

!"# # \$ %

!"

#

r \$ % & & ' \$
r \$ % ' & () (*'

' #

Ar \$ \$ & & \$ ' (#) ((*

' + ,

Ar (, \$- & \$.' (",

' + # %

) # ,-. / 0.- /, 1

/(%!

-r , , \$ \$ & & ' (#) ((*

-r (, 01\$\$ ' (#) ((* ,

\$ 2 ((! 345363457



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: BENNANI GABSI Younes

Année Universitaire : 2012 - 2013

Titre: Caractérisation génotypique d'*Helicobacter pylori* chez l'enfant présentant différentes pathologies gastriques : étude préliminaire

Résumé

H.pylori est une bactérie connue par sa capacité de provoquer des maladies gastriques, qui peuvent évoluer vers un cancer gastrique. L'infection s'acquière principalement pendant l'enfance.

Une étude préliminaire, a été réalisée chez des enfants âgés de 15 ans et moins, admis au service de pédiatrie du CHU-Hassan II Fès pour des pathologies gastriques et dont la PCR a montré qu'ils sont infectés par *H.pylori*. Elle a pour objectif de déterminer le profil et la distribution génotypique de cette bactérie dans les régions de Fès ainsi que sa relation avec les différentes pathologies gastriques, le sexe et l'âge des enfants. Ainsi, des biopsies gastriques prélevées de la partie antrale de l'estomac des enfants ont été analysées par PCR pour déterminer les génotypes *vac A* et le statut de l'îlot *cag PAI* d'*H.pylori*. Un total de 47 enfants *H.pylori* positifs, ont été inclus dans l'étude.

Les résultats de cette étude ont montré une prédominance du génotype s2i2m2 (46,81%) et des allèles s2 (80,85%), i2 (70,21%) et m2 (68,09%) séparément. Cette distribution est comparable à celle retrouvée chez l'adulte Marocain et différente de celle obtenus dans les autres pays. Cependant, le taux du gène *cag A* a été de 14,9% et semble faible par rapport à celui détecté dans différentes études et aussi chez l'adulte Marocain. Une association significative a été obtenue entre le gène *cag A* et les allèles s1 ($p = 0,00005$) et m1 ($p = 0,01$) du gène *vac A* confirmant les résultats obtenus dans différents pays. La recherche de l'îlot de pathogénicité *cag PAI* s'est avérée meilleure en ciblant le gène *cag E*. Ce dernier peut être utilisé comme marqueur de la présence de cet îlot et donc du degré de virulence de la bactérie. Les corrélations faites entre les génotypes d'*H.pylori* et les différentes pathologies gastriques, le sexe et l'âge montrent que les génotypes *vac A* s2, i2 et m2 sont plus fréquents chez les enfants présentant une gastrite chronique et le génotype *vac A* s1, i1, m1 et le gène *cag A* sont plus prédominant chez les enfants de moins de 9 ans, tandis que le génotype *vac A* s1/2 et m1 et le gène *cag A* sont plus prédominant chez le sexe masculin. Faute de la taille de l'échantillonnage, ces associations s'avèrent non significatifs ($p < 0,05$). Une étude plus large serait utile pour mieux répondre à cet objectif.



Sommaire

Erreur ! Signet non défini.

Introduction

Avant les années 80, aucune implication bactérienne dans les pathologies gastriques n'a été envisagée. Avec la découverte d'*Helicobacter pylori* (*H.pylori*), la relation entre la colonisation de la muqueuse de l'estomac et les pathologies gastriques sévères capables d'évoluer en cancer est devenue claire (Marshall et *al.*, 1984).



H.pylori colonise plus de 50% de la population mondiale, elle est de ce fait considérée ubiquitaire (Torres et *al.*, 2000). L'infection par cette bactérie est la cause la plus fréquente de la gastrite chronique. Elle est aussi largement impliquée dans l'étiologie de l'ulcère duodéal, de l'ulcère gastrique, du cancer gastrique et du lymphome de MALT (Suerbaum et *al.*, 2002). Ces pathologies se rencontrent principalement chez l'adulte et résultent le plus souvent d'une infection généralement acquise pendant l'enfance.

En effet, l'évolution de l'infection est influencée par plusieurs facteurs tel la réponse immunitaire de l'enfant les facteurs environnementaux, l'alimentation, l'âge de l'infection et la variabilité génétique de l'*H.pylori* (Azuma *etal.*, 1998 ; Correa et *al.*, 1995 ; Varis et *al.*, 1998). Les souches d'*H.pylori* présentent une forte hétérogénéité génétique qui semble jouer un rôle dans la pathogénicité (Achtman et *al.*, 1999). Les gènes les plus caractérisés sont le gène *cag A* et le gène *vac A* qui est constitué de trois régions « *m*, *i* et *s* ». La prévalence et l'implication des différents profils génotypiques dans les pathologies gastriques diffèrent d'un pays à l'autre. Cependant, l'association entre génotype et réponse au traitement reste toujours discutée.

Au Maroc, ainsi qu'aux pays nord Africains, les données sur la prévalence de l'infection par *H.pylori* chez l'enfant reste défailtantes. De même, la prévalence, la distribution et l'association des différents génotypes avec les différentes pathologies n'ont jamais été étudiés.

Chapitre I : Revue bibliographique

La bactérie : *Helicobacter pylori*

Historique de la découverte de la bactérie

Helicobacter pylori a été découverte par le pathologiste Australien John Robin Warren. Ce dernier avait remarqué des bactéries spiralées dans les biopsies gastriques en 1979 (Marshall et *al.*, 1984) mais n'a pu cultivée la bactérie qu'en 1982 (Marshall et *al.*, 1984). Cette bactérie a été classée dans le genre *Campylobacter* et nommée *Campylobacter pyloridis*. Pour des raisons de grammaire latine, elle a été ensuite nommée *Campylobacter pylori*. Enfin, en 1989 et après révélation de certaines différences au niveau structurelle, génétique et morphologique avec les *Campylobacters*, elle a eu le



nom de « *Helicobacter pylori* » (Goodwin et al., 1989). En 1994, *H.pylori* a été classée comme agent carcinogène de type I par l'Organisation Mondiale de la Santé (Parkin et al., 2005). La découverte de *H.pylori*, a valu le prix Nobel de médecine en 2005 pour ces deux chercheurs australiens (JR.Warren et JB.Marshall).

Taxonomie et classification

L'analyse de l'ARNr 16S a permis de classer l'espèce *H. pylori* dans la subdivision des bactéries pourpres (protéobactéries) (Olsen et al., 1994). Actuellement, cette bactérie est classée dans le :

Règne : Eubactéries,

Embranchement : *Proteobacteria*,

Classe : *Epsilonproteobacteria*,

Ordre : *Campylobacterales*,

Famille : *Helicobacteraceae*

Genre : *Helicobacter* (Garrity et al., 2005).

*Microbiologie d'*H.pylori**

H. pylori est une bactérie Gram-négatif, flagellaire, qui mesure 0,5 à 0,9 µm de large et 2 à 4 µm de long (figure 1). *In vivo*, elle se présente sous forme d'un bacille spiralé avec 1 à 3 spires (Enroth et al., 1999). En culture, elle peut se présenter sous d'autres formes: sphérique, en C ou en U.

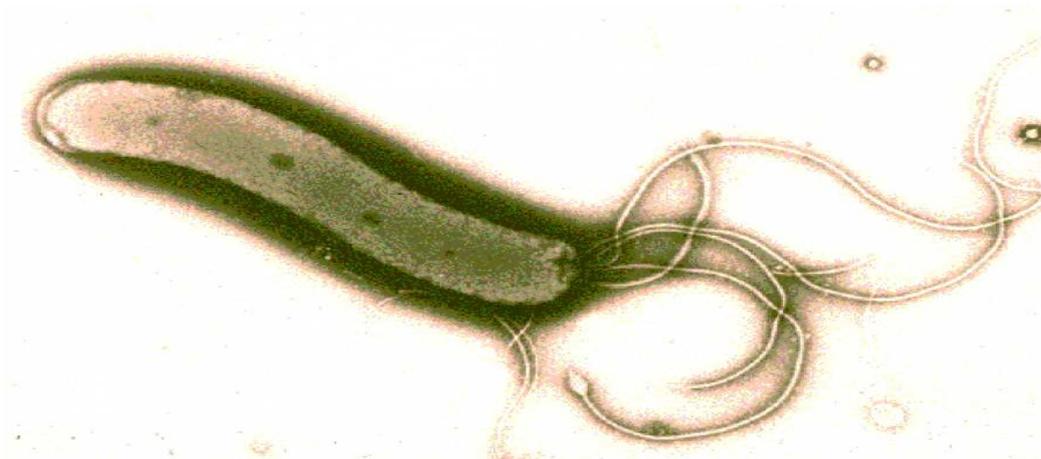




Figure 1: Morphologie d'*H.pylori* en microscope électronique (x 30 000). (Copeland et al., 2012)

Croissance et caractéristiques biochimiques

H. pylori est une bactérie microaérophile. Sa croissance est optimale dans une atmosphère à 5% d'oxygène et 6-10% de CO₂, sur milieu solide contenant du sang et enrichi avec divers facteurs de croissance (vitamine B₁₂, L-glutamine et la L-cystéine) (Goodwin et al., 1989). Les cultures sont obtenues de façon optimale à une température de 37 ° C après 3 à 5 jours d'incubation. Toutes les souches peuvent se développer à des températures variant entre 33 et 40 °C. *In vitro*, *H. pylori* ne tolère pas le faible pH, elle croît à un pH qui varie entre 5,5 et 8,5. Le pH optimal de croissance varie entre pH 6,9 et 8,0 (Goodwin et al., 1989 ; Megraud et al., 1985).

H. pylori produit l'oxydase (Hazell et al., 1991), le cytochrome catalase (Maier et al., 1996) et le supéroxyde dismutase (Pesci et al., 1994). La bactérie synthétise également une γ -glutamyltransférase, une leucine aminopeptidase et une phosphatase alcaline (Mégraud et al., 1985). La principale caractéristique d'*H.pylori* réside dans son activité uréasique qui lui permet de résister à l'acidité gastrique, en créant un environnement alcalin par hydrolyse de l'urée (Marshall et al., 1990 ; Megraud et al., 1985).

Habitat de la bactérie

Le réservoir naturel d'*H.pylori* est l'estomac de l'homme ou elle s'attache aux cellules épithéliales de la muqueuse gastrique (Marshall et al., 1984). Cette bactérie peut coloniser même la muqueuse gastrique de certains animaux comme les chats et les moutons (JG Fox., 1990 ; Handt 1994 ; Dore et al., 2001).

H.pylori peut être isolée à partir de la matière fécale de personnes infectées (Thomas., 1992). Des formes non cultivables ont été détectées par PCR sur la plaque dentaire de l'homme (Hardo et al., 1995), dans l'eau (Hulten et al., 1990) et dans des échantillons de différents aliments (Tytgat et al., 1995). Cependant, l'implication de ces trois sites comme réservoirs d'*H.pylori* n'est pas confirmé.

Mode de transmission

La transmission de l'*H.pylori* peut être interhumaine, hydrique, alimentaire ou zoonotique (Mégraud., 1995 ; Sharon et al., 2006 ; JG Fox., 1995 ; Handt et al., 1994 ; Dore et al., 2001 ; Hulten et al., 1996 ; Bellak et al., 2006 ; Queralt et al., 2005). La transmission interhumaine, de personne à



personne, se fait par voie fécale-orale ou orale-orale. Cette transmission est soutenue par la forte prévalence de l'infection au sein des membres de la même famille. L'isolement des souches d'*H. pylori* génétiquement identiques chez ces personnes confirme davantage cette hypothèse (Drumm et al., 1990; Malaty et al., 1991; Perez-Perez et al., 1990). La transmission féco-orale d'*H. pylori* est confirmée par la mise en évidence de l'*H. pylori* dans les fèces (Bellak et al., 2006). Les preuves en faveur de la transmission orale-orale sont indirectes et se basent sur la présence d'*H. pylori* dans la plaque dentaire (Mégraud., 1995; Hardo et al., 1995). La transmission gastro-orale par les vomissements a également été suggérée et repose sur la présence de la bactérie dans les sécrétions gastriques (Axon., 1995; Tygat., 1995).

Les sources d'eau et les expositions liées à l'approvisionnement en eau, sont des facteurs de risque de l'infection (Bellak et al., 2006). Les enfants qui se baignent dans les rivières, les ruisseaux, les étangs et qui boivent des cours d'eau ou qui consomment des légumes crus sont plus susceptibles d'être infectés (Goodman et al., 1996). *H. pylori* a également été détectée dans différents échantillons d'aliments (Karen et al., 1996). La transmission iatrogène a également été documentée après l'utilisation d'endoscopes et accessoires endoscopiques mal désinfectés (Tygat., 1995).

Traitement et résistance d'H.pylori

Le traitement d'une infection à *H. pylori* inclut un inhibiteur de la sécrétion acide et aux moins deux antibiotiques. L'inhibiteur de la sécrétion acide peut être un antagoniste des récepteurs H₂ de l'histamine (anti-H₂) ou un inhibiteur de la pompe à proton (IPP). Ce dernier reste le plus utilisé pour son efficacité (Gisbert et al., 2003).

Traitement de première ligne

Pour l'éradication d'*H. pylori*, le traitement de première ligne, actuellement recommandé, est une trithérapie de 7 à 14 jours, associant un IPP (double dose) et deux antibiotiques (clarithromycine + amoxicilline ou clarithromycine + métronidazole) (Malfertheiner et al., 2007). Ce traitement permet d'éradiquer *H. pylori* dans environ 70% des cas (Graham et al., 2007).

Traitement de deuxième ligne

Après un échec d'éradication d'*H. pylori*, les antibiotiques déjà employés dans les précédentes associations thérapeutiques ne sont pas réutilisés. Le traitement de deuxième ligne consiste en une



quadri-thérapie de 10 à 14 jours et incluant le Bismuth (IPP + Sels de Bismuth + tétracycline + métronidazole). Le taux d'éradication obtenu est de l'ordre de 85% (Fischbach et *al.*, 2004).

✚ Traitement de troisième ligne

Après le deuxième échec d'éradication, la thérapie est adaptée en fonction des antibiogrammes (Malfertheiner et *al.*, 2007).

✚ Le traitement séquentiel

Le traitement séquentiel est composé d'un IPP et de l'amoxicilline pendant 5 jours, suivi par un IPP plus deux autres antibiotiques (clarithromycine et le tinidazole) pendant 5 jours. Le taux d'éradication obtenu avec ce traitement est supérieur à 90% (Zullo et *al.*, 2007). Ce traitement a été même suggéré récemment comme traitement de première ligne (Gatta et *al.* 2009).

