Oxidoreductase Encoding Gene (frxA) from Metronidazole Resistant *Helicobacter pylori* ATCC43504 and Its Involvement in Metronidazole Resistance. *FEMS Microbiology Letters*, 188 (2): 197-202.
- Lamarque D., Burucoa C., Courillon-Mallet A., De Korwin J.D., Delchier J.C., Hekrwaert F., Lehours P., Mégraud F., Moussata D., Arniot A., Breurec S., Raymond J., 2017** - Recommandation sur le traitement de l'infection à *Helicobacter pylori* chez l'adulte. *HEPATO-GASTRO et Oncologie digestive*. 24: 157-170.
- Lamouliatte H., Megraud F., Cayla R., 1992** - *Helicobacter pylori* et pathologie gastroduodénale. Editions techniques. Encyclopédie. Médical. De Chirurgie. (Paris) *Gastroenterology*, 9021 E; 10: 12P.
- Leclerc H. 2006.** - [Epidemiological aspects of *Helicobacter pylori* infection]. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 190 (4-5): 949-62.
- Lee T-H., Lin C-C., Chung C-S., Lin C-K., Liang C-C. et Tsai K-C. 2015.** - Increasing Biopsy Number and Sampling from Gastric Body Improve the Sensitivity of Rapid Urease Test in Patients with Peptic Ulcer Bleeding ». *Digestive Diseases and Sciences*, 60(2): 454-57.
- Lehours P., 2003** - *Helicobacter pylori* et les autres. *Gastroenterology of Clinical Biology*, 27: 367 - 73.
- Letley D.P., Lastovica A., Louw J.A., 1999** - Allelic diversity of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in South Africa: rarity of the vacA s1a genotype and natural occurrence of an s2/m1 allele. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1203-1205.
- Li J., Ou Z., Wang F., Guo Y., Zhang R., Zhang J., Li P., Xu W., He Y., 2009** - Distinctiveness of the cagA genotype in children and adults with peptic symptoms in South China. *Helicobacter*, 14: 248-255.
- Linz B., Balloux F., Moodley Y., Manica A., Liu H., Roumagnac P., Falush D., Stamer C., Prugnolle F., van der Merwe S.W., Yamaoka Y., Graham D.Y., Perez-Trallero E., Wadstrom T., Suerbaum S., Achtman M., 2007** - An African origin for the

intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*.22, 445 (7130): 915-918.

Lu H., Wu J.Y., Kudo T., Ohno T., Graham D.Y., Yamaoka Y., 2005 - Regulation of interleukin-6 promoter activation in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Molecular Biology and Cellular*; 16: 4954–6.

Loh J.T., Torres V.J., et Cover T. L., 2007 - Regulation of *Helicobacter pylori* CagA Expression in Response to Salt ». *Cancer Research*, 67(10): 4709-15.

Malaty H.M. And Graham D.Y., 1994 - Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 35 (6): 742-5.

Malaty H.M., 2007 - Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Practice Research Clinical Gastroenterology*, 21(2):205-14.

Malaty H.M., Evans D.J., Abramovitch K., Evans D.G., 1992 - *Helicobacter pylori* infection in dental workers: a seroepidemiology study. *American Journal of Gastroenterology*, 87:1728-31.

Malaty H.M., Graham D.Y., Isaksson I., Engstrand L., 1998 -. Co-twin study of the effect of environment and dietary element on acquisition of *Helicobacter pylori* infection. *American Journal of Epidemiology*, 148 (8): 793-7.

Malfertheiner P., Megraud F., O'Morai C.A., 2012 - Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht IV/Florence consensus report. *Gut*; 61:646-64.

Malfertheiner P., Megraud F., O'morain C., Bazzoli F., El-Omar E., Graham D., 2007 - Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III consensus report [archive]. *Gut*, 56:772-81.

Malferthiner P., Chan, F.K. And Mc Coll, K.E., 2009 - Peptic Ulcer Disease. *Lancet*,. 374, 1449-1461.

Mane S. P., M. G. Dominguez-Bello, M. J. Blaser, B. W. Sobral, R. Hontecillas, J. Skoneczka, S. K. Mohapatra, 2010 - Host-Interactive Genes in Amerindian *Helicobacter pylori* Diverge from Their Old World Homologs and Mediate Inflammatory Responses. *Journal of Bacteriology*, 192 (12): 3078-92.

- Manente L., Perna A., Buommino E., Altucci L., Lucariello A., Citro G., Baldi A., Iaquinto G., Tufano M. A. & De Luca A., 2008.-** The *Helicobacter pylori*'s Protein VacA Has Direct Effects on the Regulation of Cell Cycle and Apoptosis in Gastric Epithelial Cells. *Journal of Cellular Physiology*, 214 (3): 582-87
- Marais A., Bilardi C., Cantet F., Mendz G.L., Megraud F., 2003 -** Characterization of the genes *rdxA* and *frxA* involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Research Microbiology*, 154: 137-44.
- Marais A., Monteiro L., Occhialini A., Pina M., Lamouliatte H., & Megraud F., 1999 -** Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolides by a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. *Gut*, 44 (in press).
- Marshall B.J & Warren J.R., 1984 -** Unidentified curve bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1:1311.
- Martínez-Júlvez M., Rojas A.L., Olekhovich I., Espinosa A.V., Hoffman P.S., Sancho J., 2012 -** Structure of RdxA - an oxygen-insensitive nitroreductase essential for metronidazole activation in *Helicobacter pylori*. *FEBS Journal*, 279: 4306-4317.
- Matisko A., Thomson A., 1995 -** *Helicobacter pylori*: beginning the second decade. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 1995; 9: 333-43.
- Matsunari O., Shiota S., Suzuki R., Watada M., Kinjo N., Murakami K., Fujioka T., Kinjo F., Yamaoka Y., 2012 -** Association between *Helicobacter pylori* virulence factors and gastroduodenal diseases in Okinawa, Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 50:876-83.
- Matteo M.J., Valeria Pérez C., Domingo M.R., M. Olmos, Sanchez C., & Catalano M., 2006 -** DNA sequence analysis of *rdxA* and *frxA* from paired metronidazole-sensitive and -resistant *Helicobacter pylori* isolates obtained from patients with heteroresistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27 (2): 152-58.
- Mégraud F , 1995 -** Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection: where are we in 1995; 7 (4): 292-5.
- Mégraud F., 1997 -.** How to diagnose *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 113:S93-S98.

- Mégraud F., 1998** - *Helicobacter pylori* en Europe et en Afrique. Différence dans le mode de contamination et la résistance aux antibiotiques. *Acta Endoscopica*, vol 28- numéro 3.
- Mégraud F., 2000** - *Helicobacter pylori*. Précis de bactériologie Clinique. ESKA.1379-88.
- Mégraud F. 2003** - quand et comment s'infecte-t-on par *Helicobacter pylori*? *Gastroenterology and clinical Biology*; 27: 374-9
- Mégraud F., 2004** - *H. pylori* Resistance: Prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*, 53:1374-84.
- Mégraud F., 2008** - Centre National de référence des *campylobacter* et *Helicobacter*: Cours de Bactériologie médicale [Internet] [consulté le 15/06/2008] disponible sur <http://www.cnrchu.u-bordeaux2.fr>
- Mégraud F., Bonnet F., Garnier M., And Lamouliatte H., 1985** - Characterization of *Campylobacter pyloridis* by culture enzymatic profile and protein content. *Journal of Clinical. Microbiology*, 22: 1007-1010.
- Mégraud F., Brassens-Rabbe M.P., Denis F, Belbouri A., Hoa D.Q., 1989** -. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori*. Infection in various populations. *Journal of Clinical. Microbiology*,. 1870-1877.
- Mégraud F., 1995** - La transmission d'*Helicobacter pylori* voies oro-fécale et orale. *Alimentation Pharmacology therms*, 9 (suppl 2): 85-91.
- Mégraud F., 1998**- Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 115: 1278-1282.
- Meyer-Ter-Vehn T., Covacci A., Kist M., Pahl H.L., 2000** - *Helicobacter pylori* activates mitogen- activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-Jun. *J Biol Chem*; 275; 16064-72.
- Miehlke S., Kirsch C., Agha-Amiri K., Günther T., Lehn N., Malfertheiner P., Stolte M., Ehninger G. et Bayerdörffer E., 2000.** - The *Helicobacter pylori* VacA S1, M1 Genotype and CagA Is Associated with Gastric Carcinoma in Germany. *International Journal of Cancer*, 87 (3): 322-27.

- Miller S., Pesci E.C. & Pickett C.L., 1994** - Genetic Organization of the Region Upstream from the *Campylobacter Jejuni* Flagellar Gene flhA. *Gene*, 146 (1): 31-38.
- Mitchell H. & Mégraud F., 2002.** - Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection ». *Helicobacter*, 7 Suppl 1: 8-16
- Moss S.F. & Malfertheiner P., 2007** - *Helicobacter* and gastric malignancies. *Helicobacter*, 12:23-30.
- Muotiala A., Helander I. M., Pyhälä L., Kosunen T. U. & Moran A. P. 1992** - Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 60 (4): 1714-16.
- Mustapha P., 2011.-** Etude des interactions entre *Helicobacter pylori* et les cellules épithéliales gastriques. Interactions cellulaires [q-bio.CB]. Université de Poitiers, France, 139p.
- Nabwera H.M., Nguyen -Van -Jam J.S., Logan R.F., Logan P.R., 2000** - Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Kenyan schoolchildren. aged 3-15 years and risk factors for infection. *European Journal of Gastroenterology Hepatology*, 12 (5): 483- 7.
- Najm W. I. 2011.** - Peptic Ulcer Disease. *Primary Care*, 38 (3): 383-394.
- Naficy A.B., Frenck R.W., Abu Elyazeed R., Kim Y., 2000** - Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a population of Egyptian children. *International Journal of Epidemiology*, 29 (5): 928-32.
- Naumann M., Wessler S., Bartsch C., Wrelasnd B., 1999** - Activation of activator protein and stress responses kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the Cag pathogenicity island. *Journal of Biology and Chemistry*, 274: 31655-62.
- Nishizawa T., Suzuki H., Tsugawa H., Muraoka H., Matsuzaki J., Hirata K., Ikeda F., Takahashi M., Hibi T., 2011** - Enhancement of amoxicillin resistance after unsuccessful *Helicobacter pylori* eradication. *Antimicrobial Agents Chemother*, 55:3012-4.

- Nkuize M., De Wit S., Muls V., Ntounda R., Gomez-Galdon M., & Buset M. 2012.** - Comparison of Demographic Characteristics and Upper Gastrointestinal Endoscopy Findings in HIV-Positive, Antiretroviral-Treated Patients with and without *Helicobacter pylori* Coinfection. *Helicobacter*, 17 (2): 153-59.
- O’connor A., Gisbert J.P., Mcnamara D., O’morain C., 2010** - Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2010. *Helicobacter*, 15: 46–52.
- O’Toole P.W., Lane M. C. & Porwollik S., 2000** - *Helicobacter pylori* Motility. *Microbes and Infection*, 2 (10): 1207-14.
- Obst B., Wagner, S., Sewing, K. F., & Beil, W., 2000** - *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis*, 21(6), 1111-1115.
- Odenbreit S., Püls J., Sedlmaier B., Gerland E., Fischer W. & Haas R. 2000.** - Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Gastric Epithelial Cells by Type IV Secretion. *Science*, 287 (5457): 1497-1500.
- Ogaya Y., Nomura R., Watanabe Y. et Nakano K. 2015.** - Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Inflamed Dental Pulp Specimens from Japanese Children and Adolescents ». *Journal of Medical Microbiology*, 64 (Pt 1): 117-23.
- Ogura K., Maeda S., Nakao M., Watanabe T., Tada M., Kyutoku T., Yoshida H., Shiratori Y., Omata M., 2000** - Virulence Factors of *Helicobacter pylori* Responsible for Gastric Diseases in Mongolian Gerbil. *The Journal of Experimental Medicine*, 192 (11): 1601-10.
- Ohata H., Kitauchi S., Yoshimura N., Mugitani K., Iwane M., Nakamura H., 2004** -. Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. *International Journal of Cancer*, 109 : 138-43.
- Okuda M., Takako O., Yingsong L., Hideo Y., Kohei M., Shigeru K., Yoshihiro F., et Shogo K.; 2015** - Low Prevalence and Incidence of *Helicobacter pylori* Infection in Children: A Population-Based Study in Japan. *Helicobacter*, 20 (2): 133-38.
- Oleastro M., Menard A., Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L., Barthelemy P., 2003** - Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring

resistance in *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 : 397-402.

Organisation Mondiale de la Santé, 2014 - Profils des pays pour le cancer, 2014.

Osaki T., Mutsuko K., Hideo Yonezawa, F., Zaman C., Takahashi M., Fujiwara S., et Shigeru K., 2015 - Analysis of Intra-Familial Transmission of *Helicobacter pylori* in Japanese Families. *Journal of Medical Microbiology*, 64 (Pt 1): 67-73.

Ota H., Naoko A., Kazuyoshi Y., et Taiji A., 2009 - Crucial roles of *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of gastric cancer and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Rinsho Byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 57 (9): 861-69.

Papini E., Satin B., Norais N., De Bernard M., 1998 - Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Journal of Clinical Investigation*; 102: 813-20.

Paredes-O., Katia Sáez E., Sanhueza E., Hebel E, González C., Briceño C., et García Cancino A., 2017 - Association between cagA, vacAi, and dupA Genes of *Helicobacter pylori* and Gastroduodenal Pathologies in Chilean Patients. *Folia Microbiologica*, Mars.

Parsonnet J, G D Friedman, N Orentreich & H Vogelmann. 1997 - Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 40 (3): 297-301.

Paul R., Postius S., Klaus M., & Klaus P. S., 2001 - Mutations of the *Helicobacter pylori* Genes rdxA and pbp1 Cause Resistance against Metronidazole and Amoxicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (3): 962-65.

Peek R.M. & Blaser M.J., 2002 - *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *National Review of Cancer*, 2 : 28-37.

Peek R.M., C.F. & Wilson K.T., 2010 - Role of Innate Immunity in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Malignancy. *Physiological Reviews*, 90 (3): 831-58.