✚ La résistance bactérienne

La résistance bactérienne aux antibiotiques est la principale cause d'échec de traitement. Elle peut être primaire (présente avant le traitement) ou secondaire (développée au cours de la thérapie). La résistance à la tétracycline ou à l'amoxicilline est rare (Gerrits et *al.*, 2002 ; Kwon et *al.*, 2000). Cependant la résistance aux nitroimidazoles (métronidazole ou tinidazole) et aux macrolides (clarithromycine) (Graham et *al.*, 1998 ; Huang et *al.*, 1999) est de plus en plus importante. Cette résistance est à l'origine d'un échec d'éradication et dont le taux varie entre 55% à 70% en cas de résistance à la clarithromycine et entre 25 à 37% en cas de résistance à la métronidazole (Dore et *al.*, 2000 ; Fischbach et *al.*, 2004 ; Megraud F., 2004 ; Van der Wouden et *al.*, 1999).

H.pylori chez l'enfant

L'infection à *H.pylori* s'acquiert principalement pendant l'enfance. De nombreuses études ont montré que l'âge d'acquisition de l'infection, la prévalence et les symptômes cliniques diffèrent selon les pays. Une grande différence est notée entre les pays développés (PD) et les pays en voie de développement (PED). Ainsi, la prévalence de l'infection à *H.pylori* varie de 1,8% chez les enfants de moins de 1 an à 30% à l'âge de 15 ans. Dans de nombreux PED, la prévalence dépasse souvent 50 % chez les enfants de moins de 5 ans pour atteindre 90% à l'âge adulte (Bardhan., 1997). Chez l'enfant de moins de 10 ans, la pathologie ulcéreuse est rare et les ulcères gastrique et



duodéal sont reliés à l'infection par *H.pylori* dans environ 25% et 90% des cas respectivement (Gormally et al., 1996). L'infection acquise, tôt dans l'enfance, semble être associée à un plus grand risque de développer un cancer gastrique à l'âge adulte (Blaser et al., 1995).

La réinfection

L'éradication d'*H.pylori* n'exclue pas la possibilité d'une réinfection. La majorité des réinfections ont lieu dans l'année qui suit l'éradication avec un taux qui peut atteindre 13%. Le taux de réinfection chez l'adulte varie entre 2,4 et 20% suivant différentes études (Borody et al., 1992 ; Forbes et al., 1994). Ce taux est plus élevé chez les enfants (Wewer et al., 2003) et varie entre 2% à 12.8 % par année suivant les pays ou les régions (Magista et al., 2005 ; Mitchell et al., 1998 ; Halitim et al., 2006 ; Najafi et al., 2010). Ainsi, il a été démontré que le risque annuel de réinfection est plus important dans les zones de forte prévalence d'*H.pylori* comparé aux zones de faible prévalence (Magistà et al., 2005).

Facteurs de colonisation

Mobilité

La mobilité d'*H.pylori* est un élément essentiel pour la colonisation. Elle aide la bactérie à fuir de l'acidité gastrique et d'atteindre l'épithélium, où le pH est proche de la normale. Elle lui permet aussi de se propager à travers le mucus visqueux qui couvre les cellules épithéliales de la muqueuse gastrique (Schreiber et al., 2004). A cet endroit la bactérie bénéficie du même mécanisme cytoprotecteur que l'épithélium gastrique (Schreiber et al., 2004).

La mobilité de l'*H.pylori* est assurée par cinq à sept flagelles unipolaires. Ces flagelles sont entourés par une gaine, qui les protège de l'acidité gastrique (Geis et al., 1993). Les filaments flagellaires de cette bactérie sont constitués par des polymères de deux sous-unités de flagelline : une majeure FlaA et une mineur, FlaB (Leying et al., 1992 ; Suerbaum et al., 1993).

Résistance à l'acidité

Le pH de la muqueuse gastrique peut varier entre 4 et 6,5. Cette acidité empêche la colonisation de l'estomac sauf que, *H.pylori* possède un système de défense qui lui permet de résister à une telle acidité (Schade et al., 1994 ; Burne et al., 2000). Cette résistance est due à l'enzyme uréase qui transforme l'urée en ammoniac et en carbamate. Le carbamate, se décompose spontanément en une



autre molécule d'ammoniac et de dioxyde de carbone (Burne et *al.*, 2000). Cette action uréasique permet de neutraliser localement l'acidité gastrique en créant ainsi un microenvironnement favorable au développement de la bactérie (Sting et *al.*, 2002).

L'uréase d'*H.pylori* est composée de deux sous unités UreA et UreB codées respectivement par les gènes *ureA* et *ureB* (Mobley et *al.*, 1995). Les souches d'*H.pylori* mutantes, incapables de produire l'uréase, semblent incapables de coloniser la muqueuse gastrique (Tsuda et *al.*, 1994).

Adhésion

L'adhésion d'*H.pylori* à la muqueuse gastrique joue un rôle important dans la colonisation. Elle est assurée par des interactions spécifiques entre l'adhésine bactérienne et les cellules hôtes (Hessey et *al.*, 1990). L'adhérence à l'épithélium gastrique peut protéger la bactérie contre les mouvements gastriques (Amieva et *al.*, 2008) et lui permet aussi d'être en contact avec les éléments nutritifs des cellules hôtes endommagées (Marina et *al.*, 2006). Les adhésines les plus décrites sont BabA, OipA, SabA et DupA et font partie des protéines de la membrane externe (OMP) (Ilver et *al.*, 1998). Ces derniers sont codés par plus de 30 gènes.

✚ Bab A (Blood group antigen binding adhesin)

La protéine Bab A est la protéine d'adhérence la mieux caractérisée d' *H.pylori*. Elle est codée par le gène *bab A* et présente un poids moléculaire de 78 kDa (Borén et *al.*, 1993). Le gène *bab A* peut exister sous deux formes alléliques: *bab A1* et *bab A2*. BabA2 diffère de Bab A1 par une insertion de 10 pb dans la partie 3' (Backstrom et *al.*, 2004). Cette différence permet aux souches *bab A2* d'exprimer une adhésine fonctionnelle qui se lie avec les antigènes Lewis^b (Leb) (Figure 3), présents sur les cellules épithéliales gastriques (Ilver et *al.*, 1998).

Les souches *babA2* sont significativement associées aux pathologies les plus graves comme l'ulcère et l'adénocarcinome (Gerhard et *al.*, 1999).

✚ Sab A (Sialic acid binding adhesion)

L'adhésine Sab A a la propriété de se lier aux antigènes sanguins Lewis^x (Lex) (Figure 3) portants un acide sialique. Ce sont des lipides particuliers (sialyl-diméric-Lewis^x glycosphingolipid) qui se trouvent à la surface des cellules épithéliales (Mahdavi et *al.*, 2002). La densité bactérienne est plus importante chez les patients qui produisent des niveaux élevés de sialyl-Lex et qui sont infectés par



des souches Sab A positive (Sheu et *al.*, 2006). Cette adhésine peut causer des gastrites chroniques en activant les monocytes et les neutrophiles (Unemo et *al.*, 2005). Elle est aussi associée au risque de développement du cancer gastrique (Yamaoka et *al.*, 2006).

✚ Oip A (Outer inflammatory protein)

La protéine Oip A est une adhésine de 34 kDa qui a été initialement identifiée comme une protéine induisant une réponse pro-inflammatoire (Yamaoka et *al.*, 2000). Toutes les souches d'*H.pylori*, possèdent le gène *oip A* qui code pour cette protéine (Yamaoka et *al.*, 2000). L'expression de ce gène est fortement associée à une augmentation de l'expression des interleukine-8 (IL-8) (Yamaoka et *al.*, 2002).

✚ Dup A (Duodenal ulcer promoting gene)

Le gène *dup A* est situé dans la zone de plasticité du génome d'*H.pylori* et semble être un marqueur de virulence. *In vitro*, Dup A augmente la production d'IL-8 (Lu et *al.*, 2005). La présence de *dup A* est associée au risque de développement d'un ulcère duodéal et/ou cancer gastrique (Schmidt et *al.*, 2009).

Lypopolysacharide

L'enveloppe cellulaire d'*H.pylori* contient un lipopolysacharide (LPS) constitué d'un poly- ou oligosacharide lié de façon covalente à un lipide A. L'ensemble forme l'antigène O (figure 2) (Moran et *al.* 1995 ; Moran et *al.*, 1992 ; Rietschel et *al.*, 1994). Les motifs répétitifs des chaînes latérales de l'antigène O de certaines souches d'*H.pylori*, ressemblent à la structure des antigènes des groupes sanguins de type Lewis^x et Lewis^y (Aspinall et *al.*, 1996). Ce mimétisme permet à la bactérie à se camoufler et d'échapper à la réponse immunitaire, ce qui l'aide à la colonisation. Les propriétés endotoxiques et immunologiques du LPS d'*H.pylori* sont plus faible que celles des entérobactéries (Sakamoto et *al.*, 1989). Le LPS de l'*H.pylori* induit une réponse immunitaire faible (insuffisante pour éliminer la bactérie) permettant de prolonger l'infection (Moran., 1995 ; Moran., 1996).

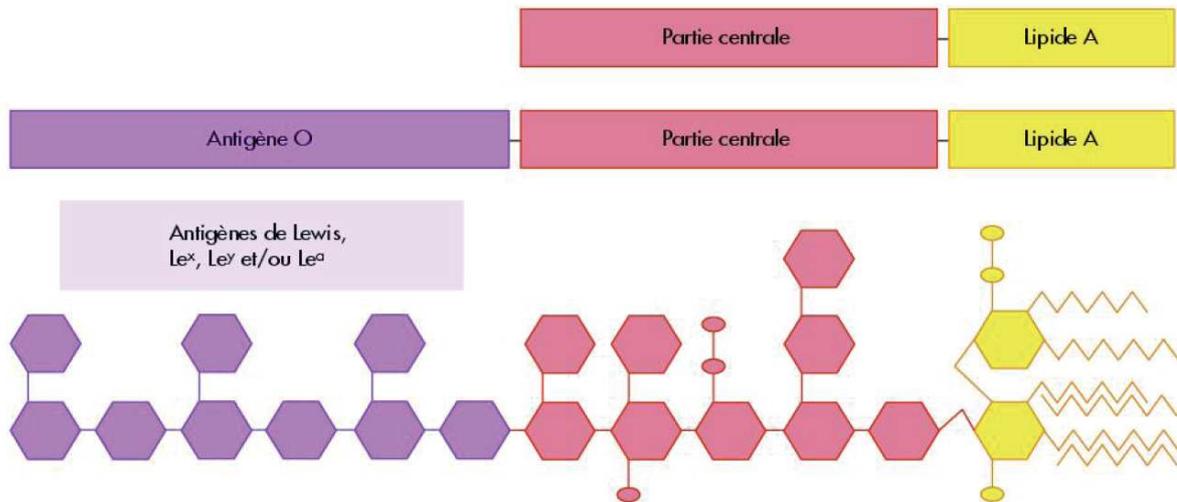


Figure 2: Structure du lipopolysaccharide d'*H. pylori* (Chaput et al., 2006)

Facteur de virulence d' *H.pylori*

H.pylori possède plusieurs facteurs de virulences dont les adhésines *oipA*, *dupA* (déjà cités) et aussi *ice A*, *vac A* et *cag*. Le gène *ice A* existe sous deux formes alléliques, *ice A 1* et *ice A 2*. La fonction de *ice A 1* n'est pas encore clair, mais ce gène présente une homologie significative avec une endonucléase de restriction de type II. L'expression d'*ice A 1* est éventuellement associée à l'ulcère gastroduodéal (Peek et al., 1998 ; van Doorn et al., 1998).

Le gène *vac A* code pour une cytotoxine qui induit une vacuolisation des cellules épithéliales *in vitro* (Leunk et al., 1988) ; Alors que le *cag A* est un gène qui code pour un antigène immunodominant de poids moléculaire élevé variant de 120 à 140 kDa. L'expression de ces deux gènes est associée à la sévérité des pathologies gastriques notamment l'ulcère et le carcinome gastrique (Covacci et al., 1993 ; Xiang et al., 1995).

La cytotoxine vacuolisante Vac A

Le gène *vac A*

Le gène *vac A* d'*H.pylori* code pour une cytotoxine vacuolisante (Vac A) sécrétée à l'extérieure de la bactérie (Telford et al., 1994) et agissant sur les cellules épithéliales. Ce gène est présent dans toutes les souches, mais seulement certaines d'entre elles possèdent une activité vacuolisante. Il est composé de trois parties variables dénommées « s », « m » et « i ». (Atherton et al, 1995 ; Rhead et al, 2007). La région « s », existe sous forme d'un allèle de type s1 ou s2 (Atherton et al,



1997). Parmi les souches de type s1, il y a les sous-types s1a, s1b et s1c (van Doorn et *al.*, 1998). De même, la région « m » existe sous forme d'un allèle de type m1 ou m2 (Atherton et *al.*, 1997). Parmi les souches m2, deux sous-types ont été identifiés et sont désignés m2a et m2b (van Doorn et *al.*, 1998). La région « i » existe aussi sous forme de deux différents allèles, l'allèle i1 et l'allèle i2 (Rhead et *al.*, 2007).

La production de la cytotoxine vacuolisante Vac A est liée à la structure en mosaïque du gène *vac A*, et donc de la combinaison entre les différentes régions du gène. *In vitro*, l'activité cytotoxique diffère d'une souche à l'autre. Les souches de type s1/i1/m1-ou-m2 induisent en général un haut niveau de vacuolisation, tandis que les souches s1/i2/m2 induisent peu de vacuolisation, et les souches s2/i2/m2 sont dépourvues d'effet cytotoxique (Rhead et *al.*, 2007).

La protéine Vac A

Le gène *vac A* code pour une protéine précurseur de 140 kDa nommé Vac A, qui donne après maturation une toxine d'environ 88 kDa. La maturation de la protéine précurseurs se fait par 3 clivages: le premier clivage lors de sa traversée de la membrane interne via le système de sécrétion de type IV, une séquence signal de 33 acides aminés en N-terminal est clivée ; le deuxième clivage se produit lors de sa traversée de la membrane externe où la partie C-terminale de 33 kDa de la protéine reste attachée à la membrane externe permettant l'export et la sécrétion de la protéine mature par un mécanisme de type auto-transport ; le troisième clivage se fait au niveau d'une boucle sensible à la protéolyse entre le fragment N-terminal de 33 kDa (p33) et le fragment C terminal de 55 kDa (p55). Ces deux fragments restent physiquement associés et forment un monomère (Schmitt et *al.*, 1994 ; Cover et *al.*, 1992).

Les monomères de Vac A peuvent s'organiser en une structure de plus de 900 kDa dite "en fleur", de 6 à 7 pétales et constitués chacun par l'association des deux polypeptides de 33 et 55 kDa (monomère de 88 kDa) (figure 3) (Lupetti et *al.*, 1996 ; Reyrat et *al.*, 1999).

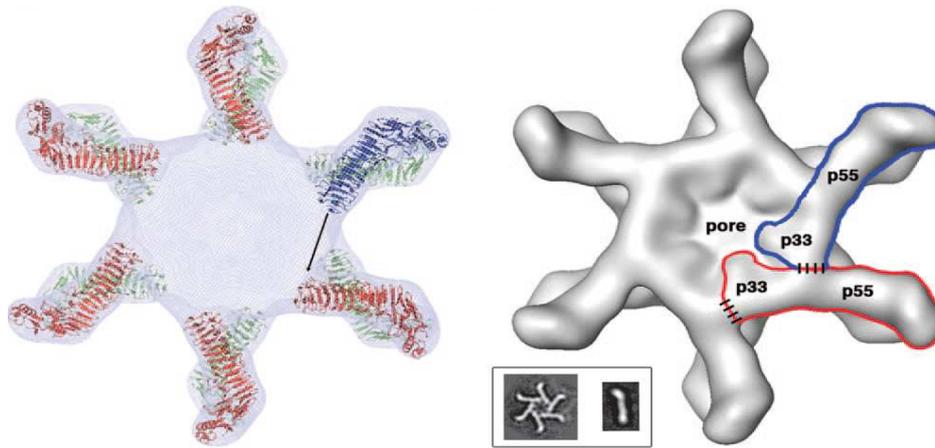


Figure 3: Structure tridimensionnelle de la protéine Vac A (Gangwer et *al.*, 2007)

Effet physiopathologique de la protéine

La protéine Vac A possède des propriétés physiopathologiques qui ont un effet néfaste sur la muqueuse gastrique. C'est une cytotoxine qui induit une vacuolisation des cellules épithéliales (Leunk et *al.*, 1988) et l'apoptose. Elle possède aussi une action immunosuppressive et inflammatoire (Figure 6).

1.3.1 Vacuolisation des cellules

La micro injection de Vac A ou la transfection de plasmides contenant le gène *vac A* dans des cellules HeLA entraîne la formation de vacuoles intracellulaires, montrant que la protéine agit sur une cible intracellulaire (Bernard et *al.*, 1997).

Des études avec des bicouches lipidiques planes ont montré que Vac A forme des canaux sélectifs d'anions, grâce aux monomères qui s'activent à un pH acide. La première étape de l'entrée de la toxine Vac A dans les cellules cibles consiste à se lier à leur membrane plasmique, puis elle s'insère dans la bicouche lipidique pour former un port hexamérique impliqué dans le transport d'anions. La formation de ces ports permet l'entrée de NH_4Cl dans la cellule. L'accumulation de ce dernier dans le cytosol cellulaire, crée une pression osmotique dans le cytosol plus élevée que celle présente à l'extérieure de la cellule. Les vacuoles seraient alors une conséquence du rétablissement de la pression osmotique (Cover et *al.*, 2005).



1.3.2 Induction de l'apoptose

Le phénomène de l'apoptose engendré par la protéine Vac A, a été démontré aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Galmishe et *al.*, 2000). Lorsque des cellules en culture sont traitées avec la protéine Vac A purifiée, une réduction du potentiel transmembranaire mitochondrial et l'activation des protéines pro-apoptotiques Bak et Bax. Cette activation permet la libération de cytochrome c (Isomoto et *al.*, 2010 ; Kimura et *al.*, 1999 ; Willhite et *al.*, 2003 ; Willhite et *al.*, 2004). Ces deux effets sont caractéristiques d'un affaiblissement de la perméabilité membranaire mitochondriale et suggèrent l'initiation d'une mort cellulaire (Galmishe et *al.*, 2000 ; Willhite et *al.*, 2004).

1.3.3 Action inflammatoire

La protéine Vac A peut activer des voies de signalisation cellulaire pro-inflammatoires après liaison à un récepteur cellulaire tel le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Cover et *al.*, 2005 ; Nakayama et *al.*, 2006 ; Seto et *al.*, 1998). Cette liaison stimule la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, IL1 β , TNF-alpha, IL6, IL10, IL13 (Supajatura et *al.*, 2002).

1.3.4 Action immunosuppressive

La protéine Vac A peut pénétrer dans le cytoplasme des lymphocytes après reconnaissance du récepteur CD18 et interférer avec la sécrétion de l'interleukine 2 (Sewald et *al.*, 2008).

Cette action immunosuppressive provoque : i) une altération de la maturation du phagosome (Zheng et *al.*, 2003), ii) une altération de la capacité à présenter les antigènes par les lymphocytes B (Molinari et *al.*, 1998), iii) une inhibition de la prolifération et de la maturation des lymphocytes T et B (Gebert et *al.*, 2003 ; Sundrud et *al.*, 2004 ; Torres et *al.*, 2007).

Ilot de pathogénicité cagPAI

Organisation génétique de l'ilot cag PAI

L'analyse des régions bordant le gène *cag A* a conduit à la découverte d'une grande région chromosomique ayant les caractéristiques d'un îlot de pathogénicité, nommé *cagPAI* (Akopyants et *al.*, 1998 ; Censini et *al.*, 1996). Cet îlot est caractérisé par : i) un pourcentage de bases CG plus faible que celui du reste du génome, ii) la présence de deux séquences répétées et directes (aux extrémités de l'ilot), iii) la présence de séquences similaires à celles retrouvées chez des phages, iv) la présence de transposons.



L'îlot de pathogénicité *cagPAI* est une région d'environ 40 kb située à l'extrémité 3' du gène codant pour le glutamate racémase. Cet îlot code pour un système de sécrétion de type IV (SSTIV) ainsi que des protéines de la famille Cag (Bourzac et al., 2005). Le séquençage de l'îlot *cagPAI* a montré la présence de deux régions interrompues par une séquence intermédiaire. Ces deux régions ont été nommées région I et région II. La région *cag I* contient neuf cadres de lectures ouverts (ORF) (de B à L) et la région II contient deux ORF : S et T (Censini et al., 1996) (figure 4).

L'îlot de pathogénicité *cagPAI*, se trouve flanqué entre deux ORF (*tnpA* et *tnpB*) codant pour des transposases. Ces deux transposases sont flanqués par deux séquences d'insertions (IS 605) qui contiennent des séquences répétées directes (CTTTAG). La présence des répétitions directes suggère que la région *cagPAI* a été acquise par *H. pylori* à travers un événement de recombinaison (Censini et al., 1996). En effet, l'analyse de l'îlot *cagPAI* montre une grande similitude entre le gène *cag E* et le gène *virB4* responsable de l'exportation de l'ADNt chez *Agrobacterium tumefaciens* (Ward et al., 1998), et le gène *PTLC* responsable de l'expression de la toxine de coqueluche chez *Bordetella pertussis* (Winans et al., 1996). Ces gènes proviennent d'un système de conjugaison présent dans des plasmides autotransmissibles (Lessl et al., 1994).

La faible teneur du *cagPAI* en GC (35%) par rapport au reste du génome (38-45%) laisse supposer que le *cag* dérive d'un plasmide ou d'un phage, éventuellement par transmission horizontale (Groisman et al., 1993 ; Li et al., 1995).

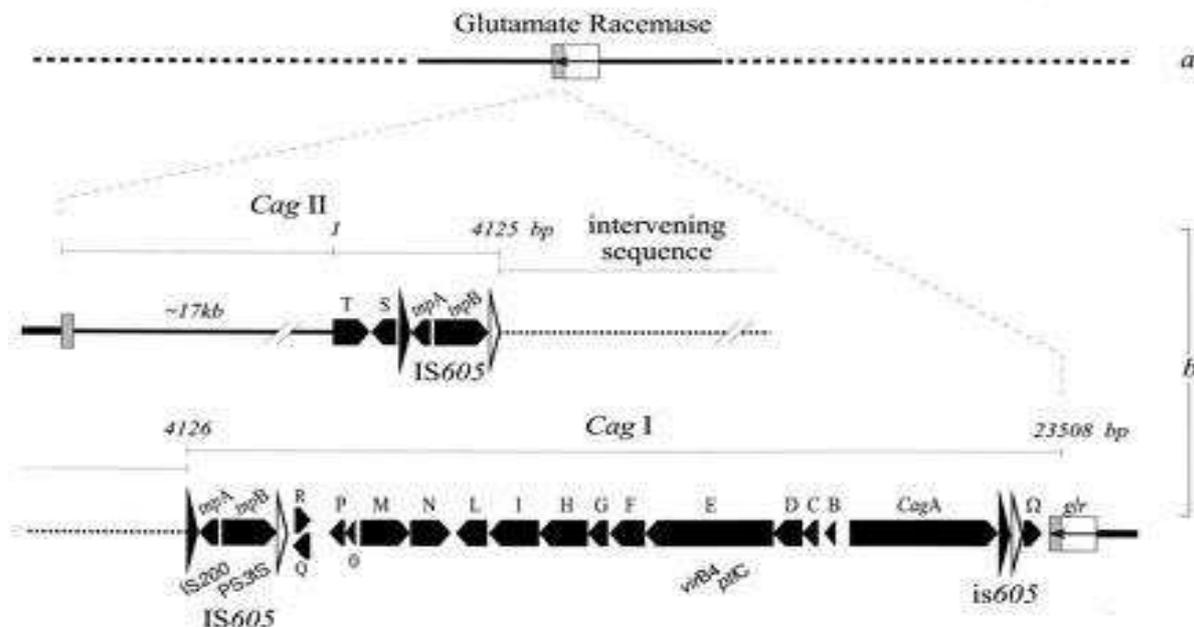


Figure 4: Représentation schématique de la région *cag* (S.Censini et al., 1996). Les gènes de types *cag* et leur sens de lecture sont représentés par des flèches

Le système de sécrétion de type IV (SSTIV)

L'îlot *cagPAI* d'*H.pylori* code pour un SSTIV qui médiate la translocation de Cag A dans les cellules hôtes (Bourzac et al., 2005). Plusieurs gènes de type *cag* essentiels pour la translocation de la protéine Cag A présentent des homologies avec les gènes qui codent pour des composants du système de sécrétion de type IV (T4SSs) d'autres espèces bactériennes Gram-négatives (Akopyants et al., 1998 ; Churin et al., 2003 ; Fischer et al., 2001). Lors de la fixation de *H. pylori* aux cellules épithéliales gastriques, le SSTIV est formé entre les bactéries et les cellules de l'hôte sous forme de pilis (Rohde et al., 2003 ; Tanaka et al., 2003). 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 5).

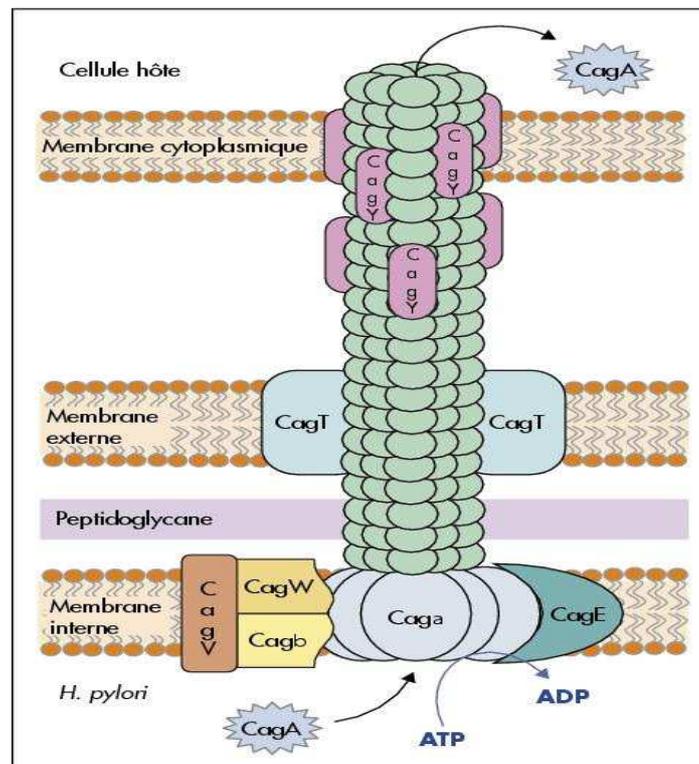




Figure 5: Schéma de l'appareil de sécrétion de type IV d'*H. pylori* avec les différentes protéines le constituant (Chaput et *al.*, 2006)

La protéine Cag A

Le Cag A est un antigène immunodominant de poids moléculaire élevé variant de 120 à 140 kDa. Comme cet antigène est exprimé par la plupart des souches produisant la cytotoxine vacuolisante, le gène codant pour cette protéine est appelé *cag A*, pour « gène associé à la cytotoxine » (cytotoxin associated gene) (Tummuru et *al.*, 1993 ; Covacci et *al.*, 1993).

La variation de la taille de Cag A est due à la présence d'un nombre variable de séquences répétées situées dans sa région C-terminale. Ces séquences répétées ont d'abord été classés en deux types : types de l'Est Asiatique et types d'Ouest. Chacune de ces séquences répétées de la protéine Cag A contient le motif « Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala » ou aussi nommé « EPIYA » (Tammer et *al.*, 2007) (figure 6). Le motif EPIYA est très conservé et seulement une petite fraction des souches présente un motif modifié tel que EPIYT, ESIYA ou ESIYT (Xia et *al.*, 2009). Ces motifs ont été par la suite classés en quatre catégories : A, B, C et D (Stein et *al.*, 2002 ; Tammer et *al.*, 2007). La tyrosine de ces motifs peut être phosphorylée. Cette phosphorylation touche le plus souvent les motifs C et D. A chaque séquence Cag A est additionné le type des motifs EPIYA qui le compose (comme ABC ou ABD). Les segments EPIYA-A et EPIYA-B sont toujours présents quel que soit l'origine géographique des souches. Cependant, le motif EPIYA-C est caractéristique des souches d'Afrique, d'Amérique et d'Europe « Western Cag A » tandis que le motif EPIYA-D est présent quasiment et uniquement chez les souches isolées de patients vivant dans l'est de l'Asie (« East Asian Cag A ») (Tammer et *al.*, 2007). Le nombre du motif EPIYA-C peut varier de 1 à 3 motifs, tandis que le segment EPIYA-D est en général unique.