Peitz U., Leodolter A., Wex T., Schütze D., Wolle K., Welte T., Günther T., Schmidt U., & Malfertheiner P. 2004. - Diagnostics of *Helicobacter pylori* Infection in Patients

- with Peptic Ulcer Bleeding. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie*, 42 (2): 141-46.
- Peretz A., Paritsky M., Nasser O., Brodsky D., Glyatman T., Segal S. & On A., 2014** - Resistance of *Helicobacter pylori* to Tetracycline, Amoxicillin, Clarithromycin and Metronidazole in Israeli Children and Adults. *The Journal of Antibiotics*, 67 (8): 555-57.
- Perrier-Bonnet S., 2011** - Alliance Mondiale contre le cancer. Cancers et Afrique: le point en 2011.
- Picoli S.U., Mazzoleni L.E., Fernández H., Renata De Bona L., Neuhauss E., Longo L. & Prolla J.C., 2014** - Resistance To Amoxicillin, Clarithromycin And Ciprofloxacin Of *Helicobacter pylori* Isolated From Southern Brazil patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56 (3): 197-200.
- Pilotto A. & Malfertheiner P., 2002** - Review article: an approach to *Helicobacter pylori* infection in the elderly. *Alimentation and Pharmacology Therms*, 16(4):683-691.
- Pospai D., Vissuzaine C., Vatie J., Mignon M., 2007** -. Physiopathologie de la maladie ulcéreuse gastroduodénale à l'ère de *Helicobacter pylori*. *EMC-Gastro-entérologie*, 9-020-A-10.
- Pounder R.E. & Ng D., 1995** - la prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* dans différent pays. *Alimentatio and Pharmacology. Therms*, 9 (suppl 2): 32-9.
- Programme des Nations Unies pour le Developpement (PNUD), 2012** - A propos de la Côte d'Ivoire. Bulletin info PNUD Côte d'Ivoire.
- Rabirad N., Mohammadpoor M., Rastegar A. Lari, Shojaie A., Bayat R. & Alebouyeh M., 2014** - Antimicrobial susceptibility patterns of the gram-negative bacteria isolated from septicemia in Children's Medical Center, Tehran, Iran. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 55 (1): 23-26.
- Radin J.N., Gaddy J.A., González-Rivera C., Loh JT, Algood HMS. & Cover TL., 2013** - Flagellar Localization of a *Helicobacter pylori* Autotransporter Protein. *mBiology*, 4 (2).
- Ramelah M., Aminuddin A., Alfizah H., Isa M.R., Jasmi A.Y., Tan H.J., Rahman A.J., Rizal A.M., Mazlam M.Z., 2005** - cagA gene variants in Malaysian *Helicobacter*

- pylori* strains isolated from patients of different ethnic groups. *FEMS Immunology Medical and Microbiology*, 44:239–242.
- Ranjbar R., Khamesipour F., Jonaidi-Jafari N. & Rahimi E., 2016** - *Helicobacter pylori* isolated from Iranian drinking water: *vacA*, *cagA*, *iceA*, *oipA* and *babA2* genotype status and antimicrobial resistance properties. *FEBS Open Biology*, 6: 433–441.
- Rasheed F., Campbell B.J., Alfizah H., Varro A., Zahra R., Yamaoka Y., Pritchard D.M., 2014** - Analysis of clinical isolates of *Helicobacter pylori* in Pakistan reveals high degrees of pathogenicity and high frequencies of antibiotic resistance. *Helicobacter*, 19(5): 387-99.
- Raymond J., Sauvestre C., Kalach N., Bergeret M. & Dupont C., 2000** - Immunoblotting and Serology for Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 19 (2): 118-21.
- Raymond J., Nguyen V. B., Vidal-Trecan G. & Kalach N. 2005** - [*Helicobacter pylori* infection in children of developing countries] . *Medecine Tropicale: Revue Du Corps De Santé Colonial*, 65 (4): 383-88.
- Raymond J., Lamarque D., Kalach N., Chaussade S. & Burucoa C., 2010** - High Level of Antimicrobial Resistance in French *Helicobacter pylori* Isolates. *Helicobacter*, 15 (1): 21-27.
- Replogle M.L., Glaser S.L., Hiah R.A., Parsonnet J., 1995** - biologic sex as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in healthy young adults. *American Journal of Epidemiology*, 1421 (8): 856-63.
- Rhead J.L., Letley D.P., Mohammadi M., Hussein N., Mohagheghi M. A., Hosseini M.E. et Atherton J.C., 2007.** - A New *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin Determinant, the Intermediate Region, Is Associated with Gastric Cancer. *Gastroenterology*, 133 (3): 926-36
- Ribeiro M.L., Vitiello L., Miranda M.C., Benvengo Y.H., Godoy A.P., Mendonca S., Pedrazzoli J.Jr., 2003** - Mutations in the 23S rRNA gene are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Brazil. *Annual Clinical Microbiology and Antimicrobials*,. 2:11.

- Rickes S., Schultze U., Mönkemüller K. & Malfertheiner P., 2007** - The German physician Walter Krienitz: A pioneer in gastric research. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 42 (5): 663-64.
- Rolle-Kampezyk U.E., Fritz G.J., Diez U., Lehmann I., Richter M., Herbarth O., 2004** - Well Water--One Source of *Helicobacter pylori* Colonization. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207 (4): 363-68.
- Rudi J., C. Kolb, M. Maiwald, I. Zuna, A. von Herbay, Galle P. R. & Stremmel W., 1997** - « Serum Antibodies against Helicobacter Pylori Proteins VacA and CagA Are Associated with Increased Risk for Gastric Adenocarcinoma ». *Digestive Diseases and Sciences*, 42 (8): 1652-59.
- Saadat I., Higashi H., Obuse C., Umeda M., Murata-Kamiya N., Saito Y., Lu H., 2007.** - *Helicobacter pylori* CagA Targets PAR1/MARK Kinase to Disrupt Epithelial Cell Polarity. *Nature*, 447 (7142): 330-33
- Saxena A., Shukla S., Prasad K.N., Ghoshal U.C., 2011** - Virulence attributes of *Helicobacter pylori* isolates & their association with gastroduodenal disease. *Indian Journal of Medical Research*, 133:514–520.
- Schabereiter-Gurtner C., Hirchl A. M., Dragosics B., Hufnagl P., Puz S., Kovach Z., 2004** - Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 4512-4518.
- Seck A, Mbengue M, Gassama-Sow A., 2009** - Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates in Dakar, Senegal. *Journal Infectious of Developing Countries*, 3:137-40.
- Segal E.D., Cha J., Lo J., Falkow S., 1999** - Altered states: involvement of phosphorylated CagA in induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc National Academic Science of USA*; 96: 14559-64.
- Shiota S., Mahachai, V., Vilaichone, R. K., Ratanachu-Ek, T., Tshering, L., Uchida, T., Matsunari, O. & Yamaoka, Y. 2013** - Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal atrophy in Bhutan, a country with a high prevalence of gastric cancer. *Journal of Medical Microbiology*, 62: 1571–1578.

Sibony M. & Jones N.L., 2012 - Recent advances in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Current Opinion of Gastroenterology*, 28:30-5.

Sisson G., Jeong J.Y., Goodwin A., Bryden L., Rossler N., Lim-Morrison S., Raudonikienė A., Berg D.E., Hoffman P.S., 2000 -Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in *Helicobacter pylori* and in *Escherichia coli* containing a cloned *H. pylori* RdxA(+) (Nitroreductase) gene. *Journal of Bacteriology*, 182: 5091–5096.

Smith S.I., Kirsch C., Oyedele K.S., 2002 - Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA and iceA genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *Journal of Medical Microbiology*, 51: 851-854.

Snowden F.M., 2008 - maladies émergentes et ré émergentes: une perspective historique. *Immunology Revue.*, 25(1) : 9-26.

Sobala G.M., Crabtree J.E., Dixon M.F., Schorah., 1991 - Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut*, 32: 1415-8.

Solnick J.V., et Vandamme P., 2001 - Taxonomy of the *Helicobacter* Genus». In *Helicobacter Pylori: Physiology and Genetics*, édité par Harry LT Mobley, George L. Mendz, et Stuart L. Hazell. Washington (DC): ASM Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2463/>.

Sougléri I.S., Papadakos K.S., Zadik M.P., Mavri-Vavagianni M., Mentis A. F. & Sgouras D.N., 2016. *Helicobacter pylori* CagA Protein Induces Factors Involved in the Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Infected Gastric Epithelial Cells in an EPIYA- Phosphorylation-Dependent Manner. *The FEBS Journal*, 283 (2): 206-20.

Stein M., Bagnoli F., Halenbeck R., Rappuoli R., Fantl W.J. & Covacci A., 2002. - C-Src/Lyn Kinases Activate *Helicobacter pylori* CagA through Tyrosine Phosphorylation of the EPIYA Motifs ». *Molecular Microbiology* 43 (4): 971-80.

Stein M., Rappuoli R., Covacci A., 2000 - Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after host cell translocation. *Proc National Academy Science of USA* ; 97 / 1263-8.

- Styer C.M., Lori M. Hansen, Cara L. Cooke, Amy M. Gundersen, Sung Sook Choi, Douglas E. Berg, Benghezal M., 2010** - Expression of the BabA Adhesin during Experimental Infection with *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 78 (4): 1593-1600.
- Suck F.M., Lien G.S., Yu T;C., 2011** - Global trends in *Helicobacter pylori* research from 1991 to 2008 analyzed with the Science Citation Index Expanded. *European Journal of Gastroenterology Hepatology*; 23:295-301.
- Suerbaum S. & Achtman M.. 1999.** - Evolution of *Helicobacter pylori*: The Role of Recombination ». *Trends in Microbiology*, 7 (5): 182-84
- Suerbaum S. & Michetti P., 2002.** - *Helicobacter pylori* Infection. *New England Journal of Medicine*, 347 (15): 1175-86.
- Suganuma M., Kurusu M., Suzuki K, Nishizono A., Murakami K., Fujioka T., Fujiki H., 2005** - New tumor necrosis factor- α -inducing protein released from *Helicobacter pylori* for gastric cancer progression. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 131: 305–313.
- Suganuma M., Kurusu M., Suzuki K., Nishizono A., Murakami K., Fujioka T. & Fujiki H., 2005** - New Tumor Necrosis Factor- α -Inducing Protein Released from *Helicobacter Pylori* for Gastric Cancer Progression. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 131 (5): 305-13.
- Suganuma M., Miki K., Sachiko O., Naoko S., Masaru Y., Wakatsuki Y. & Fujiki H., 2001** - *Helicobacter Pylori* Membrane Protein 1: A New Carcinogenic Factor of *Helicobacter Pylori* ». *Cancer Research*, 61 (17): 6356-59.
- Suganuma M., Watanabe T., Yamaguchi K., Takahashi A., et Fujiki H., 2012** - « Human Gastric Cancer Development with TNF- α -Inducing Protein Secreted from *Helicobacter pylori*. *Cancer Letters* 322 (2): 133-38.
- Suganuma M., Yamaguchi K., Ono Y., Matsumoto H., Hayashi T., Ogawa T., Imai K., Kuzuhara T., Nishizono A., Fujiki H., 2008** - TNF- α inducing protein, a carcinogenic factor secreted from *H. pylori*, enters gastric cancer cells. *International Journal Cancer*, 123(1):117–122.

- Sundrud M.S., Torres V.J., Unutmaz D. & Cover T.L., 2004.** - Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (20): 7727-32.
- Suriani R., Colozza M., Cardesi E., Mazzucco D., Marino M., Grosso S., Sanseverinatti S., Venturini I., Borghi A. et Zeneroli M.L., 2008.** - CagA and VacA *Helicobacter pylori* antibodies in gastric cancer. *Canadian Journal of Gastroenterology* 22 (3): 255-58.
- Suzuki RB., Lopes R.A.B., Arouche da Câmara Lopes G., Ho TH. & Sperança M.A., 2013** - Low *Helicobacter pylori* Primary Resistance to Clarithromycin in Gastric Biopsy Specimens from Dyspeptic Patients of a City in the Interior of São Paulo, Brazil. *BMC Gastroenterology*, 13 (décembre): 164.
- Suzuki R., Shiota, S. & Yamaoka, Y., 2012** - Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infectious Genetic Evolution*, 12, 203–213.
- Tan H.J., Rizal A.M., Rosmadi M.Y., Goh K.L., 2005** - Distribution of *Helicobacter pylori* cagA, cagE and vacA in different ethnic groups in Kuala Lumpur, Malaysia. *Journal of Gastroenterology Hepatology*, 20:589–594.
- Tan S., Tompkins LS, Amieva MR., 2009** - *Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. *Plos Pathogens*, 5(5): 1-13.
- Tanih N.F., L .M. Ndip & R.N. Ndip., 2011** - Characterisation of the genes encoding resistance to metronidazole (rdxA and frxA) and clarithromycin (the 23S-rRNA genes) in South African isolates of *Helicobacter pylori* . *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 105 (3): 251-59
- Terradot L. & Waksman G., 2011** - Architecture of the *Helicobacter pylori* Cag-type IV secretion system. *FEBS Journal*, 278(8): 1213-1222.
- Terradot L. & Zawilak-Pawlik A., 2010** - Structural insight into *Helicobacter pylori* DNA replication initiation. *Gut Microbes*, 1 (5): 330-34.
- Thomas J.E., Gibson G.R., Darboe M.K., Dale A., Weaver .L.T., 1992** - Isolation of

- Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet*, 340. 1194-1195.
- Thomson A.B., 1997** - A suggested approach to patients with dyspepsia. *Canadian Journal Gastroenterology*, 11(2):135-40.
- Toledo H., Valenzuela M., Rivas A. & Jerez C.A., 2002** - Acid Stress Response in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Letters*, 213 (1): 67-72.
- Tonkic A., Tonkic, M., Lehours, P. & Megraud, F., 2012** - Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 17 (Suppl 1),1-8.
- Torres J., G. I. Pérez-Pérez, Y. Leal-Herrera, & Muñoz O. 1998.** Infection with CagA+ *Helicobacter pylori* Strains as a Possible Predictor of Risk in the Development of Gastric Adenocarcinoma in Mexico. *International Journal of Cancer*, 78 (3): 298-300.
- Traoré H.A., Maiga M.Y., Diarra M., Picard E., Dembele M., Diallo A.N., 1994** - Etude anatomo-clinique des gastritis chroniques au Mali. *Dakar medical*; 39: 207-11.
- Trespacios-Rangél A.A., Otero W., Arévalo-Galvis A., Poutou-Piñales R.A., Rimbara E. & Graham D.Y., 2016** - Surveillance of Levofloxacin Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates in Bogotá-Colombia (2009-2014). *PloS One*, 11 (7): e0160007.
- Tsutsumi R., Higashi H., Higuchi M. , Okada M. & Hatakeyama M., 2003.** - Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 Signaling by Interaction between CagA and C-Terminal Src Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (6): 3664-70.
- Tummuru M.K., Shamma S.A., Blaser M.J., 1995** - *Helicobacter pylori* pic B, a homologue of the *Bordelella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL8 in gastric epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 18: 867-76.
- Vakil N., 2006** - *Helicobacter pylori* treatment: a practical approach. *American Journal of Gastroenterology*, 101:497-9.
- Van Doorn L.J., Figueiredo C., Rossau R., Jannes G., Van Asbroek M., Sousa J.C., Carneiro F., Quint W.G., 1998** - Typing of *Helicobacter pylori* vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:1271-1276.

- Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Gerrits M.M., Van Strijp J.A.C. et Kusters J.C., 1999**
- Les formes coccoïdes: signification Clinique et biologique. *Lett. Infect.* (in press).
- Veldhuyzen Van Zanten S.J.O., 1995,** - Le niveau socio-économique, la situation familiale et la profession influencent-ils la prévalence de l'infection par *Helicobacter pylori*. *Aliment pharmacology Thermal*, 9 (suppl 2):40-4.
- Versalovic J., Shortridge D., Kibler K., Griffy M.V., Beyer J., Flamm R.K., Tanaka S.K, Graham D.Y., Go M.F., 1991** - Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobials Agents Chemother*, 40: 477-480.
- Viala J., Chaput C., Boneca I.V., Cardona A., Girardin S.E., Moran A.P., Athman R., 2004** - Nod1 Responds to Peptidoglycan Delivered by the *Helicobacter pylori* Cag Pathogenicity Island. *Nature Immunology*, 5 (11): 1166-74.
- Vincent P. 1991** - Quels sont les modes de contamination possibles de l'infection à *Helicobacter pylori* ? *Gastroenterology. and Clinical. Biology*, 15:121-3.
- Vincent P., Goutrand F., Leclerc H., 1996** - Epidémiologie d'*Helicobacter pylori* : disparités dans la distribution de l'infection. *Gastroenterology of Clinical Biology*. 20: S27-S33.
- Walker M.M., Dixon M.F., 1996** - Gastric metaplasia: its role in duodenal ulceration. *Aliment pharmacology thermal*, 1996; 10: 119-28.
- Wang H., Han J., Chen D., Duan X., Gao X., Wang X. & Shao S. 2012** - Characterization of CagI in the Cag Pathogenicity Island of *Helicobacter Pylori*. *Current Microbiology*, 64 (2): 191-96.
- Wang X.M., Yee K. C., Hazeki-Taylor N., Li J., Fu H. Y., Huang M. L. & Zhang G. Y. 2014.** - Oral *Helicobacter Pylori*, Its Relationship to Successful Eradication of Gastric *H. pylori* and Saliva Culture Confirmation. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 65 (4): 559-66.
- Watanabe T., Hideaki T., Takahito I., Daisuke K., Kazuya H., Masatoshi B., Atsushi T., Kensei Y., Fujiki H., et Suganuma M., 2010** - Nucleolin as Cell Surface Receptor for

- Tumor Necrosis Factor- α Inducing Protein: A Carcinogenic Factor of *Helicobacter pylori*. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 136 (6): 911-21.
- Watanabe T., Takahashi A., Suzuki K., Kurusu Kanno M., Yamaguchi K., Fujiki H, Suganuma M., 2013** - Epithelial mesenchymal transition in human gastric cancer cell lines induced by TNF- α inducing protein of *Helicobacter pylori*. *International Journal of Cancer*, 6: 282-85.
- Weeks D. L., Eskandari S., Scott D. R. & Sachs G., 2000** - A H⁺-Gated Urea Channel: The Link between *Helicobacter pylori* Urease and Gastric Colonization. *Science (New York, N.Y.)*, 287 (5452): 482-85.
- Wen S. & Moss S.F., 2009** - *Helicobacter pylori* Virulence Factors in Gastric Carcinogenesis. *Cancer Letters*, 282 (1): 1-8.
- West A.P., Millar M.R., Tompkins D.S., 1992** - Effect of physical environment on survival of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical pathology*, 45 (3): 228-31.
- Woodward M., Morrison C., Mc Coll K., 2000** - An investigation into factors associated with *Helicobacter pylori* infection. *Journal of clinical Epidemiology*, 53 (2): 175-81.
- World Health Organization, International Agency For Research On Cancer, 2006** - IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Preamble. Geneva: WHO.
- Wroblewski L.E., Peek R.M. & Wilson K.T., 2010.** - *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clinical Microbiology Reviews*, 23 (4): 713-39.
- Wu J.Y., Lu H., Sun Y., Graham D.Y., Cheung H.S., & Yamaoka Y., 2006** - Balance between Polyoma Enhancing Activator 3 and Activator Protein 1 Regulates *Helicobacter pylori*-Stimulated Matrix Metalloproteinase 1 Expression. *Cancer research*, 66 (10): 5111-20.
- Wyatt J.I., Rathbone B.J., Sobala G.M., 1990** - Gastric epithelium in the duodenum : its association with *Helicobacter pylori* and inflammation. *Journal of. Clinical. Pathology*. 43: 981-986.

- Yakoob J., Abid S., Abbas Z., Jafri W., Ahmad Z., Ahmed R., Islam M., 2009 -** Distribution of *Helicobacter pylori* virulence markers in patients with gastroduodenal diseases in Pakistan. *BMC Gastroenterology*, 9: 87.
- Yamaoka Y., Kikuchi S., El Zimaity H.M., Gutierrez O., Osato M.S., Graham D.Y., 2002 -** Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology*, 123:414-44.
- Yamaoka Y., Kodama T., Kita M., Imanishi J., Kashima K., Graham D.Y., 1998 -** Relationship of vacA genotypes of *Helicobacter pylori* to cagA status, cytotoxin production, and clinical outcome. *Helicobacter*, 3:241–253.
- Yamaoka Y., Takahiko K., Hong L., Antonella C., A.R. Brasier & .Graham D.Y., 2004 -** Role of Interferon-Stimulated Responsive Element-like Element in Interleukin-8 Promoter in *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology* 126 (4): 1030-43.
- Yamaoka Y., O. Ojo, S. Fujimoto, S. Odenbreit, R. Haas, O. Gutierrez, H. M. T. El-Zimaity, R. Reddy, A. Arnqvist & Graham D. Y. 2006 -** *Helicobacter pylori* Outer Membrane Proteins and Gastroduodenal Disease. *Gut*, 55 (6): 775-81.
- Yang Y.J., Jiunn-Jong W., Bor-Shyang S., Ai-Wen K., et Ay-Huey H., 2004 -** The rdxA Gene Plays a More Major Role than frxA Gene Mutation in High-Level Metronidazole Resistance of *Helicobacter pylori* in Taiwan. *Helicobacter*, 9 (5): 400-407.
- Yee J.K.C. 2016 -** *Helicobacter pylori* colonization of the oral cavity: A milestone discovery. *World Journal of Gastroenterology*, 22 (2): 641-48.
- Yokota S., Konno M., Fujiwara S., Toita N., Takahashi M., Yamamoto S., Ogasawara N. & Shiraishi T. 2015 -** Intrafamilial, Preferentially Mother-to-Child and Intrapousal, *Helicobacter pylori* Infection in Japan Determined by Mutilocus Sequence Typing and Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting. *Helicobacter*, 20 (5): 334-42.
- Zaki E.S.M., Sherif D.M., Ali M.A., Shehta A., Megahed A., Alsayed M.A.L., Barakat T. and Elzeny S.M., 2016 -** Molecular Study of Primary Clarithromycin Resistant *Helicobacter pylori* strains from Egyptian Centre. *International Journal of Current Microbiology.Applied.Science*. 5 (1): 165-173.

ANNEXES

FICHE D'ENQUETE

DONNEES DEMOGRAPHIQUES

Numéro d'inclusion

Date d'inclusion

Nom

Prénom

Age (en années)

Sexe

- ☐ 1. Féminin ☐ 2. Masculin

Nationalité

- ☐ 1. Ivoirien ☐ 2. Non ivoirien

Ethnie

- ☐ 1. Akan ☐ 2. Krou ☐ 3. Mandé
☐ 4. Malinké ☐ 5. Lagunaires ☐ 6. Senoufo

Profession

Domicile

- | | |
|--------------------------------------|---|
| ☐ Abobo, | ☐ Port Bouet |
| ☐ Adjamé | ☐ Koumassi |
| ☐ Attécoubé | ☐ Plateau |
| ☐ Cocody | ☐ Yopougon |
| ☐ Marcory | ☐ Hors d'Abidjan |
| ☐ Treichville | |

HABITAT

Nombre de pièces

- ☐ 1. 1-2 pièces ☐ 2. 3-4 pièces ☐ 3. plus de 4 pièces

Nombre de personnes habitant le domicile

- ☐ 1. <5 personnes ☐ 2. Entre 5 et 10 personnes ☐ 3. >10 personnes

Mode d'approvisionnement en eau

- ☐ 1. Eau courante ☐ 2. Achat en détail ☐ 3. Puits

ANTECEDENTS

Consommation d'antibiotique dans les 15 jours :

☐ 1. Oui ☐ 2. Non ☐ 3. Non Précisé

SI OUI, Préciser la nature:

Consommation d'anti sécrétoire dans les 15 jours?

☐ 1. Oui ☐ 2. Non ☐ 3. Non précisé

SI OUI, Préciser la nature:

Avez-vous déjà fait une fibroscopie oeso gastro duodénale ?

☐ 1. Oui ☐ 2. Non

Alcool :

☐ 1. Oui ☐ 2. Non

Tabac :

☐ 1. Oui ☐ 2. Non

Membres de la famille se plaignant de syndrome ulcéreux :

☐ 1. Oui ☐ 2. Non

TABLEAU CLINIQUE

Indication de l'endoscopie

--

Aspect endoscopique

--

TEST A L'UREASE

Antre

☐ 1. Positif ☐ 2. Négatif

Fundus

☐ 1. Positif ☐ 2. Négatif

CULTURE

Antre

Gélose Columbia + 10 % sang de cheval+ supplément *H. pylori*

☐ 1. Positive

☐ 2.Négative

Délai de positivité (en jours)

Gélose Columbia + 10 % sang de mouton+ supplément *H. pylori*

☐ 1. Positive

☐ 2.Négative

Délai de positivité (en jours)

Fundus

Gélose Columbia + 10 % sang de cheval+ supplément *H. pylori*

☐ 1. Positive

☐ 2.Négative

Délai de positivité (en jours)

Gélose Columbia + 10 % sang de mouton+ supplément *H. pylori*

☐ 1. Positive

☐ 2.Négative

Délai de positivité (en jours)

ANTIBIOGRAMME

Amoxicilline

Ampicilline

Erythromycine

Gentamycine

Kanamycine

Tétracycline

Rifampicine

RESULTAT DE LA PCR

Gènes de virulences

Gènes de résistance



Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
Tél. : 22-48-53-05
01 BP 490 ABIDJAN 01



Lettre d'information au patient

Titre : Détection de *Helicobacter pylori* dans les biopsies gastriques à Abidjan : sensibilité aux antibiotiques et facteurs de virulence

Investigateur principal : Mme Diplo Epse Tchimou

Encadreur : Dr GBONON

Promoteur : l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire

Madame, Monsieur,

Nous vous invitons à participer à une étude pour rechercher la bactérie nommée *Helicobacter pylori* dans les biopsies gastriques. *Helicobacter pylori* est une bactérie fréquemment dans la muqueuse gastrique et pouvant être à l'origine d'ulcère gastrique voire de cancer gastrique. Cette étude consiste à détecter par des tests moléculaires les facteurs de virulence de cette bactérie et à rechercher sa sensibilité aux antibiotiques utilisés pour son éradication. Cette étude sera menée par Mme Diplo Epse Tchimou Flore Bernadette à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. La présente notice d'information vise à vous apporter l'ensemble des informations relatives à l'étude elle-même, à son déroulement et à votre participation.

Présentation : La problématique de l'infection à *Helicobacter pylori* se situe aujourd'hui partout dans le monde au niveau de la résistance de cette bactérie aux antibiotiques actuellement utilisés pour le traitement ainsi que de son évolution vers le cancer gastrique. En effet, La présence de gènes de résistance aux antibiotiques utilisés dans l'éradication de l'infection serait à l'origine des nombreux échecs thérapeutiques. De même, la production de protéines telles que le CagA et le VacA par cette bactérie favoriserait l'évolution clinique de l'infection vers les formes sévères notamment le cancer gastrique.

L'étude se divise en deux phases :

- Dans un premier temps, vous serez interrogés avant votre biopsie. Des données sociodémographiques et cliniques seront ainsi recueillies.
- Secondairement, vos biopsies seront collectées et feront l'objet d'étude bactériologique et moléculaire.

Tout au long de l'étude votre collaboration et votre implication maximale sont requises et doivent être en plus sincères et pertinentes. En effet, les conséquences de l'infection à *Helicobacter pylori* sont nombreuses, aussi en satisfaisant à ces questions, vos réponses pourront servir à mener à bien cette étude.

Avantages : recherche des causes des échecs thérapeutiques dans le traitement de *Helicobacter pylori*

Risques : Rupture de la confidentialité. Cependant, toutes les dispositions seront prises pour l'anonymat des données qui vous concernent.

Nous vous remercions de votre participation et de votre attention et nous nous tenons à tout moment à votre entière disposition pour de plus amples informations.

Nom et prénoms de l'investigateur



Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
Tél. : 22-48-53-05
01 BP 490 ABIDJAN 01



Formulaire de consentement

Titre : Détection de *Helicobacter pylori* dans les biopsies gastriques à Abidjan : sensibilité aux antibiotiques et facteurs de virulence

Investigateur principal : Mme Diplo Epse Tchimou

Encadreur : Dr GBONON

Promoteur : l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire

Je, soussigné, ,
déclare accepter, librement, et de façon éclairer, de participer comme sujet à
l'étude intitulée ci-dessus.

J'ai reçu une explication concernant la nature, le but, la durée de l'étude et j'ai
été informé de ce qu'on attend de ma part. J'ai reçu une copie de ce formulaire
de consentement éclairé, signé et daté, précédé d'un résumé de l'objectif de la
recherche.

Je consens de mon plein gré à participer à cette étude.