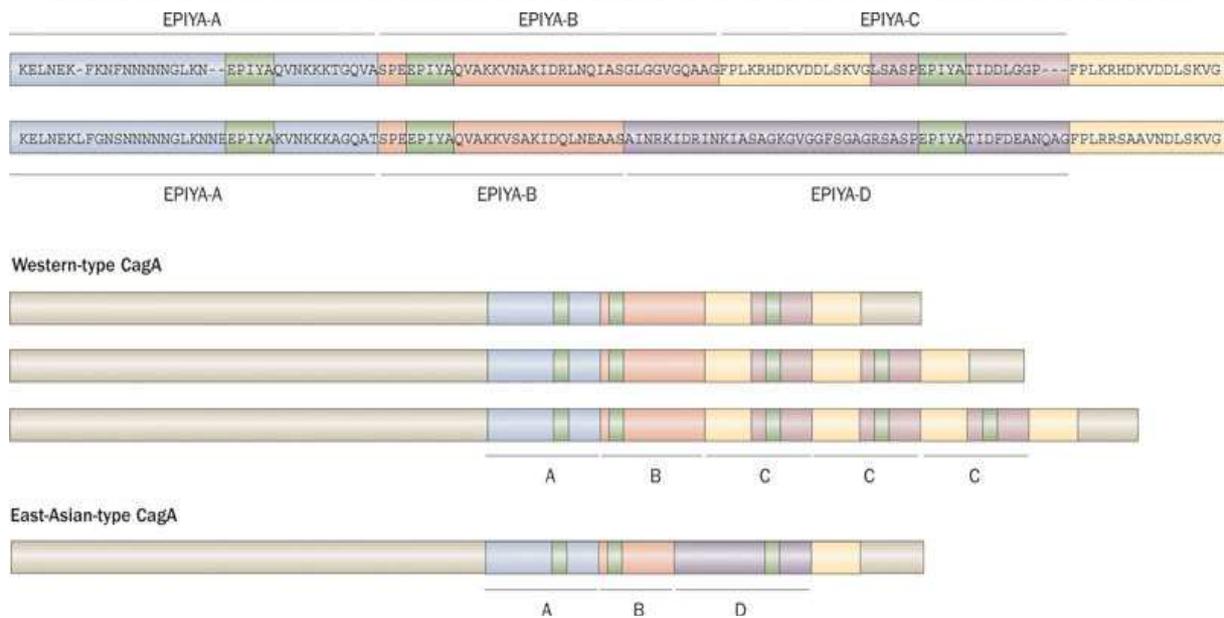


Figure 6: Polymorphisme structural de la protéine Cag A (Yamaoka, 2010) Le type « Western Cag A » contient les segments EPIYA-A, EPIYA-B et EPIYAC. Le type « East Asian Cag A » contient les segments EPIYA-A, EPIYA-B et EPIYAD (Yamaoka et al., 2010)

2.3.1 Effets de Cag A sous forme phosphorylée

Dans les cellules épithéliales, la tyrosine des motifs EPIYA est phosphorylée par les kinases de la famille Abl et Src (sarcome) (Asahi et al., 2000 ; Stein et al., 2002). La protéine Cag A phosphorylée interagit avec plusieurs effecteurs à l'intérieur de la cellule hôte. Son association avec la tyrosine phosphatase SHP-2 induit l'activation des ERK (Extracellular signalling Regulating Kinase) 1 et 2 qui sont responsables de la méiose et la mitose (Higashi et al., 2002). Les cellules ainsi infectées développent une morphologie appelée « becs de colibri » correspondant à une elongation cellulaire (Segal et al., 1999). La protéine Cag A présentant les motifs EPIYA de type C ou D a plus d'affinité pour la tyrosine phosphatase SHP-2 (Hatakeyama et al., 2005). Ce type de motifs se trouve en particulier en Asie du Sud Est, ce qui explique la forte incidence de cancer au Japon et dans une partie de la Chine (Higashi et al., 2002). *In vitro*, les souches présentant un « East Asian Cag A » induisent une sécrétion plus importante d'IL8 que les souches avec un « Western Cag A ». Plus le nombre de motifs EPIYA-C chez ces dernières était important, plus la sécrétion d'IL8 était importante (Argent et al., 2004).



2.3.2 Effets de Cag A sous forme non phosphorylée

La protéine Cag A non phosphorylée peut aussi avoir des effets pathogènes à l'intérieur de la cellule. Sa translocation dans la cellule peut entraîner une activation de la β -caténine, des altérations au niveau des jonctions cellulaires apicales et une perte de polarité cellulaire. (Amieva et al., 2003 ; Saadat et al., 2007 ; Murata-Kamiya et al., 2007). La conséquence de l'ensemble de ces processus est une déstabilisation de l'épithélium gastrique qui potentiellement contribue au processus carcinogène de *H. pylori*.

Distribution géographique des génotypes d'Helicobacter pylori

La distribution géographique des génotypes d'*H.pylori* diffère d'un pays à un autre et d'un continent à un autre. La répartition géographique des allèles s1 et s2 du vac A ainsi que le gène *cag A* est rapportée dans le tableau 1 (van der Wouden et al., 1999 ; Al Qabandi et al., 2005).

Tableau1: Répartition géographique des allèles s1 et s2 du gène vac A et du gène *cag A*

Localisation géographique	Nombre de patient	s1 (%)	s2 (%)	Multiple (%)	Négatif / non typé (%)
L'Europe	422	284 (67)	61 (14,5)	75 (18)	2 (0.5)
Amérique du nord	73	67 (62)	16 (22)	12 (16)	0
Amérique	105	75	5 (5)	25 (24)	0



centrale et du Sud		(71)				
L'est de l'Asie	74	70 (95)	1 (1)	3 (4)	0	
Australie	28	16 (57)	8 (29)	4 (14)	0	
Afrique du Nord (Egypte)	33	12 (36)	16 (49)	5 (15)	0	
Moyen-Orient	67	26 (39)	30 (45)	8 (12)	3 (4)	
Asie du Sud-Est	22	16 (73)	4 (18)	0	2 (9)	
Afrique (Egypte, Somalie)	9	2 (22)	5 (56)	2 (22)	0	
Middle-East	67	26 (33)	30 (45)	8 (12)	3 (4)	

Aspects cliniques des pathologies associées à *H. pylori*

L'infection à *H.pylori* peut causer des maladies gastriques qui peuvent évoluer vers un cancer. Au début de l'infection, une gastrite aiguë s'installe et peut évoluer en une gastrite chronique. Cette dernière peut évoluer à son tour vers un ulcère gastroduodéal, un lymphome de MALT ou un cancer gastrique.

Gastrites aiguë et chronique

La phase aiguë de la colonisation par *H. pylori* peut être associée à des symptômes, comme les nausées, les vomissements et une inflammation de la muqueuse gastrique. Dans cette phase la bactérie induit une infiltration massive de polynucléaires neutrophiles au niveau de cette muqueuse. La phagocytose des bactéries provoque la libération de substances toxiques induisant des lésions.



Cette phase est souvent associée à une hypochlorhydrie, qui peut durer des mois (Kusters et *al.*, 2006 ; Graham et *al.*, 2004). Cet état inflammatoire ainsi que la persistance de la bactérie marquent le passage d'une gastrite aigue vers une gastrite chronique.

Ulcère gastroduodéal

Les ulcères gastriques ou duodénaux sont définis comme des lésions muqueuses avec un diamètre d'au moins 0,5 cm, pénétrant à travers la muqueuse musculaire (Sander et *al.*, 1999). Les ulcères duodénaux en particulier se produisent entre l'âge de 20 et 50 ans, tandis que les ulcères gastriques surviennent principalement chez les sujets de plus de 40 ans.

Les deux maladies ulcéreuses gastriques et duodénales sont fortement liées à *H.pylori*. Environ 95% des ulcères duodénaux et 85% des ulcères gastriques sont eu lieu à l'infection à *H.pylori* (Kuipers et *al.*, 1995).

Cancer gastrique

Dans la carcinogenèse gastrique, *H.pylori* peut agir soit directement soit indirectement en induisant une réponse inflammatoire. En effet, la présence d'*H.pylori* dans la muqueuse gastrique est associée à la synthèse de différentes substances (l'ammoniac, les phospholipases, et des cytotoxines) qui provoquent des lésions au niveau des cellules épithéliales et pouvant conduire à une prolifération de ces derniers (Bechi et *al.*, 1996).

Le cancer de l'estomac est classé en deux types histologiques le premier de type intestinal et le second de type diffus (Lauren., 1965). En outre, l'infection de la muqueuse gastrique par *H.pylori* et sa persistance provoque des mutations au niveau des cellules épithéliales qui pourront induire le cancer gastrique. Ces mutations peuvent touchées les voies du cycle cellulaire en altérant la protéine p16, les voies d'induction de l'apoptose par l'altération de BCL2 et de SC-1 ainsi que l'altération les protéines supresseurs de tumeurs p53 et APC (adenomatous polyposis coli) (Moss SF., 1998 ; Nardone et *al.*, 2003 ; Tahara et *al.*, 1995).

Lymphome du MALT

Une association entre une infection chronique à *H. pylori* et le lymphome gastrique du MALT a été reconnue dans les années 1990. Ce lymphome est un lymphome à cellules B et résulte probablement de la stimulation antigénique chronique à cellules T (Fischbach et *al.*, 2004). La prolifération crée



des conditions favorables à une instabilité génétique des cellules B conduisant à l'apparition de mutations.

Récemment, une translocation de type t(11 ; 18) (q21 ; q21) s'est révélée associer au lymphome de MALT de bas grade (Dierlamm et *al.*, 1999) (Dierlamm J 1999). Cette translocation fait intervenir deux gènes, *mlt1* (MALT lymphomaassociated translocation-1) qui est une para-caspase humaine et un inhibiteur d'apoptose *ap12*, dont l'une des fonctions serait d'inhiber les caspases. Cette translocation produirait une fusion *API2-MLT1* qui aurait la capacité d'activer NF-kB (nuclear factor-kappa B) d'où la protection des cellules de l'apoptose (Uren et *al.*, 2000).



Objectifs Du travail

H.pylori colonise plus de 50% de la population mondiale. L'infection s'acquiert principalement pendant l'enfance et la réponse immunitaire de l'enfant, les facteurs environnementaux et des facteurs liés à la souche déterminent son évolution au cours du temps. L'implication de *H.pylori* dans les pathologies gastriques a été très bien illustrée et la majorité des études indiquent une association entre génotype et pathologie. En effet, les souches *cag A* positives et *vac A s1* sont connues pour un pouvoir pathogène plus élevée que les souches *cag A-* et *vac A s2* respectivement et sont impliquée de ce faite dans les pathologies gastrique les plus graves. La détermination de la présence de l'îlot de pathogénicité *cagPAI* est très importante pour déterminer le génotype de la souche. Ainsi d'autres marqueurs de la présence de l'îlot *cagPAI* ont été rapportés, notamment le gène *cag E*. La distribution des différents génotypes varie d'un pays à un autre. La majorité des études visant à corrélér les génotypes d'*H.pylori* avec les pathologies gastriques, ont été menés chez l'adulte et dans les pays européen. Une seule étude a été réalisée chez l'adulte Marocain et a révélé une distribution génotypique différente de celle des pays Européens et Américains. Ainsi la distribution des différents génotypes chez l'enfant et son association avec les différentes pathologies restent inconnue.

Ainsi, pour combler cette défailance, nous nous sommes proposés de réaliser une étude préliminaire prospective chez des enfants *H.pylori* positifs. Ce travail a pour objectifs de :

- ✚ déterminer les génotypes d'*H.pylori* circulant chez l'enfant dans notre région
- ✚ établir une corrélation entre les différents génotypes et les différentes pathologies gastriques rencontrés chez l'enfant.
- ✚ Déterminer les amorces adéquates permettant une meilleure détection de l'îlot de pathogénicité *cagPAI*



Chapitre II : Matériel et méthodes

Prélèvement

Les enfants consultant au service de pédiatrie du centre hospitalier universitaire Hassan II (CHU), pour lesquels une endoscopie a été prescrite ont participé à cette étude après consentement de leurs parents. A l'endoscopie, des biopsies gastriques (partie antrale) sont prélevées et utilisées pour le diagnostic de l'*H.pylori*. Sont inclus dans l'étude, les enfants de moins de 15 ans et chez lesquels le diagnostic moléculaire montre une infection à *H.pylori* (PFE Ettamimi, 2013).

Caractéristiques cliniques et sociodémographiques

Les données cliniques et sociodémographiques relatives à chaque enfant *H.pylori* positive et participant à l'étude sont collectées, et les résultats des diagnostics endoscopique et histologique ainsi que l'âge et le sexe des enfants ont été noté (PFE Ettamimi, 2013).

Amplification génique ou PCR

Principe de la PCR

La PCR réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice simple brin d'ADN. La séquence cible est multipliée par synthèses successives à l'aide d'amorces oligonucléotidiques et d'une ADN polymérase thermostable. Chaque cycle de PCR est constitué de 3 étapes : dénaturation, hybridation des amorces et polymérisation. La séquence cible étant doublée à chaque cycle, le taux d'amplification (théorique) est de 2^n (n = nombre de cycles).

Préparation d'ADN

Les biopsies sont initialement broyées dans du PBS (phosphate buffered saline). Après centrifugation de 15 min à 13500 rpm, le culot est resuspendu dans 120 μ l du tampon PBS et additionné de 40 μ l d'une solution de lyse. Cette solution est composée de :

Tris HCl 1 M (pH=9)	—————>	2.5 μ L
Triton (1,5%)	—————>	0.6 μ L
Protéinase K (0,02mg/ml)	—————>	0.4 μ L
H ₂ O	—————>	37.5 μ L

Ensuite, les tubes sont bien agités avec le vortex et incubés 3h à 37°C. Enfin, la réaction de lyse est inactivée par chauffage à 93°C pendant 10 min.



Le produit de lyse est directement utilisé dans les réactions d'amplifications

Amorces utilisées

Afin de déterminer les génotypes d' *H.pylori*, des amorces spécifiques pour les gènes *vac A*, *cag A*, *cag E* et *cagPAI* sont utilisés.

Tableau2: Amorces utilisés dans l'étude

Gène	Amorce	Séquence de l'amorce	Taille duproduit (pb)
<i>cag A</i>	cag5c-F	5'-GTTGATAACGCTGTCGCTTC-3'	350
	cag3c-R	5'-GGGTTGTATGATATTTCCATAA-3'	
	F1	5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG-3'	349
	B1	5'-CTG CAAAAG ATT GTT TGGCAGA-3'	
<i>vac As1/s2</i>	VAI-F	5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3'	259/286
	VAI-R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'	
<i>vac Am1/m2</i>	VAG-F	5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3'	567/642
	VAG-R	5'-GCGTCAAATAATTCCAAGG-3'	
<i>vac Ai1</i>	VacF1	5'-GTTGGGATTGGGGGAATGCCG-3'	426
	VacC1R	5'-TTAATTTAACGCTGTTTGAAG-3'	
<i>vac Ai2</i>	VacF1	5'-GTTGGGATTGGGGGAATGCCG-3'	432
	VacC2R	5'-GATCAACGCTCTGATTGA-3'	
<i>cagPAI</i>	cag A-R	5'-	550
	cag A-F	CCAAATACATTTTGGTAAATAAAC-3' 5'-CTCTTTTTGTGCCTTTGATTGAA-3'	
<i>cag E</i>	cagE-F1	5'-GCGATTGTTATTGTGCTTGTAG-3'	329
	cagE-	5'-	



	R1	GAAGTGGTTAAAAAATCAATGCCCC- 3'	
--	----	----------------------------------	--

Amplification des gènes vac A et cag A par PCR multiplex

3.4.1 Principe de la PCR multiplex

Il existe une variante de PCR, qui est la PCR multiplex et qui permet d'amplifier plus d'un amplicon à la fois, par l'utilisation d'au moins trois amorces. Les produits de PCR ne seront alors compétitifs que pour la polymérase, les dNTP et l'ADN.

3.4.2 Technique d'amplification des gènes *vac A* et *cag A*

La PCR multiplex est utilisée pour amplifier une séquence du gène *cag A* ainsi que deux séquences du gène *vac A* (« s » et « m ») permettant de distinguer les différences alléliques au niveau de ces séquences (s1 ; s2 et m1 ; m2). Ainsi, pour le gène *vac A*, deux paires d'amorces sont utilisées : vac I-F/vac I-R pour « s1 ; s2 » et vac G-F/vac G-R pour « m1 ; m2 » ; *cag 3C-R/cag 5C-F* sont utilisés pour amplifier *cag A*.

Le mélange réactionnel utilisé pour cette amplification contient : 2 unités (U) de la Taq polymérase (Platinum®Taq DNA Polymerase), une concentration 1X du tampon, 200 µM de dNTP, 3 mM de MgCl₂, 100nM de chaque amorce et 7µL du produit de lyse. Le volume final est ajusté à 50 µL par ajout de l'eau distillée stérile.

Le mélange réactionnel est sujeté à une amplification dans un thermocycleur (Applied biosystems veriti 96-well thermal cycler). Le programme d'amplification consiste en 35 cycles de :

- Dénaturation de 1 min à 94°C
- Hybridation de 1 min à 55°C
- Elongation de 1 min à 72°C

Ce Programme est précédé d'une dénaturation initiale de 5 min à 94°C et se termine par une élongation prolongé de 7 min à 72°C.

Amplification du gène cag A, cag PAI, cagE, et vac A i

Afin de confirmer le résultat obtenu pour le statut du gène *cag A*, une amplification de l'îlot *cagPAI* et du gène *cagE* est effectué. La taille de l'îlot *cagPAI* est d'environ 4 Kb, et les amorces utilisées délimitent îlot et une région adjacente de 550 pb flanquant l'îlot des deux côtés. Vue sa taille, cet



îlot ne peut pas être amplifié dans les conditions de PCR. L'absence d'amplification confirme donc la présence de cet îlot de pathogénicité alors qu'une amplification d'une région de 550 pb implique une délétion de cet îlot.

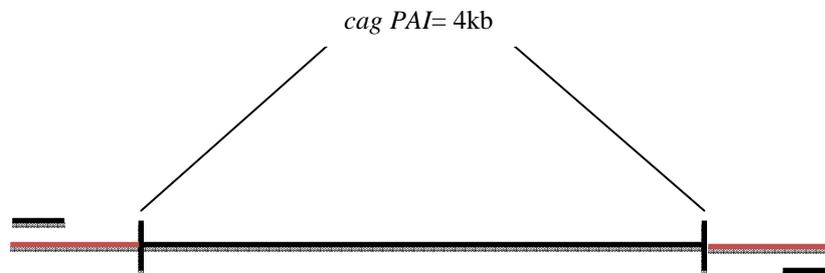


Figure 7 : Schéma de la région 550 pb par les amorces cag A-R/cag A-F

Le gène *cag E* est l'un des gènes présent dans l'îlot *cagPAI*, son amplification permet de confirmer la présence du *cagPAI*.

Le gène *cag A* est aussi recherché par PCR en utilisant un deuxième couple d'amorce F1/B1 dans le cas où les résultats de l'amplification avec le premier couple d'amorce est ceux de l'amplification du *cagPAI* sont contradictoires.

La région « i » du gène *vac A* présente deux sous types « i1 » et « i2 ». Ces derniers peuvent être distingués en utilisant la même amorce (sens) et deux amorces spécifiques (anti-sens) à chaque type allélique. Les réactions sont réalisées séparément.

🔧 Technique d'amplification

Pour chacune des PCR (*vac i*, *cag A*, *cag E* et *cag PAI*), le mélange réactionnel est composé de 2 U de la Taq polymérase, une concentration 1X du tampon, 200 µM de dNTP, 3 mM de MgCl₂, 200 nM des amorces cag A-R/cag A-F (*cagPAI*), cag F1/B1 (*cag A*), F1/R1 (*cag E*) vaci F1/vaci C1R (allèle « i1 » de *vac A*) et vaci F1/vaci Ac2R (allèle « i2 » du *vac A*) et 7 µL du produit de lyse. Le volume final est ajusté à 50 µL par l'ajout de l'eau distillée.

Le programme d'amplification consiste en 35 cycles, précédés d'une dénaturation initiale de 5 min à 94°C et se termine par une élongation prolongé de 5 min à 72°C.



Les 35 cycles consistent à une dénaturation de 30s à 94°C, une hybridation d'une minute à 56°C pour les gènes *cag A*, *cagPAI* et *vac A i*, et à 56°C pour le gène *cag E*, et enfin une élongation d'une minute à 72°C.

2.2 Révélation du produit d'amplification par électrophorèse

2.2.1 Principe de l'électrophorèse

La technique de l'électrophorèse en gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique et selon leur poids moléculaire. La distance de migration est inversement proportionnelle au poids moléculaire des molécules à séparer.

2.2.2 Gel d'agarose

La visualisation des produits d'amplification est réalisée sur un gel d'agarose à 2%. Il est préparé en diluant 2g d'agarose dans 100 ml d'un tampon TBE 1X (voir annexe). La solution est portée à ébullition. Après refroidissement, 1µl de bromure d'éthidium (BET) est rajouté au gel. Ce dernier est coulé dans la plaque réservée à cet effet et le peigne y est déposé. Une fois solidifié, le peigne est retiré et les produits PCR sont déposés séparément.

2.2.3 Protocole

Dans l'étape de l'électrophorèse, 10 µL du produit de PCR de chaque réaction est mélangé avec 2 µL du tampon de charge, et déposé dans les puits d'un gel d'agarose préparé à 2%.

Pour déterminer la taille du produit d'amplification, le marqueur de taille de 50 pb est déposé dans un puits. Après migration dans le tampon TBE, le gel est visualisé sous les rayons ultraviolets pour la lecture des résultats.

2.3 Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique des résultats est réalisée à l'aide du logiciel « Epi info V7 ». Les différentes corrélations sont réalisées par ce logiciel en utilisant le test Chi 2 (X^2) avec un interval de confiance de 95%. Sont considérées significatives toutes les corrélations ayant un « p » inférieure à 0.05.

Les corrélations effectuées sont :

- Corrélation entre les allèles du gène *vac A* et le gène *cag A*
- Corrélation des gènes *vac A* et *cag A* avec les caractéristiques sociodémographiques
- Corrélations des gènes *vac A* et *cag A* avec les caractéristiques cliniques



Résultats

Des biopsies gastriques ont été prélevées sur 130 enfants souffrant de diverses pathologies gastriques. La recherche d'*H.pylori* par PCR a montré que 47 cas y sont positifs (PFE Ettamimi., 2013). Ces 47 enfants représentent la population étudiée. *H. pylori* a été génotypée à partir des biopsies prélevées chez ces enfants. Ainsi, les génotypes *vac A* et les statuts *cag A* et *cag E* ont été déterminés.

Description de la population étudiée

La population étudiée compte 47 enfants chez lesquels un diagnostic moléculaire a montré une infection à *H.pylori*. Plus que la moitié de ces enfants ont été de sexe féminin [53,19%, (25/47)] versus 46,81% (22/47) de sexe masculin. Les enfants ont été subdivisés en deux groupes d'âges : le groupe 1 est composé des enfants de moins de 9 ans et le groupe 2 comporte des enfants de 9 ans à



15ans. Ainsi, 66 % (31/47) des enfants appartiennent au groupe 1 et 34 % (16/47) appartiennent au groupe 2.

Les biopsies prélevées ont fait objet d'un examen histologique. Les résultats de cet examen ont montré que 4,25 % (2/47), 93,62 % (44/47), et 70,21 % (33/47) des enfants présentent une muqueuse normale, gastrite chronique, atrophie respectivement. L'atrophie et la gastrite chronique peuvent être présentes chez le même enfant.

Les résultats de l'endoscopie ont montré que 29,79 % (14/47) des enfants présentent une muqueuse normale, 59,57 % (28/47) présentent une muqueuse nodulaire et 21,27 % (10/47) présentent une muqueuse érythémateuse. La muqueuse à la fois nodulaire et érythémateuse peut être observée chez le même patient.

*Détermination du profil génotypique d'*H.pylori* chez l'enfant*

L'élaboration du profil génotypique d'*H.pylori* est basée sur la détermination du génotype *vac A* avec ses trois régions et du statut *cag* (*cag A* et *cag E*). Ce dernier est confirmé par le statut *cagPAI*. Une PCR multiplex a été réalisée pour déterminer le type des allèles des régions *s* (*s1* et *s2*) et *m* (*m1* et *m2*) du *vac A* ainsi que le statut du *cag A*. L'amplification de *s* donne un produit de 259 pb pour *s1* et de 286 pb pour *s2* tandis que le produit d'amplification de *m* est de 570 pb pour *m1* et de 646 pb pour *m2*. L'amplification du *cag A* donne une bande de 349 pb. Quelques profils sont représentés sur la figure 8.

L'amplification de *vac A* i donne une bande de 426 pb pour *i1* et 432 pb de pour *i2* (figure 9).

Le couple d'amorces *cag A-R/cag A-F* délimite une région d'environ 40 Kb correspondant à l'îlot *cagPAI*. *In vitro*, l'amplification d'un produit d'une telle taille ne peut être réalisée. De ce fait, l'absence d'amplification avec ce couple d'amorce signifie la présence des gènes composant l'îlot *cagPAI* et la présence d'un produit de 550 pb signifie l'absence de cet îlot. Et donc les prélèvements présentant un produit d'amplification avec ce couple d'amorces sont *cag A* et *cag E* négatifs. Les résultats des différentes PCR réalisées sur les 47 échantillons *H.pylori* positifs sont rapportés sur le tableau 3.

Ces résultats montrent un taux plus élevé des allèles *s2*, *m2* et *i2* par rapport aux allèles *s1*, *m1* et *i1* respectivement. Les combinaisons alléliques des différentes régions *vac A* ont été élaborés et sont présentées sur le tableau 3. Le profil génotypique dominant est le *s2i2m2* (46,81 %) suivi du *s2m2* (%12,77) (le *i* n'a pas pu être déterminé). La présence des deux types alléliques d'au moins une des



régions s, m, ou i du *vac A* signifie la présence de deux souches différentes dans le prélèvement en question (infection multiple). Ainsi, une infection multiple a été détectée dans 8,51% des cas. Le génotype *vac A* n'a pu être déterminé que dans 2,13% des cas. Le génotype incomplet (une ou deux régions du *vac A* ne sont pas typées) a été obtenu dans 34,05% des cas. Tandis que les deux gènes *cag A* et *cag E* ont été détectés dans 7 cas parmi les 47 étudiés soit à une prévalence de 14,9%.

Détection du statut cag par les différentes amorces

Pour déterminer le statut « cag », trois paires d'amorces ont été utilisées. Deux paires sont utilisées pour la détection des gènes *cag A* et *cag E* séparément et la troisième pour vérifier la présence ou l'absence de l'îlot *cag PAI*. Une comparaison entre les résultats obtenus avec les amorces *cag A* (*cag5c-F/cag3c-R*), *cag E* et *cagPAI* a été effectuée et représentée dans le tableau 4.

Le gène *cag A* a aussi été recherché par PCR en utilisant un deuxième couple d'amorce (F1/B1) dans 20 cas positifs pour l'îlot de pathogénicité *cag PAI* (absence d'amplification avec les amorces du *cagPAI*) et négatifs avec le premier couple d'amorces (*cag5c-F/cag3c-R*). Une amplification de deux échantillons a été obtenue avec ce couple d'amorces.

Tableau3: Statut du gène *cag A*, prévalence des allèles *vac A* et différentes combinaisons alléliques obtenus

Gènes		% (nbr/T)
<i>vac A s</i>	s1	14,89 (7/47)
	s2	80,85 (38/47)
<i>vac A i</i>	i1	6,38 (3/47)
	i2	70,21 (33/47)
<i>vac A m</i>	m1	10,64 (5/47)
	m2	68,09 (32/47)
Génotype <i>vac A</i> incomplet		
<i>vac A i2</i>		4,26 (2/47)
<i>vac A s2</i>		10,64 (5/47)



<i>vac A s2i2</i>	6,38 (3/47)
<i>vac A s2m2</i>	12,77 (6/47)
Associations Simple de <i>vac A</i>	
<i>vac A s2i2m2</i>	46,81 (22/47)
<i>vac A s1i2m1</i>	4,26 (2/47)
<i>vac A s1i2m2</i>	4,26 (2/47)
Infection multiple	8,51 (4/47)
Non typé	2,13 (1/47)
<i>cag A</i>	14,9 (7/47)
<i>cag E</i>	14,9 (7/47)