Le participant
Signature ou empreinte digitale
Date

L'investigateur principal
Signature
Date

Témoin impartial

Nom et Prénoms
Contact
Signature
Date

PUBLICATIONS

1. Molecular detection of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies in Abidjan (Côte d'Ivoire).

Diplo T.F. B., Gbonon Mbengue V.C., Guessennd N., Yapo A. F., Kakou N. S., Ouattara A., Coulibaly N. D. , Djaman A. J. And Dosso M. **Microbiology Research Journal International. Volume 20; Issue 1, Mai 2017; Page No 1-7.**

2. Virulence genes of *Helicobacter pylori* in Abidjan (Côte d'Ivoire).

Diplo T.F. B., Gbonon Mbengue V.C., Yapo A. F., Guessennd N., Kakou N. S., Ouattara A., Coulibaly N. D. , Djaman A. J. And Dosso M. **International Journal of Advanced Scientific Research. Volume 2; Issue 2, March 2017; Page No. 13-17.**

3. *Helicobacter pylori* TipA gene identified in gastric biopsies in Abidjan (Ivory Coast)

Diplo T.F. B., Gbonon Mbengue V.C., Yapo A. F., Guessennd N., Kakou N. S., Ouattara A., Coulibaly N. D. , Djaman A. J. And Dosso M. **European Journal of Biotechnology and Bioscience. Volume 5; Issue 2, March 2017; Page No 25-28.**



Molecular Detection of Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* from Gastric Biopsies in Abidjan (Côte d'Ivoire)

**Diplo Tchépe Flore Bernadette^{1*}, C. Gbonon Mbengue Valérie²,
Guessennd Nathalie², Yapo Adou Francis¹, Kakou N'gazon Solange³,
Ouattara Aboulaye⁴, Coulibaly N'golo David³, Djaman Allico Joseph¹
and Dosso Mireille²**

¹Laboratory of Biochemical Pharmacodynamics, Félix Houphouët Boigny University, Ivory Coast.

²Department of Bacteriology and Virology, Pasteur Institute, Ivory Coast.

³Molecular Biology Platform, Pasteur Institute, Ivory Coast.

⁴Department of Epidemiology, Pasteur Institute, Ivory Coast.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Author DTFB designed the study, performed the statistical analysis, wrote the protocol and wrote the first draft of the manuscript. Authors CGMV and GN managed the analyses of the study. Author DTFB managed the literature searches. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/MRJI/2017/32912

Editor(s):

(1) Kai Zhang, Department of Oral Biology, The State University of New York, Buffalo, USA.

Reviewers:

(1) Gokben Ozbey, Vocational School of Health Services, Firat University, Elazig, Turkey.

(2) Patrick Adu, School of Allied Health Sciences, University of Cape Coast, Ghana.

(3) Virginia Montero, Institute Technological of Costa Rica, Costa Rica.

Complete Peer review History: <http://www.sciencedomain.org/review-history/18993>

Original Research Article

Received 22nd March 2017

Accepted 27th April 2017

Published 9th May 2017

ABSTRACT

Aims: To determine the genes of resistance to amoxicillin, clarithromycin and metronidazole of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies in Côte d'Ivoire.

Place and Duration: The study was performed at the department of gastroenterology of Cocody Hospital and University Center, at the laboratory of Bacteriology-Virology and at the molecular biology platform of Pasteur Institute of Côte d'Ivoire from August 2015 to December 2016.

Methodology: The rapid urease test was performed in endoscopy room and 98 positive biopsies

*Corresponding author: E-mail: diplo1fr@yahoo.fr;

were retained for the study. Gastric biopsies were collected and transported within a maximum of 4 hours. DNA extraction was followed by Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification.

Results: The *rdxA* / *frxA*, 23S rRNA and *pbp1* genes conferring resistance to metronidazole, clarithromycin and amoxicillin respectively were identified in 12.2% (12/98), 26.5% (26/98) and 58.2% (57/98). Cross-resistance genotypes to these three antibiotics were detected in 8.2% (8/98) of the samples.

Conclusion: These results show a high level of resistance of *Helicobacter pylori* to amoxicillin and presence of cross-resistance to the three commonly used antibiotics. These results support the need for an evaluation of *Helicobacter pylori* current therapeutic protocol in Côte d'Ivoire.

Keywords: *Helicobacter pylori*; resistance gene; gastric biopsies; Abidjan.

1. INTRODUCTION

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is responsible for pathologies of gastroduodenal mucosa such as gastritis, ulcer, MALT (Mucosa associated lymphoid tissue) lymphoma and gastric adenocarcinoma [1-3]. Half of world's population is affected by this infection. *H. pylori* occurs in all regions of world with high prevalence in developing countries [4]. In Côte d'Ivoire, diagnosis and treatment of *H. pylori* infection is not common practice due to lack of resources and information. Eradication of *H. pylori* is not subject of specific recommendations. Thus, to date, eradication treatment is based on an empirical combination of proton pump inhibitors (PPI) and two antibiotics taken from amoxicillin (AML), clarithromycin (CLR) and metronidazole (MTZ), justified by availability of antibiogram data and the relatively low cost of these molecules. The research of African countries in terms of *H. pylori* antibiotic resistance are rarely published [5]. However, the susceptibility of *H. pylori* to these antibiotics differs from one country to another [6,7]. Thus, scientists propose eradication strategies according to their personal results. In case of Côte d'Ivoire, these data are currently not available. The current global problem in management of *H. pylori* infection is resistance to recommended standard eradication treatment [8]. Since no studies have been carried out in Côte d'Ivoire on the resistance of *H. pylori*, we have researched resistance of this bacterium. The aim of this study is to determine the genes of resistance to amoxicillin, clarithromycin and metronidazole of *H. pylori* in gastric biopsies.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Gastric Biopsies

A total of 98 positive urease rapid test biopsy specimens were collected at Hospital and

University Center of Cocody between August 2015 to February 2016 and were transported to Pasteur Institute's Bacteriology-Virology Laboratory of Côte d'Ivoire within a maximum of 4 hours. Gastric biopsies were then stored in dry tubes at -80°C.

2.2 Ethics

All patients underwent a socio-demographic questionnaire (age, sex, occupation) and medical history validated by Ethics Committee of Pasteur Institute of Côte d'Ivoire. Written consent was also given by each patient before endoscopy.

2.3 Extraction of *H. pylori* DNA

Extraction of *H. pylori* DNA was performed according to DNA extraction protocol of NucliSENS® kit (bioMérieux, France) with some modifications. Biopsies were ground in 0.3 ml of 1X PBS buffer with Potter grinder into a sterile tube and then suspended in 500 µl of buffer containing Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0, Proteinase K 1 mg /ml and incubated at 60°C for 24 h. DNA was extracted in 500 µl of lysis buffer containing 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% SDS and Proteinase K 100 µg/ml for 1 h at 60°C. 1 ml of phenol-chloroform-iso-amyl alcohol mixture (25:24:1) was added and centrifuged at 13000 rpm for 15 min. Aqueous phase (upper phase) was collected and 1/ 10th of 3M sodium acetate and 500µl of absolute ethanol were added and incubated 1 at -80°C for 1 h or overnight at -20°C. The pellet obtained was washed with 70% ethanol and dried at 65°C for 15 min. Pellet obtained was eluted in 60 µl of buffer and DNA was stored at -20°C.

2.4 Resistance Gene Genotyping

PCR was performed in a volume of 50 µl containing 0.75 µl of each 10 mM primer, 3 µl of

genomic DNA, 1 µl of 10 mM dNTPs, 3 µl of 25 mM MgCl₂, 5 µl of each colored and colorless buffer 5 ×, and 0.3 µl of Taq polymerase (Promega, USA). Amplification was performed in an automaton thermocycler (ABI 9700 96 Well PCR, Applied Biosystems GeneAmp, USA). Primer sequences used in this study and the conditions for gene amplification are summarized in Table 1.

2.5 Statistical Method

Data were entered and described using software called Epi-info version 3.5.4. (CDC, USA). These data were then transcribed into an Excel database to facilitate a single and varied analysis. Statistical tests were interpreted at significance level corresponding to an alpha risk of 5%. Qualitative variables were compared using Pearson Chi-2 test or Fisher's exact test when one of variables was less than 5.

3. RESULTS

3.1 Description of Patients with Positive Urease Rapid Test Biopsies

Patient population was predominantly female with 62.2% (61/98). Men accounted for 37.8% (37/98). Average age was 42.6 years with a minimum of 19 years and a maximum of 77 years. The most represented age group was that of patients aged between 31 and 40 years. Although some gene was detected more in one sex than in the other, their presence was not significantly associated with the age or sex of the patients ($p > 0.05$).

3.2 Metronidazole Resistance Gene

RdxA and frxA genes of *H. pylori* conferring resistance to metronidazole (MTZ) were detected in 12.2% (12/98). FrxA gene alone was detected in 5.1% (5/98) (Fig. 1A).

3.3 Clarithromycin Resistance Gene

23S rRNA gene of *H. pylori* conferring resistance to clarithromycin (CLR) was detected in 26.5% (26/98) (Fig. 1B).

3.4 Amoxicillin Resistance Gene

H. pylori pbp1 gene conferring resistance to amoxicillin (AML) was detected in 58.2% (57/98) (Fig. 1C).

3.5 Cross Resistance

Cross-resistance to three antibiotics was observed in 8.2% (8/98). Amoxicillin and clarithromycin had a cross-resistance of 18.4% (18/98). For amoxicillin and metronidazole, cross-resistance was 4.1% (4/98). There was no cross-resistance for metronidazole and clarithromycin.

3.6 Clinical Characteristics of Patients with Resistance Genes of CLR, MTZ and AML

Patients with resistance genes of MTZ, CLR and AML had a familial history of ulcer syndrome in majority of cases. None of these patients used tobacco (Table 2).

Table 1. Sequences of primers used and PCR conditions

Gene/allelic variant	Amplicon size (bp)	Oligonucleotide primer pair (5' to 3' sequences)	PCR cycling conditions	Reference
<i>rdxA</i>	749	RDX1(GCCACTCCTTGAACCTTAATTTAGG) RDX4(CGTTAGGGATTTTATTGTATGCTAC)	95°C: 1 min, 60°C: 1 min: 30 sec, 72°C: 1 min *	[9]
<i>frxA</i>	913	FRXA1(CGAATTGGATATGGCAGCCG) FRXA4(TATGTGCATATCCCCTGTAGG)		
23S rRNA	280	CLA1995FW(GTAACTATAACGGTCCTAAG) CLA2274REV(GAAACATCAAGGGTGGTATC)	95°C: 1 min, 50°C: 1 min: 30 sec, 72°C: 1 min *	[10]
<i>pbp1</i>	953	PBP1F(CACGAGCACCGGTAAGATTT) PBP1R(CGCTATCGTCTGTTCTTTTGGG)	95°C: 1 min, 60°C: 1 min: 30 sec, 72°C: 1 min	[11]

* All are 30 cycles (except *pbp1*, 35 cycles); With an initial denaturation step 95°C, 3 min (except *pbp1* 1.5 min), and a final extension step 72°C, 5 min (except *pbp1* 7 min)

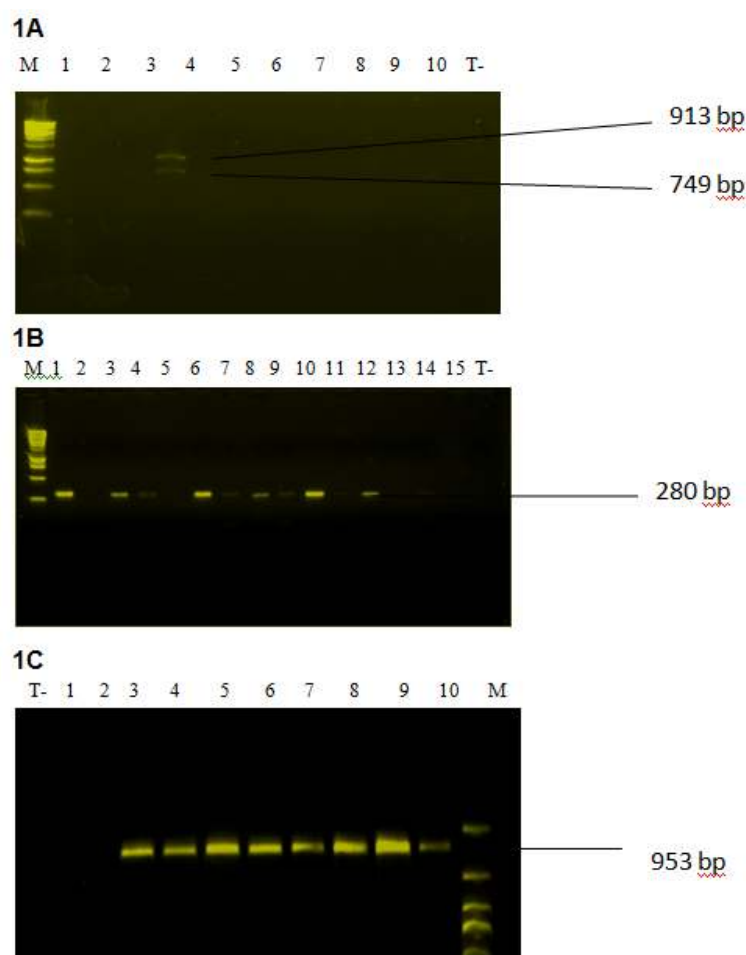


Fig. 1. Genotyping of rdxA/frxA, 23s RNA and pbp1 by PCR. A: rdxA/frxA gene. M: size marker, 200 bp. Line 3: rdxA/frxA positive gene. Line 1,2,4-10: rdxA/frxA negative gene. B: 23s RNA gene. M: size marker, 200 bp. Line 1,3,4,6-12: 23s RNA positive gene. Line 2,5,13-15: 23s RNA negative gene. C: pbp1 gene. M: size marker, 200 bp. Line 3-10: pbp1 positive gene. Line 1,2: pbp1 negative gene. T-: negative control without DNA. bp: base pairs

Table 2. Distribution of patients with genes according to clinical characteristics

	Genes			p-value
	MTZ (n=12)	CLR (n=26)	AML (n=57)	
Alcohol consumption	4 (33.3%)	7 (26.9%)	14 (24.6%)	0.48
Tobacco consumption	0	0	0	
Antecedent of fibroscopy	2 (16.6%)	5 (19.2%)	10 (17.5%)	0.5
Family history of ulcer syndrome	9 (75%)	17 (65.4%)	34 (59.6%)	0.33

Table 3. Distribution of resistance genes according to endoscopic aspect

Aspect endoscopique	Genes		
	MTZ (n=12)	CLR (n=26)	AML (n=57)
Gastropathy with gastric reflux	2(16.7%)	2(7.7%)	9(15.8%)
Erythematous gastropathy	7(58.3%)	15(57.7%)	30(52.6%)
Pangastropathy	3(25%)	7(26.9%)	15(26.3%)
Others ⁽¹⁾	0	2(7.7%)	3(5.3%)

⁽¹⁾Others: Savary Miller's stage 2 esophagitis, congestive duodenopathy, cortistone without oesophagitis

3.7 Presence of Resistance Genes According to Endoscopic Aspect

Majority of resistance genes were observed in cases of erythematous gastropathy and pangastropathy. No cases of normal gastric mucosa were observed (Table 3).

4. DISCUSSION

One of main causes of therapeutic failure is resistance of microorganisms to anti-infectives used. In Côte d'Ivoire, it was important to know level of resistance of *H. pylori* to amoxicillin, clarithromycin and metronidazole mainly as regards antibiotic resistance of *H. pylori* poses a real public health problem.

We consider that both sexes are also affected by *H. pylori*, but studies have shown a male predominance in Côte d'Ivoire [12], while our study reports a female predominance of 62.2%. This contrast is surely related to sampling fluctuations when recruiting patients. Unlike developed countries, *H. pylori* infection is common in young adults in developing countries [13,14,15]. This is confirmed in our study with an average age of infected subjects of 42.6 years.

Percentage of resistance to metronidazole in Côte d'Ivoire (12.2%) is low compared with other developing countries (Senegal: 90% [5], Nigeria: 55% [7], South Africa: 95.5% [16]) and developed countries such as France (61%) [17], Canada (32%), England (25%) and North America (20%). Resistance to Mtz is currently the most common type of resistance found in *H. pylori* and is, along with other types of antibiotic resistance, a major cause of elimination failure [9,18]. These differences in resistance levels are both associated with the use of imidazole in the treatment of various parasitic diseases and gynecological disorders than non-controlled access of this molecule in some countries. Studies have shown a higher rate of resistance to metronidazole among South African patients because Mtz was one of the most widely used antibiotics in their healthcare system [19]. Therefore, low resistance of *H. pylori* to MTZ in this study compared to developed countries would probably be due to expensive cost of this molecule in Côte d'Ivoire and thus make it less accessible to population.

Percentage of resistance to clarithromycin (26.5%) places Côte d'Ivoire slightly above the average European and American rates, which

are between 23 and 25% [8] but much higher than the rate in African countries (13%) where molecule was tested [4]. Frequency of resistances in different countries is related to use of macrolides, particularly in treatment of respiratory infections [20], as shown in study by De Koster et al. [21] in Belgium where resistance rate rose from 2.2% in 1990 to 11.1% in 1996. This rate of 26.5% in Côte d'Ivoire is certainly due to an earlier use of macrolides.

Amoxicillin appeared to be unaffected by problem of resistance. Indeed, highest resistance rate described in 2004 was less than 1% [8]. However, present study reports a high 58.2% resistance to amoxicillin. One of reasons would be overconsumption of this molecule in human medicine and self-medication observed in our populations probably due to accessibility and to low cost of this molecule. In fact, amoxicillin is used in Côte d'Ivoire as a first-line treatment for benign respiratory tract infections in adults and children. Studies in Côte d'Ivoire in community urinary tract infections reported a resistance rate of amoxicillin of more than 85% in strains of *Escherichia coli* [22]. Cross-resistance (8.2%) to three antibiotics studied clearly shows that self-medication, non-compliance with antibiotic protocols, antibiotic treatment in the probable absence of antibiotics, Standard antibiogram favor the emergence of bacteria resistant to one or more antibiotics. It becomes more than necessary to raise awareness of proper use of antibiotics. In addition, low cross-resistance to amoxicillin and metronidazole (4.1%) was observed and no cross-resistance to clarithromycin and metronidazole was identified in this study. This could guide protocol of treatment of *H. pylori* to the association of these two molecules (clarithromycin and metronidazole), especially in case of allergies to beta-lactams.

Alcohol and tobacco consumption were not significantly related to presence of genes studied ($p = 0.48$). We cannot attribute resistance to these factors because none of the patients used tobacco. Majority of patients had never undergone endoscopy before, few patients had already done (under 20%), this suggests that resistance detected in this study was primary and that we had new infections by *H. pylori*. Moreover, majority of gene carriers had a family history of ulcer syndrome, confirming interfamily dissemination of *H. pylori* [23]. However, contamination by same strain has not been demonstrated in this study.

No case of normal gastric mucosa was found in our study. Patients with genes were predominantly lesions of "endoscopic gastritis" (erythematous gastropathy and pangastropathy) characterized by inflammation and redness in gastric mucosa associated with presence and persistence of *H. pylori* in mucosa as described by Attia et al. [12]. This confirms pathogenesis of *H. pylori* in appearance of these pathologies [24]. Presence of antibiotic resistance genes used for treatment would confer to *H. pylori*, ability to foil all eradication attempts and persist in mucosa because presence of resistance genes was only observed in cases of pathologies and not in normal gastric mucosa [25,26,27]. Antibiotic resistance of *H. pylori* would favor the persistence of infection and its chronic evolution towards severe forms.

5. CONCLUSION

H. pylori rdxA/frxA, 23S rRNA and pbp1 genes conferring resistance to metronidazole, clarithromycin and amoxicillin respectively were identified in gastric biopsies. Due to high level of resistance to amoxicillin, classic tri-therapy of *H. pylori* eradication protocol in Côte d'Ivoire including amoxicillin, metronidazole and clarithromycin needs to be revised.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. New England Journal of Medicine. 2002;347:1175-1186.
2. Malferthiner P, Chan FK, Mc Coll KE. Peptic ulcer disease. Lancet. 2009;374:1449-1461.
3. Malferthiner P, Mégraud F, O'Morain C. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection—The maastricht III consensus report. Gut. 2007; 56:772-781.
4. Hunt RH, Xiao SD, Megraud F. *Helicobacter pylori* in developing countries. World gastroenterology organisation global guideline. J Gastrointest Liv Dis. 2011;20: 299-304.
5. Suk FM, Lien GS, Yu TC. Global trends in *Helicobacter pylori* research from 1991 to 2008 analyzed with the Science Citation Index Expanded. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2011;23:295-301.
6. Seck A, Mbengue M, Gassama-Sow A. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates in Dakar, Senegal. J Infect Developing Countries. 2009;3:137-40.
7. Kimang'a N, Revathi G, Kariuki S. *Helicobacter pylori*: Prevalence and antibiotic susceptibility among Kenyans. AS Afr Med J. 2010;100:53-7.
8. Megraud F. *H. pylori* resistance: Prevalence, importance, and advances in testing. Gut. 2004;53:1374-84.
9. Marais A, Bilardi C, Cantet F, Mendz LG, Mégraud F. Characterization of the Genes rdxA and frxA involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. Research in Microbiology. 2003 ;154(2):137-44.
10. Ribeiro ML, Vitiello L, Miranda MC, Benvengo YH, Godoy AP, Mendonca S, Pedrazzoli J, Jr. Mutations in the 23SrRNA gene are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Brazil. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2003;2:11.
11. Nishizawa T, Suzuki H, Tsugawa H, Muraoka H, Matsuzaki J, Hirata K, Ikeda F, Takahashi M, Hibi T. Enhancement of amoxicillin resistance after unsuccessful *Helicobacter pylori* eradication. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:3012-4.
12. Attia KA, N'Dri Yoman T, Diomandé MI. Aspects cliniques, endoscopiques et histologiques des gastrites chroniques à *Helicobacter pylori* en Côte d'Ivoire: Etude de 102 patients. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique. 2001;94:5-8.
13. Assi C, Ndah KJ, Allah Kouadio E. Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* et lésions précancéreuses du cancer gastrique chez les patients souffrant d'épigastralgies chroniques. Revue Africaine de Pathologie. 2010;9:25-31.
14. Ramanampamonjy RM, Randria MJD, Razafimahefa SH. Séroprévalence de l'infection due à *Helicobacter pylori* dans un échantillon de population malgache. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique. 2007; 100:57-60.
15. Seyedmajidi S, Mirsattari D, Zojaji H. Penbactam for *Helicobacter pylori* eradication: A randomised comparison of quadruple and triple treatment schedules in an Iranian population. Arab Journal of Gastroenterology. 2013;14:1-5.
16. Tanih NF, Ndip ML, Ndip NR. Characterisation of the genes encoding

- resistance to metronidazole (rdxA and frxA) and clarithromycin (the 23S-rRNA genes) in South African isolates of *Helicobacter pylori*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 2011;105(3): 251-59.
17. Raymond J, Lamarque D, Kalach N, Chaussade S, Burucoa C. High level of antimicrobial resistance in French *Helicobacter pylori* isolates. Helicobacter. 2010;15(1):21-27.
 18. Nahar, Shamsun, Asish K. Mukhopadhyay, Rasel Khan, Mian Mashhud Ahmad, Simanti Datta, Santanu Chattopadhyay, Swapan Chandra Dhar. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated in Bangladesh. Journal of Clinical Microbiology. 2004;42(10):4856-58.
 19. Tanih NF, Okeleye BI, Naidoo N, Clarke AM, Mkwetshana N, Green E, Ndip LM, Ndip RN. Marked susceptibility of South African *Helicobacter pylori* strains to ciprofloxacin and amoxicillin: Clinical implications. South African Medical Journal. 2010;100(1):49-52.
 20. Kato S, Shigeru F, Hirokazu U, Toshiaki S, Shunichi M, Kyoko O, Kazuie I. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Japanese children. Journal of Clinical Microbiology. 2002;40(2):649-53.
 21. De Koster E, Cozzoli A, Vanderborre CH. *pylori* resistance to macrolide increases, to imidazoles remains stable. Gastroenterology, 1997;112:A 99.
 22. Abo-Traoré AV. Résistance des souches d'*Escherichia coli* responsables d'infection urinaire communautaire collégées chez l'adulte de 2008 à 2010 à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Biblio Virt Ens Sup et Rech Sci. 2013;1.
 23. Megraud F. *Helicobacter pylori* en Europe et en Afrique. Différence dans le mode de contamination et la résistance aux antibiotiques. Acta Endoscopica. 1998;28-n°3.
 24. Ohata H, Kitauchi S, Yoshimura N, Mugitani K, Iwane M, Nakamura H, et al. Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. Int J Cancer. 2004;109:138-43.
 25. Jeong JY, Mukhopadhyay AK, Dailidienė D, et al. Sequential inactivation of rdxA (HP0954) and frxA (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. J Bacteriol. 2000;182: 5082–5090.
 26. Ahmad N, Zakaria WR, Abdullah SA, Mohamed R. Characterization of clarithromycin resistance in Malaysian isolates of *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol. 2009;15:3161–3165.
 27. Gerrits MM, Godoy AP, Kuipers EJ, Ribeiro ML, Stoof J, Mendonça S, van Vliet AH, Pedrazzoli J Jr., Kusters JG. Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. Helicobacter. 2006;11:181–187.

© 2017 Bernadette et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://sciedomain.org/review-history/18993>



Virulence genes of *Helicobacter pylori* in Côte d'Ivoire

^{*1} Diplo Tchépe Flore Bernadette, ² Gbonon Mbengue Valérie C, ³ Yapo Adou Francis, ⁴ Guessennd Nathalie, ⁵ Kakou N'gazon Solange, ⁶ Ouattara Aboulaye, ⁷ Coulibaly N'golo David, ⁸ Djaman Allico Joseph, ⁹ Dosso Mireille

^{1,3,8} Laboratory of Biochemical pharmacodynamics, Félix Houphouët Boigny, University, Ivory Coast, Côte d'Ivoire

^{5,7} Molecular biology platform of Pasteur Institute, Ivory Coast, Côte d'Ivoire

^{2,4,9} Bacteriology-Virology Department of Pasteur Institute, Ivory Coast, Côte d'Ivoire

⁶ Epidemiology Department of Pasteur Institute, Ivory Coast, Côte d'Ivoire

Abstract

Objective: To determine prevalence of *vacA*, *cagA* and *oipA* genotypes in gastric biopsies in Abidjan (Côte d'Ivoire).

Material and methods: A total of 98 positive urea rapid-biopsy specimens in an endoscopy room at Hospital and University Center of Cocody (Abidjan) for period from August 2015 to January 2016 were selected for the study. Gastric biopsies were collected and sent to Laboratory of Pasteur Institute of Côte d'Ivoire under conditions and delays of routing. Genes were detected by PCR.

Results: Gastric biopsies that had positive PCR to one or more genes were 71.4% (70/98). *CagA* and *oipA* genotypes were detected at 72.8% and 37.2%, respectively. *VacA* *sl* region was identified in 15.7% (11/70) and the *VacA* *mla* region in 5.7% (4/70). Taken together, *vacA* *sl* / *mla* allele was identified at 55.7% (39/70). 61.5% of patients were women and 38.5% of men with a sex ratio of 0.62. Average age was 41.7 years (between 19 and 72 years).

Conclusion: High prevalence of infection by virulent factors could be used to discern risk of developing severe gastroduodenal diseases in host and contribute to characteristics of *H. pylori* infection.