✚ nbr/T : nombre des allèles et des génotypes détectés / totale des échantillons

✚ % : pourcentage des allèles et génotype détectés

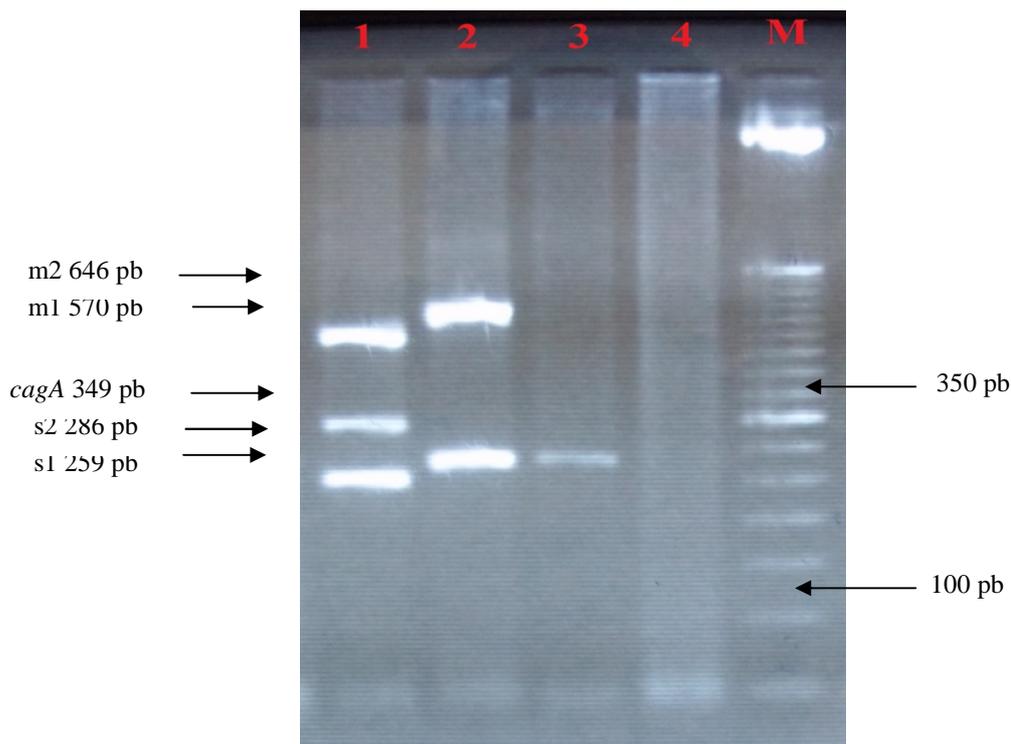


Figure 8: Analyse sur gel d'agarose à 2% montrant des produits d'amplification obtenus par PCR multiplex

- 1: Produit d'amplification d'un prélèvement de génotype *s1/m1/cag A*
- 2: Produit d'amplification d'un prélèvement de génotype *s2/m2*
- 3: Produit d'amplification d'un prélèvement de génotype *s2*
- 4: Produit d'amplification d'un prélèvement non typé
- M: Marqueur de taille de 50 pb

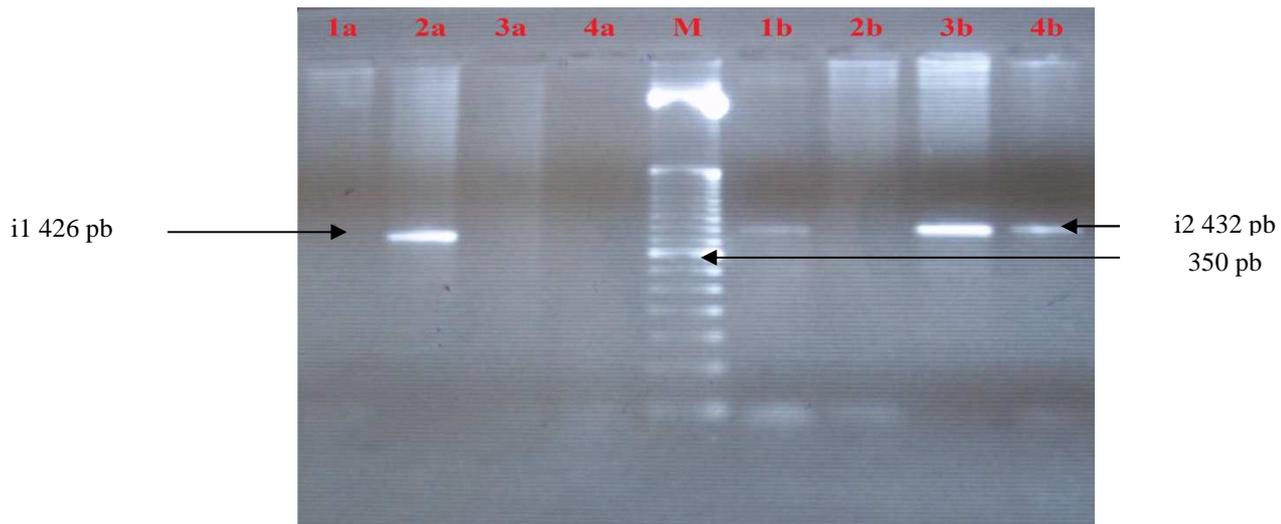


Figure 9: Analyse sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplification de l'allèle i1 (1a – 4a) et de l'allèle i2 (1b -4b) du gène *vac A* obtenus par PCR ; M : Marqueur de taille de 50 pb

Tableau4: Comparaison entre les résultats d'amplification des gènes *cag A* (*cag5c-F/cag3c-R*), *cag E* et de l'îlot *cag PAI*

	<i>cag A</i>		<i>cagE</i>		Total <i>cagPAI</i>
	-	+	-	+	
<i>cag PAI</i> -	22	0	22	0	22
<i>cagPAI</i> +	20	5	18	7	25
Total	47		47		47

NB : *CagPAI* positif signifie absence d'une amplification (présence de l'îlot *cagPAI*)

L'amplification du gène *cag E* donne un produit de 329 pb, tandis que le produit d'amplification du gène *cag A* avec les amorces F1/B1 est de 349.



Les résultats montrent que tous les *cag A+* sont *cagE+*, et que le nombre des *cag E+* (nbr = 7) est supérieur à celui des *cag A+* (nbr = 5). L'utilisation du couple d'amorces F1/B1 (*cag A*) a permis de confirmer la présence de *cag A* dans les deux échantillons *cag E+*, et *cag A-* avec les amorces *cag5c-F/cag3c-R*.

D'autre part, tous les *cag E+* et les *cag A+* sont des *cagPAI+*. Cependant, 18 cas présentaient un *cagPAI+* et *cag E-*, alors que 20 étaient *cagPAI+* et *cag A-*.

Les résultats obtenus après vérification de la présence du gène *cag A* par la deuxième paire d'amorce, ont montré une présence du gène *cag A* dans 7/47 des prélèvements.

Résultats des corrélations effectuées

Les différentes corrélations testées ont été réalisées à l'aide du logiciel « **Epi info V7** ». Les corrélations considérées significatives sont ceux qui ont un p inférieure à 0,05.

La p value a été calculée en éliminant les prélèvements présentant un génotype *vac A* multiple et aussi ceux non typés.

Le *cag A* a été considéré positif dans le cas où il a été détecté par au moins une seule paire d'amorce.

4.1. Corrélation entre les allèles du gène vac A et le gène cag A

Le statut *cag A* a été corrélé au statut *vac A* s, m et i. Parmi les *cagA+* 54,14% sont s1 versus 28,57% qui sont s2, et pour les allèles m, 57,14% sont *cagA+* versus 42,86% qui sont m2.

Ces résultats obtenus montrent une association significative entre le gène *cag A* et les allèles *vac A* s1, et *vac A* m1.

La corrélation du *cag A* avec les allèles de la région « i » n'a pas été significative, mais *cag A* semble plus lié à i2 par rapport à i1. Le tableau 5 montre les résultats issus de ces corrélations.

Tableau5: Corrélation entre les allèles du gène *vac A* et les gènes *cag A*

<i>vac A</i>	<i>cag A</i> % (nbr/T)	P
--------------	------------------------	---



		<i>cag</i> A+	<i>cag</i> A-	
S	s1	57,14 (4/7)	33,33 (2/40)	0,00005
	s2	28,57 (2/7)	87,50 (35/40)	
	Non typé en s	14,29 (1/7)	7,50 (3/40)	
I	i1	14,29 (1/7)	0	0,41
	i2	71,43 (5/7)	65 (26/40)	
	Non typé en i	14,29 (1/7)	35 (14/40)	
M	m1	57,14 (4/7)	2,50 (1/40)	0,01
	m2	42,86 (3/7)	67,5 (27/40)	
	Non typé en m	0	30 (12/40)	

4.2. *Corrélation des gènes vac A et cag A avec les caractéristiques sociodémographiques*

Relation entre l'âge des enfants infectés et le génotype d'*H.pylori*



Le pourcentage des allèles *vac A* montre que les allèles s1, i1, m1 et le gène *cag A* sont plus prédominant dans la première tranche d'âge, alors que les allèles s2, i2, et m2 sont plus prédominant dans la deuxième tranche d'âge (tableau 6). La corrélation entre l'âge et le génotype de la bactérie reste non significative.

Tableau6: Corrélation entre l'âge et le génotype d'*H.pylori*

gènes <i>vac A</i> et <i>cag A</i>		< 9	De 9 à 15 ans	P
		% (nbr)	% (nbr)	
s	s1	16,13 (5)	6,25 (1)	0,58
	s2	74,19 (23)	87,50 (14)	
	Non typé en s	9,68 (3)	6,25 (1)	
I	i1	3,23 (1)	0	0,12
	i2	61,29 (19)	75 (12)	
	Non typé en i	35,48 (11)	25 (4)	
M	m1	9,68 (3)	6,25 (1)	0,85



	m2	58,06 (18)	81,25 (13)	
	Non typé en m	32,26 (10)	12,5 (2)	
<i>cag A</i>	<i>cag A+</i>	16,13 (5)	12,50 (2)	0,89
	<i>cag A-</i>	83,87 (26)	87,50 (14)	
Total des tranches d'âges		31	16	

Relation entre le sexe des enfants infectés et le génotype d'*H.pylori*

Aucune corrélation n'a pu être obtenue entre le génotype d'*H.pylori* et le sexe des enfants. Cependant, les allèles s ont tendance à se lier au sexe masculin, contrairement aux allèles « i », qui ont une tendance à se lier au sexe féminin. Pour les allèles « m », le m1 est plus lié au sexe féminin, alors que le m2 a une tendance à se lier au sexe masculin.

En ce qui concerne le gène *cag A*, le pourcentage des *cag A+* est plus élevé chez le sexe masculin. Les résultats de cette corrélation sont illustrés sur le tableau 7.

Tableau7: Corrélation entre le génotype d'*H.pylori* et le sexe

Gènes <i>vac A</i> et <i>cag A</i>		Masculin	Féminin	P
		% (nbr/T)	% (nbr/T)	
S	s1	13,64 (3)	12 (3)	0,9



	s2	86,36 (19)	72 (18)	
	Non typé en s	0	16 (4)	
I	i1	0	4 (1)	0,2
	i2	63,64 (14)	68 (17)	
	Non typé en i	36,36 (8)	28 (7)	
M	m1	0	16 (4)	0,14
	m2	72,73 (16)	60 (15)	
	Non type en m	27,27 (6)	24 (6)	
cag A	cag A+	18,18 (4)	12 (3)	0,55
	cag A-	81,82 (18)	88 (22)	
Total		22	25	

4.3. *Corrélations des gènes vac A et cag A avec les caractéristiques cliniques*

Diagnostique histologique



Aucune corrélation significative n'a été obtenue entre le génotype et le profil histologique. En revanche, les pourcentages montrent que les allèles s1, i2 et m2 sont prédominants dans les gastrites chroniques, alors que les allèles s2 et m1 et i1 sont plus prédominants dans les cas d'atrophie.

Pour le *cag A*, les pourcentages des *cag A+* ont été à peu près égaux. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 8.

Tableau8: Corrélation entre le génotype d'*H.pylori* et les profils histologiques

Gènes <i>vac A</i> et <i>cag A</i>		Gastrite chronique		Atrophie	
		% (nbr)	P	% (nbr)	P
s	s1	13,64 (6)	0,54	9,09 (3)	0,43
	s2	77,27 (34)		78,79 (26)	
	Non typé en s	9,09 (4)		12,12 (4)	
i	i1	2,27 (1)	0,71	3,03 (1)	0,083
	i2	68,18 (30)		66,67 (22)	
	Non typé en i	29,55 (13)		30,30 (10)	
	m1	9,09 (4)		12,12 (4)	0,33



m	m2	70,45 (31)	0,45	69,7 (23)	0,93
	Non typé en m	20,45 (9)		18,18 (6)	
cag A	cag A+	15,91 (7)	0,45	15,15 (5)	0,93
	cag A-	84,09 (37)		84,85 (28)	
Total des pathologies		44		33	

Diagnostic endoscopique

Aucune corrélation significative n'a pu être obtenue entre les différentes pathologies et le génotype d'*H.pylori*. Les résultats obtenus montrent que l'allèle s2 a une tendance à se lier à la muqueuse normale, tandis que l'i2 et le m2 sont liés plus à la gastrite érythémateuse. L'allèle s1 caractérise surtout les deux gastrites érythémateuse et nodulaire.

En ce qui concerne le gène *cag A*, le pourcentage des *cag A-* est plus élevé que celui des *cag A+* dans les trois différents états de la muqueuse, avec un pourcentage plus élevé pour la gastrite érythémateuse. Le tableau 9 montre les résultats issus de cette corrélation.

Tableau9: Corrélation entre le génotype d'*H.pylori* et le profil endoscopique

Gène <i>vac A</i>	Muqueuse normale		Gastrite nodulaire		Gastrite érythémateuse	
	% (Nbr/T)	P	% (Nbr/T)	P	% (Nbr/T)	
s1	0	0,14	13,79	0,74	30 (3)	



S				(4)			
	s2	92,86 (14)		75,86 (22)		70 (7)	
	Non typé en s	7,14 (1)		10,34 (3)		0	
I	i1	7,14 (1)	1	0	0,32	0	
	i2	50 (7)		68,97 (20)		80 (8)	
	Non typé en i	42,86 (6)		31,03 (9)		20 (2)	
M	m1	7,14 (1)	0,36	6,90 (2)	0,7	10 (1)	
	m2	64,29 (9)		65,52 (19)		70 (7)	
	Non type en m	28,57 (4)		27,59 (8)		20 (2)	
cag A	cag A+	14,29 (2)	0,93	10,34 (3)	0,23	20 (2)	
	cag A-	85,71 (12)		89,66 (26)		80 (8)	
	Total des pathologies	14		29		10	



DISCUSSION

Dans les pays nord-africains, le profil génotypique d'*H.pylori* n'a jamais été déterminé chez l'enfant. Ce travail est le premier de son genre qui a permis de déterminer le profil génotypique de cette bactérie chez les enfants marocains présentant différentes pathologies gastriques.

Cette étude prospective préliminaire a été réalisée sur 47 biopsies *H.pylori* positifs comme déterminé par amplification d'une séquence de 298pb du gène *ureC*. Les statuts *cag A* et *cag E* ainsi que les sous-types *vac A* s, i et m ont été déterminés.

Nos résultats montrent une dominance des allèles s2 (80.85%) et m2 (68.09) par rapport aux allèles s1 (45.2%) et m1 (10.64%) du gène *vac A*. Cette distribution est complètement différente de celles rapportées dans plusieurs études (Zivar et al., 2011 ; Anderson et al., 2000 ; Talarico et al., 2009), notamment l'étude Brésilienne (De Gusmao et al., 2000). Dans cette dernière, les allèles du *vac A* s1 et m1 sont les plus dominants avec des taux de 72,72% et 61,8% respectivement. En revanche, nos résultats sont relativement en accord avec ceux rapportés chez l'adulte dans l'unique étude qui a été réalisée dans la région de Fès au Maroc (Alaoui et al, 2012). Le génotypage du gène *vac A* a montré aussi la prédominance des deux allèles *vac A* s2 et m2 par rapports aux autres, avec un pourcentage de 50,2% et 57,6% respectivement.