Keywords: *Helicobacter pylori*, virulence genes, Côte d'Ivoire

1. Introduction

Helicobacter pylori (*H. pylori*) colonizes stomach of more than 50% of human population in world and is probably one of most widespread bacterial pathogens [1-3]. Presence of *H. pylori* in the gastric mucosa is now associated with development of pathologies such as gastric or duodenal ulcer, chronic gastritis, MALT lymphoma or gastric cancer [4]. Research to elucidate the determinants of disease progression has revealed genetic diversity in the bacterium that increases risk of developing gastric cancer. Main virulence factors of *H. pylori* are related to cytotoxin-associated gene (*cagA*) [5, 6], vacuolating associated cytotoxin (*vacA*) gene [7, 8] and outer membrane protein gene (*oipA*) [9, 10]. *H. pylori* strains are often classified as *cagA* + or *cagA*- strains, depending on whether or not *cagA* bacterial protein encoded by *cagA* gene [11]. This protein of 120 to 240 kDa is injected into epithelial cell by Type IV secretion system (TIVSS). Once released into host cell, *cagA* protein is phosphorylated by Abl and Src family tyrosine kinases of glutamate-proline-isoleucine-tyrosine-alanine (EPIYA) motifs which, after interaction with phosphatase SHP- 2 causes dephosphorylation of cortactin and rearrangement of skeleton at gastric mucosa. This will lead to cellular morphological alterations called "hummingbird beaks". Several studies have shown a close link between this cellular motility and oncogenic transformation [12, 13]. *VacA* protein is encoded by *vacA* gene present in all strains of *H. pylori*. This highly immunogenic protein induces in vitro intracellular vacuolation [14] and is capable of immunosuppression by blocking activation of T lymphocytes which contributes to persistence and longevity of infection [15, 16]. *VacA* sequence shows a polymorphism in two

regions, central region (*m1* and *m2* alleles) and region coding for signal sequence (alleles *s1* and *s2*). Strains associating *s1/m1* alleles show a strong cytotoxic activity whereas those of genotype *s2/m2* which have no cytotoxic activity [17, 18]. Presence of functional *oipA* gene in *H. pylori* is strongly associated with duodenal ulcers, gastric cancer and increased infiltrations of neutrophils [19, 20]. *OipA* belongs to outer membrane protein family and is associated with high production of interleukin 8 (IL-8) *in vitro* [21]. It also plays a role in induction of gastric inflammation and production of inflammatory cytokines IL-1, IL-17 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in gerbils of Mongolia [22]. It contributes to induction of matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) strongly associated with gastric cancer [23]. This gene is located at approximately 100kb of pathogenicity island *Cag* on *H. pylori* chromosome [24]. In Côte d'Ivoire, data on these *H. pylori* genotypes are rare and there are no data to date on *vacA* and *oipA* genes. Our study is the first of its kind to simultaneously study several genotypes and aims to determine biodiversity of *H. pylori* virulence genotypes from gastric biopsies.

2. Material and methods

Gastric biopsies

A total of 98 positive urea urea-positive biopsies in endoscopy room at Hospital and University Hospital center of Cocody for period from August 2015 to February 2016 were selected for study. Samples were sent to Bacteriology-Virology laboratory of Pasteur Institute of Côte d'Ivoire under conditions and within a maximum of 4 hours. Biopsies were then stored in dry tubes at -80 °C.

Ethics

All patients asked a socio-demographic questionnaire (age, sex, occupation) and medical history validated by Ethics Committee of Pasteur Institute of Côte d'Ivoire. Written consent was also given by each patient before endoscopy.

Extraction of *H. pylori* DNA

Extraction of *H. pylori* DNA was performed according to DNA extraction protocol of NucliSENS® kit with some modifications. Biopsies were ground in 0.3 ml of 1X PBS buffer with Potter grinder into a sterile tube and then suspended in 500 µl of buffer containing Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0, Proteinase K 1 mg/ml and incubated at 60 °C for 24 h. DNA was extracted in 500 µl of lysis buffer containing 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% SDS and Proteinase K 100 µg/ml for 1 h at 60°C. 1 ml of phenol-chloroform-iso-amyl alcohol mixture (25:24:1) was added and centrifuged at 13000 rpm for 15 min. Aqueous phase (upper phase) was collected and 1/10th of 3M sodium acetate and 500 µl of absolute ethanol were added and incubated 1 h at -80°C for 1 h or overnight at -20°C. The pellet obtained is washed with 70% ethanol and dried at 65°C for 15 min. Pellet obtained is eluted in 60 µl of

buffer and DNA is stored at -20°C.

H. pylori genotyping

PCR was carried out in a volume of 50 µl containing 0.75 µl of each 10 mM primer, 3 µl of genomic DNA, 1 µl of 10 mM dNTPs, 3 µl of 25 mM MgCl₂, 5 µl of each colored and colorless buffer 0.3 µl of Taq polymerase (Promega (R)). Amplification was carried out in an automaton thermocycler (Biometra® UNO II). Table 1 summarizes sequences of primers used and different sizes expected. After initial denaturation of 94 °C for 5 min, amplification for *cagA* and *vacA* genes was 35 cycles of 94 °C: 1 min; 52 °C: 1min; 72 °C: 1min. Each cycle had a final elongation phase of 72 °C for 7 min. For *oipA* gene, after an initial denaturation step of 94 °C for 5 min, cycle was also 35 cycles of 94 °C: 1min; 56 °C: 1min; 72 °C: 1 min with a final elongation step of 72 °C for 7 min. Migration of PCR products was performed on 1.5% agarose gel and detection by a GelDoc™ XR System (Bio-Rad Laboratories, Hertfordshire, UK). A negative control which did not contain DNA was used for quality control of amplifications.

Table 1: PCR primers for amplification of *vacA*, *cagA* and *oipA* sequences

Region	Primers	Sequences	sizes (bases pairs (bp))	References
CagA	D008 R008	5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCG-3' 5'-TTAGAATAATCAACAAACATCAGCCA-3'	298	[25]
VacA S	SIGF SIGR	5'-ATGGAATACAACAAACACACCG-3' 5'-CAACCTCCATCAATCTTACTGGA-3'	338	[26]
M	VA6-F VA5-5	5'-TCAATATCAACAAGCTC-3' 5'-CCGCATGCTTTAATGTC-3'	787	[27]
slA	SS1-Fa VA1-R	5'-GTCAGCATCACACCGCAAC-3' 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'	190	[27]
mlA	VA3-F VA3-1R	5'-GGGTCAAAATGCGGTCATGG-3' 5'-CTGTAGTGCCCGCAGAAAC-3'	290	[27]
OipA	HP0638F HP0638R	5'-GTTTTTGATGCATGGGATTT-3' 5'-GTGCATCTCTTATGGCTTT-3'	401	[28]

Statistical method

Data were entered and described using software called Epi-info version 3.5.4. These data were then transcribed into an Excel database to facilitate a single and varied analysis. Statistical tests were interpreted at significance level corresponding to an alpha risk of 5%. Qualitative variables were compared using Pearson Chi-2 test or Fisher's exact test when one of variables was less than 5.

3. Results

Prevalence of detected genes and general characteristics of patients with genotypes

Biopsies that had positive PCR to one or more genes were 71.4% (70/98) and 28.6% (28/98) were negative for all genes. The population of patients with genotypes was predominantly female with 61.4% (43/70). Men accounted for 38.6% or 27/70. Average age was 41.7 years with a minimum of 19 years and a maximum of 72 years. The most represented age group was that of patients aged between 31 and 40 years. Although some genotypes were detected more in one sex than

in other, their presence was not significantly associated with age or sex of patients ($p > 0.05$).

VacA genotype

Sizes of amplification products for *vacA* *slA* and *vacA* *mlA* were 190 bp and 290 bp respectively. *VacA* *slA* region was identified in 15.7% (11/70) and the *vacA* *mlA* region in 5.7% (4/70). Together, the *slA* / *mlA* allele was identified at 55.7% (39/70). A proportion of 22.9% (16/70) could not be sought in our study.

CagA genotype

CagA genotype was detected at 72.8% (51/70). Gene was absent in 19/70 or 27.8%. 298 bp amplification products indicating the presence of the *cagA* are shown in FIG. 1A.

Genotype of oipA

OipA genotype was detected at 37.2% (26/70). Amplification products of 401 bp indicating presence of *oipA* are shown in FIG. 1B.

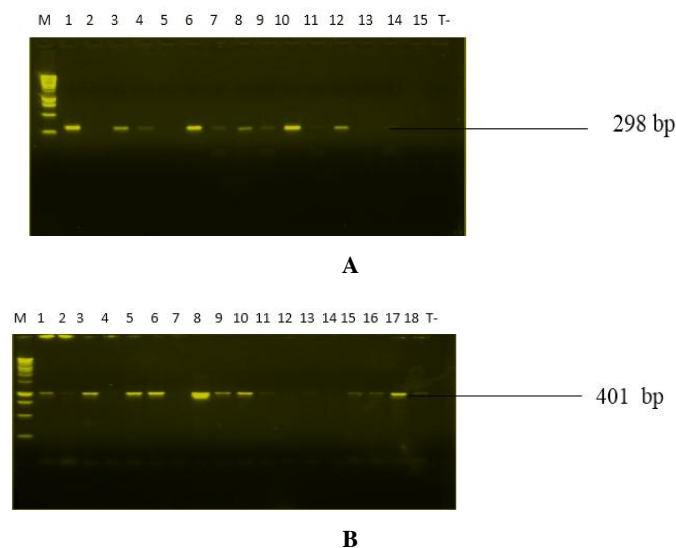


Fig 1: Genotyping of cagA and oipA by PCR. **A:** CagA genotype. M: size marker, 250 bp. Line 1, 3, 4, 6-12: cagA positive gene. Line 2, 5, 13-15: cagA negative gene. **B:** Genotype of oipA. M: size marker, 100 bp. Line 1-3,5,6, 8-11,13, 15-18: oipA positive gene. Line 3,7,12 and 14: oipA negative gene. T-: negative control without DNA.

Distribution of genotypes according to endoscopic aspect

All genotypes were mainly identified in cases of erythematous gastropathy and pangastropathy (Table 2).

Table 2: Frequency of identified genotypes according to endoscopic aspect

Endoscopic aspect	Genotypes		
	S1a+/m1a+	cagA+	oipA+
Gastropathy with gastric reflux	8(20,6%)	6(11,8%)	3(11,5%)
erythematous gastropathy	20(51,3%)	29(56,8%)	15(57,7%)
Pangastropathy	9(23,1%)	13(25,5%)	7(26,9%)
Other ⁽¹⁾	1(2,6%)	2(3,9%)	1(3,9%)
Normal	1(2,6%)	1(2%)	0(0%)
Total	39(100%)	51(100%)	26(100%)

⁽¹⁾Other: Savary Miller's stage 2 esophagitis, congestive duodenopathy

Genotypes and family history of ulcer syndrome

41/70 (58.6%) of patients with genes had a family history of ulcer syndrome. Presence of VacA s1a+/m1a+ genotypes was significantly associated with patients with a family history of ulcer syndrome ($p = 0.012$).

Combined genotypes according to endoscopic aspect

Based on search for cagA gene, vacA region (s1a and m1a) and oipA gene, five different genotypic combinations were identified. The most common genotype was s1a+/m1a+/cagA+/oipA- at 30% (21/70) and majority of combined genotypes were observed in erythematous gastropathy and pangastropathy (Table 2).

Table 2: Frequency of the different genotypic combinations observed according to the endoscopic aspect

Endoscopic aspect	Combined genotypes				
	S1a+/m1a+/cagA+/oipA+	S1a+/m1a+/cagA+/oipA-	S1a+/m1a+/cagA-/oipA+	S1a+/m1a-/cagA+/oipA+	S1a-/m1a+/cagA+/oipA+
Gastropathy with gastric reflux	0(0%)	5(23,8%)	1(25%)	0(0%)	0(0%)
Erythematous gastropathy	8 (88,9%)	7(33,3%)	2(50%)	1(100%)	0(0%)
Pangastropathy	1(11,1%)	7(33,3%)	1(25%)	0(0%)	1(100%)
Other ⁽¹⁾	0(0%)	1(4,8%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Normal	0(0%)	1(4,8%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Total	9(100%)	21(100%)	4(100%)	1(100%)	1(100%)

⁽¹⁾Other: Savary Miller's stage 2 esophagitis, congestive duodenopathy.

4. Discussion

The present study reports that genotypes vacA, cagA and oipA have been identified in gastric biopsies. A female predominance with a sex ratio of 0.62 male/female was reported. Similar results have been reported by Ben Mansour *et al.* [29] in Tunisia. However, no study in our knowledge has demonstrated a link between sex and presence of virulence genes. Majority of genotypes were identified in patients aged between 31 and 40 years. This average age is by far less than that of developed countries which is around 60 years [30]. This confirms that in developing countries *H. pylori* contamination is early. Indeed, several studies tend to show that an individual has very little risk of being infected after the age of 10 years [31]. Risk factors for acquiring *H. pylori* infection are frequently associated with poverty. They include promiscuity, lack of hygiene, bed sharing in childhood, and low parental education [32].

Predominant genotype in gastric biopsies was cagA + genotype (72.8%). Our results were in agreement with those of Senegal, which reported a prevalence of 73.3% of cagA genotype [33], while Ben Mansour *et al* reported a prevalence of 61.6% of cagA genotype [29]. This shows geographical influence on

adaptation of organism to its environment and climatic conditions. Indeed, concerning Côte d'Ivoire and Senegal there is a geographical and climatic proximity between these two countries in relation to Tunisia. For vacA genotype, strongly associated vacA s1a+/m1a+ allele was high (55.7%). A study in South Africa reported absence of this allele in isolated *H. pylori* strains [34]. This explains well disparity in geographical distribution of *H. pylori* strains [35].

In this study, oipA genotype was found at 37.2% while Ben Mansour *et al.* found oipA at 90.8% in Tunisia [29]. This contrast explains adaptability of *H. pylori* to its environment and climatic conditions, but to its host because oipA is strongly involved in immune response in host [36, 37].

All identified genotypes were predominant in cases of erythematous gastropathy and pangastropathy associated with inflammation and lesions in the gastric mucosa that typically characterize *H. pylori* infection [38]. This expresses clearly relationship between gene status and clinical symptoms in populations of patients studied.

Among patients with genotypes, 41/70 (58.6%) had a family history of ulcer syndrome and vacA s1a+/m1a+ genotype was significantly associated ($p = 0.012$). In other words, same

genotype is found in members of same family because vacA s1a+/m1a+ genotype is a specific subtype of *H. pylori*. These results show clearly notion of human-to-human contamination and that family environment would contribute to spread of bacteria [39].

Combination of different genotypes vacA, cagA and oipA illustrates mosaic composition of *H. pylori* genome. S1a+/m1a+/cagA+/oipA+ genotype was exclusively observed in cases of erythematous gastropathy and pangastropathy. This shows multifunctional character in the mechanism of gastric mucosa infestation using several virulence factors [40]. Also, detection of multiple genotypes involves presence of multiple strains in clinical specimens. Indeed, 22.9% of strains could not be investigated with primers s1a and m1a used in the study. This suggests presence of alleles other than those identified in this study. This would imply that it is possible for more than one strain to be acquired in childhood, especially in countries where prevalence of *H. pylori* is high, however, there is no evidence that several strains colonize simultaneously (co-infection). In addition, several studies have demonstrated that coinfection or superinfection are common [41, 42].