En ce qui concerne la région « i » du *vac A*, l'allèle i2 (70,21%) est plus dominant que l'allèle i1 (6,38%). Cependant, une étude réalisée en Bulgarie (Yordanov et al, 2012) et corrélant les génotypes *vac A* i aux différentes tranches d'âges, a montré que les enfants âgés de 6 à 17 ans présentent une prédominance de l'allèle i1 (58,3%) comparé à i2 (41,9%). Les allèles de la région « i » du gène *vac A* n'ont pas encore été génotypés chez l'adulte au Maroc pour réaliser une comparaison.



Ainsi, la distribution des génotypes *vac A* dans notre étude, diffère de celle des autres pays. L'association des génotypes *vac A* s et m (lors d'une infection simple), montre que le génotype s2m2 (59,58%) est le plus prédominant suivi de s1m1 (4,26%) et s1m2 (4,26%). Tandis que le génotype s2m1 n'a pas été détecté chez l'enfant. Cependant, les études menées chez les enfants d'autres pays, notamment Brésiliens et Iraniens, montrent une prédominance du génotype s1m1 avec des taux de 73,49% et 61,8% respectivement (De Gusmao et al., 2000 ; Zivar et al., 2011 ; Zhou et al., 2012). Tandis que l'étude effectuée au Maroc chez l'adulte, a montré un profil génotypique comparable à celui obtenu chez l'enfant. Le génotype le plus prédominant a été le s2m2 (51%) suivi par le s1m1 (32%) et le s1m2 (14,5%), avec une rare présence du s2m1 (2,1%).

L'association des trois allèles de *vac A* donne toujours une prédominance du génotype *vac A* s2i2m2 (46,81%). Tandis que l'étude menée en Bulgarie a montré une prédominance du génotype *vac A* s1i1m1 avec un pourcentage de 45,5% (Yordanov et al., 2012).

Dans cette étude, l'infection multiple (justifiée par la présence de deux allèles différents appartenant à la même région) chez l'enfant a été rapportée dans 8,51% des cas. Ce taux reste comparable à celui retrouvé dans notre région chez l'adulte (10,8%) (Alaoui et al., 2012).

Pour le statut *cag A*, les résultats de la présente étude ont montré un faible taux du gène *cag A* comparativement aux études menées chez l'enfant dans d'autres pays notamment l'Iran et l'Estonie (Zivar et al., 2011 ; Anderson et al., 2000). Dans ces derniers, les taux de *cag A* ont été de 62,8% et 87% respectivement. Ce taux est aussi inférieur à celui obtenu chez l'adulte marocain et qui est de 42,3% (Alaoui et al., 2012).

Le taux de *cag A* déterminé avec une seule paire d'amorces (*cag5c-F/cag3c-R*) est de 10,63% et celui du *cag E* est de 14,9%. La comparaison de ces taux avec les résultats du *cagPAI* permet de confirmer que l'utilisation des amorces F1/R1 (pour la détection du *cag E*) représente une meilleure alternative pour déterminer le statut du *cagPAI*. Les mêmes résultats ont été obtenus dans d'autres études, notamment celle de Boyanova et col. en Bulgarie (Boyanova et al., 2011) qui ont montré que la recherche du *cag E* permet une meilleure identification des souches virulentes. Le résultat contradictoire obtenu avec les différents amorces du *cag* (pas d'amplification avec le couple d'amorces (du *cagPAI*) et aussi avec ceux utilisées pour la détection du *cag A* et *cag E*) dans 18 cas peuvent être expliqués par une délétion de la partie *cag I* qui contient les gènes *cag A* et *cag E* (généralement utilisés comme marqueurs de la présence du *cagPAI*) comme il a été démontré dans l'étude de Baghaei et col. en Iran (Baghaei et al., 2009). Cette hypothèse doit être vérifiée par la



recherche d'un gène marqueur de la présence du *cagII* de l'îlot de pathogénicité (gène *cag T* par exemple) (Baghaei et al., 2009).

Différentes études réalisées dans différents pays révèlent que le *cag A* est significativement associé aux sous types *vac A s1* et *vac A m1* (Atherton et al., 1995 ; Atherton et al 1997 ; Rudi et al., 1999 ; Andreson et al., 2002 ; Yordanov et al., 2012 ; Sumeesh et al., 2011). Les résultats obtenus dans la présente étude confirment cette donnée. En effet, le *cag A* est significativement lié aux *vac A s1* ($p = 0,00005$) et *vac A m1* ($p = 0,01$).

Une étude menée au Brésil a montré une association significative entre les allèles *vac A s1* et *m1* d'*H.pylori* et l'âge des enfants (9ans et plus) (De Gusmao et al., 2000). Dans la présente étude la corrélation entre l'âge et les différents génotypes d'*H.pylori* n'a donné aucun résultat significatif. Cependant, les allèles *s1*, *i1*, *m1* et le gène *cag A+* sont plus prédominant chez les enfants de moins de 9 ans alors que les allèles *s2*, *i2*, *m2* sont plus prédominant chez les enfants âgés de 9 ou plus. L'absence d'un résultat significatif peut être liée au faible effectif étudié.

La corrélation entre le sexe et le génotype confirme les résultats obtenus dans une autre étude et concluant l'absence d'une liaison entre les deux facteurs (Yordanov et al., 2012).

La corrélation du génotype *vac A* avec le profil histopathologique reste contradictoire suivant les études (Atherton et al., 1995 ; De Gusmao et al., 2000 ; Zivar et al., 2011 ; Yordanov et al., 2012 ; Talarico et al., 2009), (Celik et al., 1998 ; Loeb et al., 1998). Les corrélations entre le génotype d'*H.pylori* et les pathologies gastrique, réalisés dans différentes études, révèlent toujours une association significative entre les allèles *vac A s1*, *i1*, *m1* et le gène *cag A+* avec la pathologie ulcéreuse (les ulcères duodénaux) et entre les allèles *vac A s2*, *i2*, *m2* avec les pathologies moins sévères notamment la gastrite chronique (Celik et al., 1998 ; Atherton et al., 1995 ; Rhead et al., 2007). Dans cette étude, préliminaire aucune association significative n'a pu être obtenue entre les génotypes et le profil histologique ou endoscopique. Ceci peut être lié au faible effectif étudié. D'autre part, l'absence de cas d'ulcère et le taux élevé de la gastrite chronique peut être expliqué par la prédominance des génotypes *vac A s2*, *i2* et *m2*.



Conclusion

Cette étude est la première étude réalisée sur *H.pylori* chez l'enfant au niveau des pays nord-africains. Elle contribue à l'enrichissement des données relatives au profil génotypique de cette bactérie. Elle a permis de déterminer la diversité génotypique d'*H.pylori* chez l'enfant marocain, et qui est en accord avec celle rapportées chez l'adulte dans l'unique étude qui a été réalisée dans la région de Fès. Les génotypes *vac A s2i2m2* avec les allèles *s2*, *i2* et *m2* sont les plus prédominants, et le taux de *cag A* est de 14,9%. Le taux d'atrophie élevé détecté dans cette étude (l'atrophie est considérée comme une lésion précancéreuse) est alarmant, ce qui impose l'instauration d'un protocole de diagnostic et d'éradication d'*H.pylori* chez l'enfant. L'importance de la détermination du statut de l'îlot de pathogénicité *cagPAI* dans la prédiction du taux de virulence d'*H.pylori*, exige la recherche de plus de marqueurs déterminant sa présence. La comparaison entre les résultats rapportés par les amorces du gène *cag A* et du gène *cag E*, révèlent la fiabilité du gène *cagE* dans la recherche de cet îlot.

Perspectives

Cette étude préliminaire en comparaiso avec l'étude réalisée chez l'adulte (alaoui et al, 2013) a permis de montrer la différence de la prévalence de l'infection à *H.pylori* entre l'enfant et l'adulte



marocain. Plusieurs corrélations ont été vérifiées mais n'ont pas été statistiquement significatives. Ainsi une étude sur un plus grand effectif, notamment en élargissant l'étude sur d'autres régions, doit être réalisée pour pouvoir déterminer l'association entre les génotypes d'*H.pylori* et les différents profils histologiques et les différentes pathologies gastriques. La détermination du statut de l'îlot *cag PA* des souches d'*H.pylori* doit être vérifiée en utilisant des gènes marqueurs pour les deux régions de l'îlot (*cagI* et *cagII*). D'autres marqueurs de la virulence d'*H.pylori* doivent être déterminés et recherchés notamment le gène *dup A*.

Bibliographie

- Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan ZJ, Suerbaum S, Thompson SA, van der Ende A, van Doorn LJ. «Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographic regions.» *Mol Microbiol*, 1999: 32:459-470.
- Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, Bukanov NO, Drazek ES, Roe BA, Berg DE. «Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*.» *Mol Microbiol*, 1998: 28(1):37-53.
- Akopyants.NS, Clifton.SW, Kersulyte.D, Crabtree.JE, Youree.BE, CA.Reece, NO.Bukanov, ES.Drazek, BA.Roe, DE.Berg. «Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*.» *Mol. Microbiol*, 1998: 28:37-53.
- Al Qabandi A, Mustafa AS, Siddique I, Khajah AK, Madda JP, Junaid TA. «Distribution of *vacA* and *cagA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Kuwait.» *Acta Trop*, 2005: 93(3):283-288.
- Alaoui Boukhris S, Benajah DA, El Rhazi K, Ibrahim SA, Nejjari C, Amarti A, Mahmoud M, El Abkari M, Souleimani A, Bennani B. «Prevalence and distribution of *Helicobacter*



pyloricagA and *vacA* genotypes in the Moroccan population with gastric disease.» *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012: 31(8):1775-1781.

Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. «Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori CagA*.» *Science*, 2003: 300(5624):1430-1434.

Amieva.MR, El-Omar.EM. «Host-Bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection.» *Gastroenterology*, 2008: 134(1):306-323.

Andreson.H, Lõivukene.K, Sillakivi.T, Maaroos.HI, Ustav.M, Peetsalu.A, Mikelsaar.M. «Association of *cagA* and *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* with gastric diseases in Estonia.» *J Clin Microbiol*, 2000: 40(1):298-300.

Argent RH, Kidd M, Owen RJ, Thomas RJ, Limb MC, Atherton JC. «Determinants and consequences of different levels of *CagA* phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*.» *Gastroenterology*, 2004: 127(2):514-523.

Asahi.M, Azuma.T, Ito.S, Ito.Y, Suto.H, Nagai.Y, M.Tsubokawa, Y.Tohyama, S.Maeda, M.Omata, T.Suzuki, C.Sasakawa. «*Helicobacter pylori CagA* protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells.» *J Exp Med*, 2000: 191(4):593-602.

Aspholm M, Farzad O, Norde J, Sonde B, Lundberg C, Sjoström R, Altraja S, Odenbreit S, Haas R, Wadström T, Engstrand L, Semino-Mora C, Liu H, Dubois A, Teneberg S, Arnqvist A. «SabA Is the *H. pylori* Hemagglutinin and Is Polymorphic in Binding to Sialylated Glycans.» *PLoS Pathogens*, 2006: 2(10): e110.

Aspinall.GO, Monteiro.MA. «Lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains P466 and MO19: structures of the O antigen and core oligosaccharide regions.» *Biochemistry* , 1996: 35:2498–2504.

Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. «Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*.» *Gastroenterology*, 1997: 112:92–99.

Atherton.JC, Cao.P, 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(30):17771-17777.

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Audibert%20C%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=11179336" Audibert C ,

HYPERLINK



"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Burucoa%20C%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=11179336" Burucoa C ,
HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Janvier%20B%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=11179336" Janvier B ,
HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fauch%20C3%A8re%20JL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=11179336" Fauchère JL . «implication of the structure of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island in induction of interleukin-8 secretion. » *Infect Immun*, 69(3):1625-9.

Axon.AT. «Review article: is *Helicobacter pylori* transmitted by the gastro-oral route?» *Aliment Pharmacol Ther*, 1995: 9(6):585-588.

Azuma T, Ito S, Sato F, Yamazaki Y, Miyaji H, Ito Y, Suto H, Kuriyama M, Kato T, Kohli Y. «The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection.» *Cancer*, 1998: 82(6):1013-1018.

Backstrom A, Lundberg C, Kersulyte D, Berg DE, Boren T, Arnqvist A. «Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding.» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004: 101:16923–16928.

Baghaei K, Shokrzadeh L, Jafari F, Dabiri H, Yamaoka Y, Bolfion M, Zojaji H, Aslani MM, Zali MR. «Determination of *Helicobacter pylori* virulence by analysis of the cag pathogenicity island isolated from Iranian patients.» *Dig Liver Dis*, 2009 : 41(9):634-638.

Bardhan.PK. «Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries.» *Clin Infect Dis*, 1997: 25 : 973- 978.

Bechi.P, Balzi.M, Becciolini.A, Maugeri.A, Raggi.CC, Amorosi.A, Dei.R. «*Helicobacter pylori* and cell proliferation of the gastric mucosa: possible implications for gastric carcinogenesis.» *Am J Gastroenterol*, 1996 : 91(2):271-276.

Bellack NR, Koehoorn MW, MacNAB YC, Morshed MG. «A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence.» *2006*, 2006: 134(3): 439–449.

Blaser MJ, Chyou PH, Nomura A. «Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer and duodenal ulcer risk.» *Cancer Res*, 1995: 55 : 562-565.

Borén T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. «Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens.» *Science*, 1993: 262(5141):1892-1895.



- Borody T, Andrews P, Mancuso N, Jankiewicz E, Brandl S. «*Helicobacter pylori* reinfection 4 years post-eradication.» *Lancet*, 1992: 339(8804):1295.
- Bourzac KM, Guillemin K. «*Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion.» *Cell. Microbiol*, 2005: 7:911-919.
- Burne.RA., Chen.YM. «Bacterial ureases in infectious diseases.» *Microbes Infect*, 2000: 2:533–542.
- Boyanova.L, D.Yordanov , G.Gergova, R.Markovska, Mitov je. «Avantages de l'*Helicobacter pylori cagE* génotypage en plus de *cagA* génotypage: une étude bulgare.» *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011: 100 (4) :529-535.
- Celik J, Su B, Tirén U, Finkel Y, Thoresson AC, Engstrand L, Sandstedt B, Bernander S, Normark S. «Virulence and colonization-associated properties of *Helicobacter pylori* isolated from children and adolescents.» *J Infect Dis*, 1998 : 177(1):247-252.
- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. «*cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors.» *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996 : 93(25):14648-53.
- Chaput C, Bonecca, IG. «Bases moléculaires de l'interaction de *Helicobacter pylori* avec les cellules épithéliales gastriques.» *Hépatogastro*, 2006 : 13: 379-388



HYPERLINK

"<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chung%20C%5Bauth%5D>" Christine Chung , **HYPERLINK**

"<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Olivares%20A%5Bauth%5D>" Asalia Olivares , **HYPERLINK**

"<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Torres%20E%5Bauth%5D>" Eugenia Torres , **HYPERLINK**

"<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yilmaz%20O%5Bauth%5D>" Ozlem Yilmaz , **HYPERLINK**

"<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cohen%20H%5Bauth%5D>" Henry Cohen , **HYPERLINK**

"<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Perez-Perez%20G%5Bauth%5D>" Guillermo Perez-Perez . «Diversity of VacA Intermediate Region among *Helicobacter pylori* Strains from Several Regions of the World.» *J Clin Microbiol*, 2010;48(3): 690–696.