5. Conclusion

VacA, cagA and oipA genotypes of *H. pylori* were identified from gastric biopsies in Abidjan. In Côte d'Ivoire it is possible that the high prevalence of infection with virulent factors contributes to characteristics of *H. pylori* infection and is used to discern risk of development of infection to forms more severe diseases such as gastric cancer.

6. References

- Blaser MJ. Ecology of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *J Clin Invest*. 1997; 100:759-62.
- Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis*. 1990; 161:626-33.
- Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10:720-41.
- Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*. 2004; 11:321-333.
- Mattar R, Marques SB, Monteiro Mdo S, Dos SA, Iriya K, Carrilho FJ. *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. *J Med Microbiol*. 2007; 56:9-14.
- Tomasini ML, Zanussi S, Sozzi M, Tedeschi R, Basaglia G, De Paoli P. Heterogeneity of cag genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:976-980.
- Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut*. 1997; 40:701-704.
- Cover TL. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 1996; 20:241-246.
- Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97:7533-7538.
- Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, et al. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomics analysis of hopH gene polymorphisms. *J Infect Dis*. 2006; 194:1346-1355.
- Covacci A, Censini, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(12):5791-5795.
- Odenbreit S, Puls J, et al. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*. 2000; 287(5457):1497-1500.
- Stein M, Bagnoli F, et al. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol*. 2002; 43(4):971-980.
- Hotchin NA, Cover TL, et al. Cell vacuolation induced by the VacA cytotoxin of *Helicobacter pylori* is regulated by the Rac1 GTPase. *J Biol Chem*. 2000; 275(19):14009-14012.
- Gebert B, Fischer W, et al. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*. 2003; 301(5636):1099-1102.
- Sundrud MS, Torres VJ, et al. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(20):7727-7732.
- Miehlke S, Kirsch C, et al. The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer*. 2000; 87(3):322-327.
- Rhead JL, Letley DP, et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*. 2007; 133(3):926-936.
- Yamaoka YO, Ojo, et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut*. 2006; 55(6):775-781.
- Franco AT, Johnston E, et al. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res*. 2008; 68(2):379-387.
- Yamaoka Y, Kudo T, et al. Role of interferon-stimulated responsive element-like element in interleukin-8 promoter in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2004; 126(4):1030-1043.
- Sugimoto M, Ohno T, et al. Gastric mucosal interleukin-17 and -18 mRNA expression in *Helicobacter pylori*-induced Mongolian gerbils. *Cancer Sci*. 2009; 100(11):2152-2159.
- Wu JY, Lu H, et al. Balance between polyoma enhancing activator 3 and activator protein 1 regulates *Helicobacter pylori*-stimulated matrix metalloproteinase 1 expression." *Cancer Res*. 2006; 66(10):5111-5120.
- Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97:7533-7538.
- Matsunari O, Shiota S, Suzuki R, Watada M, Kinjo N, Murakami K, et al. Association between *Helicobacter pylori* virulence factors and gastroduodenal diseases in Okinawa, Japan. *J Clin Microbiol*. 2012; 50:876-83.
- Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R. Expanding allelic diversity of *H. pylori* vacA. *J Clin Microbiol*. 1998; 36:2597-2603.
- Atherton JCCP, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of

- Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem. 1995; 270:17771-7.
28. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application to finger printing of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 1991; 19:6823-6831.
29. Ben Mansour K, Fendri C, Zribi M, Masmoudi A, Labbene M, Fillali A, *et al.* Prevalence of Helicobacter pylori vacA, cagA, iceA and oipA genotypes in Tunisian patients. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2010; 9:10-17.
30. Pilotto A, Malfertheiner P. Review article: an approach to Helicobacter pylori infection in the elderly. Aliment Pharmacol Ther. 2002; 16(4):683-691.
31. Megraud F. Helicobacter pylori en Europe et en Afrique. Différence dans le mode de contamination *et al.* résistance aux antibiotiques. Acta Endoscopica 1998, 28:3.
32. Traoré HA, Maiga MY, Diarra M, Picard E, Dembélé M, Diallo AN, *et al.* Etude anatomo-clinique des gastritis chroniques au Mali. Dakar medical. 1994; 39:207-11
33. Breurec S, Michel R, Seck A, Briss S, Côme D, Dieye FB, *et al.* Clinical relevance of cagA and vacA gene polymorphisms in Helicobacter pylori isolates from Senegalese patients. Clin Microbiol Infect. 2012; 18:153-159.
34. Letley DP, Lastovica A, Louw JA. Allelic diversity of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin gene in South Africa: rarity of the vacA sla genotype and natural occurrence of an s2/ml allele. J ClinMicrobiol. 1999; 37:1203-1205.
35. Vincent P, Gottrand F, Leclerc H. Epidémiologie d'*Helicobacter pylori*: disparités dans la distribution de l'infection. Gastroenterol. Clin. Biol. 1996; 20:S27-33.
36. Lu H, Wu JY, Kudo T, Ohno T, Graham DY, Yamaoka Y. Regulation of interleukin-6 promoter activation in gastric epithelial cells infected with Helicobacter pylori. Mol Biol Cell. 2005; 16:4954-4966.
37. Yamaoka Y, Kikuchi S, el Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS, Graham DY. Importance of Helicobacter pylori oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. Gastroenterology. 2002; 123:414-44.
38. Sibony M, Jones NL. Recent advances in Helicobacter pylori pathogenesis. Cur Opin Gastroenterol. 2012; 28:30-5.
39. Megraud F. *Helicobacter pylori* en Europe et en Afrique. Différence dans le mode de contamination et la résistance aux antibiotiques. Acta Endoscopica. 1998; 28-n°3.
40. George JT, Boughan PK, *et al.* Host anti-microbial response to Helicobacter pylori infection. Mol Immunol. 2003; 40(7):451-456.
41. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, van Asbroek M, Sousa JC, *et al.* Typing of Helicobacter pylori vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization. J Clin Microbiol. 1998; 36:1271-1276.
42. Gonzalez-Valencia G, Atherton JC, Munoz O, Dehesa M, la Garza AM, Torres J. Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes in Mexican adults and children. J Infect Dis. 2000; 182:1450-1454.

Helicobacter pylori TipA gene identified in gastric biopsies in Abidjan (Ivory Coast)

^{*1} Diplo Tchépe Flore Bernadette, ² Gbonon Mbengue Valérie C, ³ Yapo Adou Francis, ⁴ Guessennnd Nathalie, ⁵ Kakou N'gazoa Solange, ⁶ Ouattara Aboulaye, ⁷ Coulibaly N David, ⁸ Djaman A Joseph, ⁹ Dosso Mireille

^{1,3,8} Laboratory of Biochemical pharmacodynamics, Félix Houphou t Boigny, University, Ivory Coast, Côte d'Ivoire

^{5,7} Molecular biology platform of Pasteur Institute, Ivory Coast, Côte d'Ivoire

^{2,4,9} Bacteriology-Virology Department of Pasteur Institute, Ivory Coast, Côte d'Ivoire

⁶ Epidemiology Department of Pasteur Institute, Ivory Coast, Côte d'Ivoire

Abstract

Objective: To determine presence of *H. pylori* tipA gene in gastric biopsies and risk factors associated with presence of this gene in Abidjan (Côte d'Ivoire).

Material and methods: This study included 169 adult patients justifying upper endoscopy at Hospital and University Center of Cocody (Abidjan) for the period from August 2015 to January 2016. Rapid urea test was performed and tipA gene was detected by PCR. Clinical and socio-demographic information was collected from a plug investigation.

Results: Rapid urea test was positive at 58% (98/169). TipA gene was detected 58.2% (57/98). Patients with tipA gene had a female predominance of 34/57 (59.7%). Majority of the tipA gene was identified in patients aged 31-40 years (31.6%). Senior staff accounted for 18/57 (31.6%) of holders tipA gene and epigastralgi s were the first indication for endoscopy, 35/57 (61.4%). More than half of patients with tipA gene (59.6%) reported having a family history of ulcer syndrome. TipA gene was observed mostly in cases of erythematous gastropathy (56.1%) and pangastropathy (24.6%).

Conclusion: high presence of tipA gene in gastric biopsies and risk factors described could contribute to characterization of *H. pylori* infection in Abidjan.

Keywords: *Helicobacter pylori*, tipA gene, gastric biopsies, Abidjan

Introduction

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is the leading cause of development of gastric cancer in humans [1-3]. According to International Agency for Research on Cancer (IACR), it is currently the only carcinogenic bacterium of class 1 [4]. *H. pylori* exerts its pathogenesis by secretion of toxins including hemolysin, lipopolysaccharides, CagA and VacA. CagA and VacA are main virulence factors [5-7]. The persistence of *H. pylori* infection allows its toxins to stimulate epithelial cells to produce a large number of cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- ), interleukins 1, the 6 and 8 (IL1, IL6 And IL8), thus generating an inflammatory response [8]. Tumor necrosis factor alpha inducing protein (tipA) is a novel toxin newly discovered that probably accelerates inflammation and cancers caused by *H. pylori* [9]. This protein is coded by tip gene located at position Hp0596 of strain *H. pylori* 26695 and at a length of 519 base pairs (bp) [10]. It has been shown that tipA induces promotion of the tumor in vitro and in vivo [11] and that there exists on the surface of cancerous human gastric cells, a receptor called nucleolin capable of binding to tipA. The internalization of the nucleolin-tipA complex induces tumor progression and a mesenchymal epithelial, a transition in the gastric carcinogenesis process [12, 13]. The aim of this study is to determine presence of TipA gene of *H. pylori* in gastric biopsies as well as risk factors associated with presence of this gene.

Material and methods

Patients

A total of 169 adult patients ambulatory or hospitalized adult patients of both sexes justifying of a upper endoscopy at Hospital and University Center of Cocody for period from August 2015 to February 2016 was selected for the study.

Gastric biopsies

Four biopsies (2 antrum and 2 corpus) were taken from each patient and collected in sterile bottles containing 0.5-1 ml of sterile physiological water. Samples were sent to the Bacteriology-Virology laboratory of Pasteur Institute of Côte d'Ivoire under conditions of routing and within a maximum of 4 hours. Biopsies were then stored in dry tubes at -80 C.

Ethics

All patients were asked a questionnaire concerning socio-demographic data (age, sex, occupation) and medical history validated by ethics committee of Pasteur Institute of Ivory Coast. A written consent was given by each patient before endoscopy.

Rapid urea test

A biopsy of antrum and one of corus were taken and were used for rapid urea test. Biopsies were placed in a Fergusson urea-indole medium for reading within one hour. Passage from

middle of orange-yellow color to fuschia pink indicates presence of urease activity. Biopsies with positive rapid urea test were chosen for search of *tipA* gene. In case where antrum and corpus were positive for rapid urea test, only antrum was used for molecular biology. Also, when only one of samples was positive, only this sample was used for molecular biology.

Extraction of *H. pylori* DNA

Extraction of *H. pylori* DNA was performed according to DNA extraction protocol of NucliSENS® kit with some modifications. Biopsies were ground in 0.3 ml of 1X PBS buffer with Potter grinder into a sterile tube and then suspended in 500 µl of buffer containing Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0, Proteinase K 1 mg / ml and incubated at 60 °C for 24 h. DNA was extracted in 500 ml of lysis buffer containing 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% SDS and Proteinase K 100 µg / ml for 1 h at 60°C. 1 ml of phenol-chloroform-iso-amyl alcohol mixture (25: 24: 1) was added and centrifuged at 13000 rpm for 15 min. Aqueous phase (upper phase) was collected and 1/ 10th of 3M sodium acetate and 500 µl of absolute ethanol were added and incubated 1 at -80°C for 1 h or overnight at -20°C. The pellet obtained is washed with 70% ethanol and dried at 65°C for 15 min. Pellet obtained is eluted in 60 µl of buffer and DNA is stored at -20°C.

Genotyping of *H. pylori* *tipA* gene

PCR was performed in a volume of 50 µl containing 0,75 µl of each primer of 10 mM, 3 µl genomic DNA, 1 µl 10mM dNTPs, 3 µl of 25 mM MgCl₂, 5 µl of each colored and colorless 5X buffer, and 0.3 µl of Taq polymerase (Promega (R)). Amplification was performed in automaton thermocycler (Biometra® UNO II). After initial denaturation of 94°C for 5 min, amplification was 35 cycles of 94°C: 1 min; 56°C: 1min; 72°C: 1min. Each cycle had a final elongation phase of 72°C for 7 min. Migration of PCR products was performed on 1.5% agarose gel and detection by System™ XR GelDoc (Bio-Rad Laboratories, Hertfordshire, UK). Primers HP0596F 5'AGAGCATATGCTGCAGGCTTGCACTTGCCC-3' and 5'-HP0596R TCTCGGATCCTACATGGCTATAGGGACTTT-3 were used to amplify DNA sequence of *H. pylori* *tipA* gene size of 519 bp^[10]. Negative control not containing DNA was used for the quality control of amplifications.

Statistical method

Data was entered and described using software called Epi-info version 3.5.4. These data were then transcribed into Excel database thus facilitating a single, varied analysis of these data. Statistical tests were interpreted at significance level corresponding to alpha risk of 5%. Qualitative variables were compared using Pearson Chi-2 test or Fisher's exact test when one of variables was less than 5.

Results

Prevalence of *H. pylori* infection according to rapid urea test

Rapid urea test was positive in 98 patients with rate of 58% (98/169). There was no significant difference between the rapid urea test and the biopsy site ($p > 0.05$).

Prevalence of *tipA* gene in gastric biopsies

TipA genotype was searched for in the 98 biopsies with positive urea test. The gene was detected at 58.2% (57/98). He was absent in 41.8% (41/98). Amplification products indicating presence of *tipA* gene are shown in Fig 1.

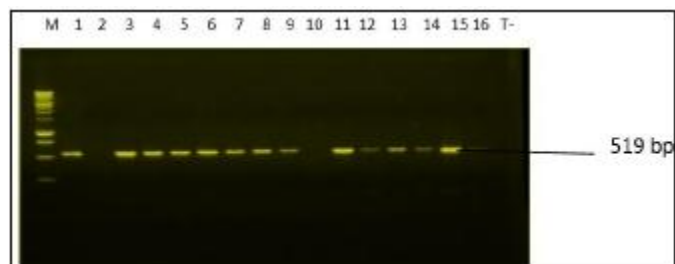


Fig 1: Genotyping of *tipA* gene by PCR. M: size marker, 250 bp. Line 1, 3-9, 11-16: *tipA* positive gene. Line 2 and 10: *tipA* negative gene. T-: negative control without DNA.

General characteristics of patients with *tipA* gene

According age, sex, profession and endoscopic indication

Patients with *tipA* gene had a female predominance of 34/57 (59.7%). Majority of *tipA* gene was identified in patients aged 31-40 years (31.6%). Senior staff represented 18/57 (31.6%) of carriers patients and epigastralgia was the first indication for endoscopy, 35/57 (61.4%) (Table 1).

Table 1: Description of the patients carrying the *tipA* gene according to sex, age, profession and endoscopic indication

Patients	Number	Percent(%)
Sex	Men: 23	40,3
	Women: 34	59,7
Age	20-30 years : 11	19,3
	31-40 years : 18	31,6
	41-50 years : 17	29,8
	>50 years : 11	19,3
Profession	Senior staff : 18	31,6
	Student : 5	8,7
	Employees : 9	15,8
	Unemployed : 11	19,3
Endoscopic indication	Informal sector :14	24,6
	Epigastralgia: 35	61,4
	Gastric ulcer: 7	12,3
	Non ulcer dyspepsia: 4	7,0
	Search for HTP: 4	7,0
	Halitosis: 2	3,5
	Other ¹ : 5	8,8

¹ Other: dysphagia, anemia, vomiting, unilateral odynophagia, gastroesophageal reflux disease (GERD).

HTP: Portal hypertension

According family history of ulcer syndrome

More than half of patients with *tipA* gene, 34/57 (59.6%) admitted having a family history of ulcer syndrome.

Distribution of *tipA* gene according to observed endoscopic aspect

TipA gene was observed mostly in cases of erythematous gastropathy (56.1%) and pangastropathy (24.6%).

Table 2: Distribution of the tipA gene according to endoscopic aspect

Endoscopic aspect	TipA gene	
	Number	Percent (%)
Gastropathy with gastric reflux	8	14,1
Erythematous gastropathy	32	56,1
Pangastropathy	14	24,6
Other ¹	2	3,5
Normal	1	1,7
Total	57	100

¹Other: Savary Miller's stage 2 esophagitis, congestive duodenopathy.

Discussion

H. pylori infection is a public health challenge in some developing countries due to high morbidity and mortality. In our study population, prevalence of 58% according to rapid urea test remains stable and low compared with prevalence in developing countries [14, 15]. Indeed, a real awareness of the infectious origin of gastroduodenal diseases has been observed in our populations and necessity of a therapeutic management based on anti-infectious has contributed certainly to reduce prevalence in our countries although, problem of the emergence of antibiotic resistance remains.

High prevalence of tipA 58.2% gene in our study revives notion of "African enigma" which stipulated that despite high rate of *H. pylori* infection in Africa, rate of gastric cancer was relatively low [16]. Indeed, a close involvement of tipA protein in gastric carcinogenesis has recently been described [10, 11] and many studies are performed with aim to elucidate mechanism by which tipA induces gastric cancer [12, 13]. Data on this gene are not available in Ivory Coast certainly because of its recent discovery.

Female predominance with a sex ratio of 0.67 was observed in our study. This confirms data from World Alliance against Cancer, which reported that children and young women overrepresented in populations appeared to be proportionally more affected in terms of the incidence of cancer in developing countries [17]. However, according to WHO, gastric cancer has higher rate in men than in women in Ivory Coast with major risk factors such as smoking and alcohol [18]. This contrast may be explained by lower life expectancy for men (52 years) than for women (54 years) in our current health context [18].

In study population, the mean age was 42 years with a maximum rate (31.6%) for 31 to 40 age group. This confirms that *H. pylori* contamination in developing countries occurs early in childhood and that infection is predominant in young adults [19, 20]. There would therefore be a real risk of developing gastric cancer before age 50 years. Also, patients with tipA gene whose age ranged between 41-50 years (29.8%) were approximately same percent as those aged 30-40 years. We understand why the total life expectancy of the Ivorian population is 53 years at birth [18].

In our study, senior staff accounted for 31.6% of patients with tipA gene. We expected an obvious association between socio-economic status and *H. pylori* infection due to high prevalence observed in poor populations, probably because of promiscuity and precarious hygiene that characterize them [21, 22]. However, tipA gene was more representative in persons with a good socio-economic situation. It should not be overlooked that in our current public hospital setting, the cost

of conducting the endoscopy examination is high (50,000 francs CFA = \$ 82), given that poverty rate in Ivory Coast is 49% and that one Ivorian on two lives on less than 1 dollar by day [23]. It is evident that people with low incomes cannot be able to perform endoscopy.

Our study showed that epigastralgia (61.4%) represented first indication of endoscopy in patients with tipA gene and 59.6% had a family history of ulcerative syndrome. This confirms primary ethiopathological role of *H. pylori* in gastroduodenal pathologies and more particularly in gastric cancer. Genetic inheritance of cancer and human-to-human transmission would be in favor of a family environment favoring infection in these patients. Recent studies have shown that there is a link between cancerous human gastric cells and tipA gene in the progression of the tumor [12, 13].

Involvement of *H. pylori* in evolution of infection to the most severe forms such as gastric cancer has been well established [24, 25]. We observed in this study that more than half of the patients with the tipA gene (56.1%) had endoscopic erythematous gastropathy. In other words, a massive presence of the bacterium in patients with gastric mucosa where persisting inflammation hence redness on the stomach mucous membranes. Indeed, these forms of gastritis are generally associated with oxydative stress generated during infection which contributes to cellular dysfunction and direct oxydative damage to the DNA [26].

Conclusion

Presence of tipA gene in gastric biopsies was high and the risk factors described were age, familial history of ulcer syndrome and endoscopic appearance. This study is the first in series that will collect data for better characterization of *H. pylori* infection and effective management of emergence of gastroduodenal diseases related to *H. pylori* in Ivory Coast.

References

1. Normark S, Nilsson C, Normark BH, Hornef MW. Persistent infection with *Helicobacter pylori* and the development of gastric cancer. *Adv Cancer Res.* 2003; 90:63-89.
2. Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nature Rev Cancer.* 2002; 2:28-37.
3. Correa P. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12:238s-241s.
4. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC, Lyon. 1994; 61:177-240.
5. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Cover TL. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing CagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of stomach. *Cancer Res.* 1995; 55:2111-2115.
6. Atherton J, Cao P, Peek R, Tumurru M, Blaser M, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of peptic vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chim.* 1995; 270:17771-17777.
7. Al Qabandi A, Mustafa AS, Siddique I, Khajah AK, Madda JP. Distribution of vacA and cagA genotypes of

- Helicobacter pylori in Kuwait. *Acta Trop.* 2005; 93:283-288.
8. Suganuma M, Okabe S, Kurusu M, Iida N, Ohshima S, Saeki Y *et al.* Discrete roles of cytokines, TNF- α , IL-1, IL-6 in tumor promotion and cell transformation. *Int J Oncol.* 2002; 20:131-136.
9. Suganuma M, Kurusu M, Okabe S, Sueoka N, Yoshida M, Wakatsuki Y *et al.* Helicobacter pylori membrane protein 1: a new carcinogenic factor of Helicobacter pylori. *Cancer Res.* 2001; 61:6356-6359.
10. Suganuma M, Kurusu M, Suzuki K, Nishizono A, Murakami K, Fujioka T *et al.* Tumor necrosis factor alpha inducing protein released from Helicobacter pylori for gastric cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005; 131:305-313.
11. Suganuma M, Yamaguchi K, Ono Y, Matsumoto H, Hayashi T, Ogawa T *et al.* TNF- α inducing protein, a carcinogenic factor secreted from H. pylori, enters gastric cancer cells. *Int J Cancer.* 2008; 123(1):117-122.
12. Suganuma M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takahashi A, Fujiki H. Human gastric cancer development with TNF- α -inducing protein secreted from Helicobacter pylori. *Cancer Lett.* 2012, 322(2):133-138.
13. Watanabe T, Takahashi A, Suzuki K, Kurusu Kanno M, Yamaguchi K, Fujiki H *et al.* Epithelial mesenchymal transition in human gastric cancer cell lines induced by TNF- α inducing protein of Helicobacter pylori. *Int J Cancer.* 2013. doi:10.1002/ijc.28582.
14. Calvet X, Ramirez Lazaro MJ, Lehours P, Mégraud F. Diagnosis and epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter.* 2013; 18(Suppl. 1):5-11.
15. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon ATR, Bazzoli F *et al.* Management of Helicobacter pylori infection – the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut.* 2012; 61:646-64.
16. Holcombe C. Helicobacter pylori: the African enigma. *Gut.* 1992; 33:429-431.
17. Perrier-Bonnet S. Alliance Mondiale contre le cancer. *Cancers et Afrique: le point en.* 2011.
18. Organisation Mondiale de la Santé - profils des pays pour le cancer. 2014.
19. Assi C, Ndah KJ, Allah-Kouadio E *et al.* Prévalence de l'infection à Helicobacter pylori et lésions précancéreuses du cancer gastrique chez les patients souffrant d'épigastralgies chroniques. *Revue Africaine de Pathologie.* 2010; 9:25-31.
20. Konate A, Diarra M, Soucko-Diarra A *et al.* Gastrites chroniques à l'ère d'Helicobacter pylori au Mali. *Acta Endoscopica.* 2007; 37:315-320.
21. Ramanampamonjy RM, Randria MJD, Razafimahefa SH, Ratsimandisa R, Rajaonarivelo P. Séroprévalence de l'infection due à Helicobacter pylori dans un échantillon de population malgache. *Bull Soc Pathol Exot.* 2007; 100(1):57-60.
22. The EUROGAST Study Group. Epidemiology of, and risk factors for, Helicobacter pylori infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. *Gut.* 1993; 34(12):1672-6.
23. Programme des Nations Unies pour le Développement (PNUD). A propos de la Côte d'Ivoire. *Bulletin info PNUD Côte d'Ivoire.* 2012.
24. Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori Infection. *New England Journal of Medicine.* 2002; 347:1175-1186.
25. Malferthiner P, Chan FK, Mc Coll KE. Peptic Ulcer Disease. *Lancet.* 2009; 374:1449-1461.
26. Obst B, Wagner S, Sewing KF, Beil W. Helicobacter pylori causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis.* 2000; 21(6):1111-1115.

RESUME

L'infection à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) touche plus de 50% de la population mondiale et provoque de nombreuses pathologies gastroduodénales sévères telles que les ulcères gastroduodénaux, le lymphome du MALT et le cancer gastrique. La problématique de l'infection à *H. pylori* se situe au niveau de la résistance de la bactérie aux antibiotiques utilisés et de son évolution vers le cancer. Ce travail a porté sur la caractérisation moléculaire de la virulence et de la résistance aux antibiotiques de *H. pylori* dans les infections gastroduodénales chroniques. Les méthodes de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) et le séquençage génétique ont permis la réalisation de cette étude. L'étude de la diversité génétique de la virulence de *H. pylori* a permis de décrire un profil génotypique *slA*+/*mlA*+/*cagA*+/*oipA*+ et *tipA*+ impliqués dans la chronicité de l'infection et de suggérer que la présence de multiples génotypes serait nécessaire à la colonisation et la persistance de *H. pylori* dans la muqueuse gastrique. Les résultats de la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques utilisés pour le traitement de *H. pylori* en Côte d'Ivoire, ont montrés un niveau de résistance élevée de *H. pylori* (58,2%) vis-à-vis de l'Amoxicilline et la présence de mutations ponctuelles dans les gènes conférant la résistance aux antibiotiques utilisés pour le traitement. Cependant, aucune résistance croisée au couple clarithromycine et métronidazole associé n'a été identifiée dans cette étude. Cela pourrait orienter le protocole du traitement de *H. pylori* vers l'association en priorité de ces deux molécules (clarithromycine et métronidazole) dans le contexte hospitalier ivoirien. Les patients dont les souches de *H. pylori* possédaient des gènes de résistance aux antibiotiques présentaient en majorité des lésions caractérisées par une inflammation et des rougeurs au niveau de la muqueuse gastrique liés à la présence et à la persistance de *H. pylori*. Ces résultats sont en faveur de la nécessité d'une évolution du protocole thérapeutique en vigueur en Côte d'Ivoire. Les résultats obtenus au cours de cette étude sont essentiels. Ils servent de base pour une meilleure caractérisation de l'infection à *H. pylori* et une gestion efficace de l'émergence des maladies gastroduodénales liées à cette bactérie en Côte d'Ivoire.

Mots clés : *Helicobacter pylori*, gènes de virulence, gènes de résistance, biopsies gastriques, Côte d'Ivoire.

ABSTRACT

Helicobacter pylori infection (*H. pylori*) affects more than 50% of world's population and causes many severe gastroduodenal diseases such as peptic ulcers, MALT lymphoma and gastric cancer. Problem of *H. pylori* infection lies in resistance of bacterium to antibiotics used and its evolution towards cancer. This work focused on molecular characterization of *H. pylori* virulence and antibiotic resistance in chronic gastroduodenal infections. Polymerase Chain Reaction (PCR) methods and genetic sequencing allowed this study to be conducted. Study of genetic diversity of *H. pylori* virulence made it possible to describe a genotype profile *slA* + / *mlA* + / *cagA* + / *oipA* + and *tipA* + involved in chronicity of infection and to suggest that presence of multiple genotypes would be necessary to colonization and persistence of *H. pylori* in the gastric mucosa. The results of search for antibiotic resistance genes used for treatment of *H. pylori* in Côte d'Ivoire, showed a high level of Amoxicillin resistance (58.2%) and presence of point mutations in genes conferring resistance to antibiotics used for treatment. However, no cross-resistance to clarithromycin and metronidazole combination was identified in this study. This could guide treatment protocol of *H. pylori* to priority combination of these two molecules (clarithromycin and metronidazole) in the Ivorian hospital context. Patients with *H. pylori* strains with antibiotic resistance genes predominantly had lesions characterized by inflammation and redness in gastric mucosa associated with presence and persistence of *H. pylori*. These results support the need for an evolution for current therapeutic protocol in Côte d'Ivoire. Results obtained in this study are essential. They serve as basis for better characterization of *H. pylori* infection and for effective management of emergence of gastroduodenal diseases related to this bacterium in Côte d'Ivoire.

Key words: *Helicobacter pylori*, virulence genes, resistance genes, gastric biopsies, Côte d'Ivoire.