Churin Y, L.Al-Ghoul, O.Kepp, TF.Meyer, W.Birchmeier, M.Naumann. «*Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response.» *J. Cell Biol*, 2003: 161:249-255.

Copeland CE, Stahlfeld K. «Two Tall Poppies and the discovery of *Helicobacter Pylori*.» *J Am Coll Surg*, 2012: 214: 237-241.

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chattopadhyay%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15184482" Chattopadhyay S , **HYPERLINK**

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Patra%20R%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15184482" Patra R , **HYPERLINK**

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ramamurthy%20T%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15184482" Ramamurthy T , **HYPERLINK**

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chowdhury%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15184482" Chowdhury A , **HYPERLINK**

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Santra%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15184482" Santra A ,



HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dhali%20GK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15184482" Dhali GK ,

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bhattacharya%20SK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15184482" Bhattacharya SK ,

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Berg%20DE%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15184482" Berg DE ,

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Nair%20GB%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15184482" Nair GB ,

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mukhopadhyay%20AK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15184482"

Mukhopadhyay AK . «Multiplex PCR assay for rapid detection and genotyping of *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens.» *J Clin Microbiol*, 42(6):2821-4.

Correa.p. «*Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis.» *Am J Surg Pathol*, 1995: 1:37-43.

Covacci.A, Censini.S, Bugnoli.M, Petracca.R, Burroni.D, Macchia.G, Massone.A, Papinit.E, Xiang.Z, Figurat.N, Rappuoli.R. «Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer.» *Proc Natl Acad Sci USA* , 1993 : 90:5791-5795.

Cover TL, Blanke SR. «*Helicobacter pylori* VacA, paradigm for toxin multifunctionality.» *Nature Reviews Microbiology*, 2005: 3:320-332.

Cover TL, Blaser MJ. «Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*.» *J. Biol*, 1992: 267:10570–10575.

Dag Ilver, Anna Arnqvist, Johan Ögren, Inga-Maria Frick, Dangeruta Kersulyte, Engin T. Incecik, Douglas E. Berg, Antonello Covacci, Lars Engstrand, Thomas Borén. «*Helicobacter pylori* Adhesin Binding Fucosylated Histo-Blood Group Antigens Revealed by Retagging.» *Science* , 1998: 279(5349):373-377.

de Bernard M, Arico B, Papini E, Rizzuto R, Grandi G, Rappuoli R, Montecucco C. «*Helicobacter pylori* toxin VacA induces vacuole formation by acting in the cell cytosol.» *Mol Microbiol*, 1997: 26(4):665-674.

De Gusmão.VR, Nogueira Mendes.E, De Magalhães Queiroz.DM, Aguiar Rocha.G, Camargos Rocha.AM, Ramadan Ashour.AA, Teles Carvalho.AS. «vacA genotypes in *Helicobacter*



pylori strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil.» *J Clin Microbiol*, 2000: 38(8):2853-2857.

Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefanova-Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, De Wolf-Peeters C, Hagemeyer A, Van den Berghe H, Marynen P. «The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas.» *Blood.*, 1999: 93 (11) :3601-9.

Dong H. Kwon, Kim.JJ, Lee.M, Yamaoka.Y, Kato.M, Osato.MS, El-Zaatari.FAK, David.YG. «Isolation and Characterization of Tetracycline-Resistant Clinical Isolates of *Helicobacter pylori*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2000 : 44(11): 3203–3205.

Dore MP, Leandro G, Realdi G, Sepulveda AR, Graham DY. «Effect of pretreatment antibiotic resistance to metronidazole and clarithromycin on outcome of *Helicobacter pylori* therapy: a meta-analytical approach.» *Dig Dis Sci*, 2000: 45(1):68-76.

Dore MP, Sepulveda AR, El-Zimaity H, Yamaoka Y, Osato MS, Mototsugu K, Nieddu AM, Realdi G, Graham DY. «Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep-implications for transmission to humans.» *Am J Gastroenterol*, 2001: 96(5):1396-1401.

Drumm B, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Sherman PM. «Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection.» *N Engl J Med*, 1990: 63(6):322-359.

Enroth H, Wreiber K, Rigo R, Risberg D, Uribe A, Engstrand L. «In vitro aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, intracellular composition and surface properties.» *Helicobacter*, 1999: 4(1):7-16.

Fischbach LA, van Zanten S, Dickason J. «Meta-analysis: the efficacy, adverse events, and adherence related to first-line anti-*Helicobacter pylori* quadruple therapies.» *Aliment Pharmacol Ther*, 2004: 20(10):1071-1082.

Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Dragosics B, Greiner A, Stolte M. «Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive *Helicobacter pylori* eradication therapy: experience from a large prospective series.» *Gut*, 2004 : 53 (1) :34-37.

Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. «Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pyloricag* pathogenicity island: essential genes for *CagA* translocation in host cells and induction of interleukin-8.» *Mol. Microbiol*, 2001: 42:1337-1348.

Forbes GM, Glaser ME, Cullen DJ, Warren JR, Christiansen KJ, Marshall BJ, Collins BJ. «Duodenal ulcer treated with *Helicobacter pylori* eradication: seven-year follow-up.» *Lancet*, 1994: 343(8892):258-260.



Fox.JG. «Non humains réservoirs de *Helicobacter pylori*.» *Aliment Pharmacol Ther*, 1995: 2:93-103.

Galmishe Antoine, Joachim Rassow, Anne Doye, Sebastien Cagnol, Jean-Claude Chambard, Stephanette Contamin, Virginie de Thillot, Ingo Just, Vittorio Rcci, Enrico Solcia, Ellen Van Obbeghen, Patrice Boquet. «The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release.» *EMBO J*, 2000: 19:6361-6370.

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gangwer%20KA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=17911250" Gangwer KA, HYPERLINK
"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mushrush%20DJ%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=17911250" Mushrush DJ, HYPERLINK
"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Stauff%20DL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=17911250" Stauff DL, HYPERLINK
"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Spiller%20B%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=17911250" Spiller B, HYPERLINK
"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=McClain%20MS%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=17911250" McClain MS, HYPERLINK
"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cover%20TL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=17911250" Cover TL, HYPERLINK
"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lacy%20DB%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=17911250" Lacy DB . «Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007 : 104(41):16293-16298.

Garrity G, Bell M, Lilburn JA. *Helicobacteraceae fam. nov. In : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. New York, NU: Pub. Springer, 2005.

Gatta L, Vakil N, Leandro G, Di Mario F, Vaira D. «Sequential therapy or triple therapy for *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials in adults and children.» *Am J Gastroenterol*, 2009 : 104(12):3069-3079.

Gebert.B, Fischer.W, Weiss.E, Hoffmann.R, Haas.R. «*Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation.» *Science*, 2003: 301(5636):1099-1102.

Geis.G, Suerbaum.S, Forsthoff.B, Leying.B, Opferkuch.W. «Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*.» *J. Med. Microbiol*, 1993: 38:371–377.

Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, Miehlke S, Classen M, Prinz C. «Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999: 96:2778-12783.



- Gerrits.MM, Schuijffel.D, van Zwet.AA, Kuipers.EJ, Vandenbroucke-Grauls.CM, Kusters.JG. «Alterations in Penicillin-Binding Protein 1A Confer Resistance to β -Lactam Antibiotics in *Helicobacter pylori*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2002: 46(7): 2229–2233.
- Gisbert JP, Khorrami S, Calvet X, Gabriel R, Carballo F, Pajares JM. «Meta-analysis: proton pump inhibitors vs. H₂-receptor antagonists--their efficacy with antibiotics in *Helicobacter pylori* eradication.» *Aliment Pharmacol Ther*, 2003 : 18(8):757-766.
- Goodman KJ, Correa P, Tenganá Aux HJ, Ramirez H, DeLany JP, Pepinosa OG, Quiñones ML, Parra TC. «*Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways.» *Am J Epidemiol*, 1996: 144 (3): 290-299.
- Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T. «Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. and *Helicobacter pylori* comb. nov., as *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively.» *Int J System Bacteriol* 1989; 39: 397-405, 1989: 39: 397-405.
- Gormally SM, Kierce BM, Daly LE, Bourke B, Carroll R, Durnin MT, Drumm B. «Gastric metaplasia and duodenal ulcer disease in children infected by *Helicobacter pylori*.» *Gut*, 1996: 38 : 513-517.
- Graham DY, Opekun AR, Osato MS, El-Zimaity HM, Lee CK, Yamaoka Y, Qureshi WA, Cadoz M, Monath TP. «Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers.» *Gut*, 2004: 53(9):1235-1243.
- Graham.DY. «Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy.» *Gastroenterology*, 1998 : 115(5):1272-1277.
- Graham.DY, Lu.H, Yamaoka.Y. «A report card to grade *Helicobacter pylori* therapy.» *Helicobacter*, 2007: 12(4):275-278.
- Groisman E A, Sturmoski M A, Solomon F R, Lin R, Ochman H. «Molecular, functional, and evolutionary analysis of sequences specific to *Salmonella*.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993: 90(3): 1033–1037.
- Halitim F, Vincent P, Michaud L, Kalach N, Guimber D, Boman F, Turck D, Gottrand F. «High rate of *Helicobacter pylori* reinfection in children and adolescents.» *Helicobacter*, 2006: 11(3):168-172.
- Handt LK, Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Yan LL, Rozmiarek H, Rufo R, Stalis IH. «*Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications.» *Infect Immun*, 1994: 62(6):2367-2374.



- Hardo PG, Tugnait A, Hassan F, Lynch DA, West AP, Mapstone NP, Quirke P, Chalmers DM, Kowolik MJ, Axon AT. «*Helicobacter pylori* infection and dental care.» *Gut*, 1995; 37(1): 44-46.
- Hatakeyama M, Higashi H. «*Helicobacter pylori*CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis.» *Cancer Sci*, 2005; 96(12):835-843.
- Hazell SL, Evans Jr DJ, Graham DY. «*Helicobacter pylori* catalase.» *J Gen Microbiol*, 1991: 137:57-61.
- Hessey.SJ, Spencer.J, Wyatt.JI, Sobala.G, Rathbone.BJ, Axon.AT, Dixon.FM. «Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis.» *Gut*, 1990 : 31(2): 134-138.
- Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M. «SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori*CagA protein.» *Science*, 2002; 295(5555):683-686.
- Huang.J, Hunt.RH. «The importance of clarithromycin dose in the management of *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis of triple therapies with a proton pump inhibitor, clarithromycin and amoxicillin or metronidazole.» *Aliment Pharmacol Ther*, 1999 : 13(6):719-729.
- Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, Evans DG, Engstrand L, Graham DY, El-Zaatari FA. «*Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru.» *Gastroenterology*, 1996; 110(4):1031-1035.
- Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick JM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Boren T. «*Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging.» *Science*, 1998; 279:373-377.
- Isomoto H, Moss J, Hirayama T. «Pleiotropic actions of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA.» *Tohoku J Exp Med*, 2010; 220:3-14.
- Karen KJ, Correa P, Heraldo J, Tenganá HJA, Hemán R, James PD, Oscar GP, Mercedes LQ, Tito CP. «*Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways.» *Am J Epidemiol*, 1996; 144: 290-299.
- Kimura.M, S.Goto, A.Wada, K.Yahiro, T.Niidome, T.Hatakeyama, H.Aoyagi, T.Hirayama, T.Kondo. «Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells.» *Microb Pathog*, 1999; 26(1):45-52.



- Koichi Seto, Yu Hayashi-Kuwabara, Tomoyuki Yoneta, Hiroshi Suda, Hajime Tamaki. «Vacuolation induced by cytotoxin from *Helicobacter pylori* is mediated by the EGF receptor in HeLa cells.» *FEBS Letters*, 1998: 431:347-350.
- Kuipers EJ, JC Thijs, HP Festen. «the prevalence of *helicobacter pylori* in peptic ulcer disease.» *Aliment Pharmacol Ther*, 1995: 2:59-69.
- Kusters JG, Gerrits MM, VanStrijp JAG, Vandenbroucke-Grauls CMJE. «Cocoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death.» *Infect. Immun*, 1997: 65:3672-3679.
- Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. «Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection.» *Clin Microbiol Rev*, 2006: 19(3): 449–490.
- Lauren.P. «The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma.» *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1965: 64:31-49.
- Lessl M, Lanka E. «Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells.» *Cell*, 1994 : 77(3):321-4.
- Leunk.RD, Johnson.PT, David.BC, Kraft.WG, Morgan.DR. «Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*.» *J Med Microbiol* , 1988 : 26 : 93-9.
- Leying.H, Suerbaum.S, Geis.G, Hass.R. «Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene.» *Mol. Microbiol*, 1992: 6:2863–2874.
- Li J, Ochman H, Groisman E A, Boyd E F, Solomon F, Nelson K, Selander R K. «Relationship between evolutionary rate and cellular location among the Inv/Spa invasion proteins of *Salmonella enterica*.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995: 92(16): 7252–7256.
- Loeb.M, Jayaratne.P, Jones.N, Sihoe.A, Sherman.P. «Lack of correlation between vacuolating cytotoxin activity, *cagA* gene in *Helicobacter pylori*, and peptic ulcer disease in children.» *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1998 : 17(9):653-656.
- 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(10):4954-4966.
- Lupetti P, Heuser JE, Manetti R, Lanzavecchia S, Bellon PS, R Dallai, R Rappuoli, JL Telford. «Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin.» *J. Cell Biol*, 1996: 133:801–807.
- Magistà AM, Ierardi E, Castellaneta S, Miniello VL, Lionetti E, Francavilla A, Ros P, Rigillo N, Di Leo A, Francavilla R. «*Helicobacter pylori* status and symptom assessment two years after



eradication in pediatric patients from a high prevalence area.» *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2005: 40(3):312-318.

Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadström T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois D, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarström L. «*Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation.» *Science*, 2002: 297(5581):573-578.

Maier RJ, C Fu, J Gilbert, F Moshiri, J Olson, AG Plaut. «Hydrogen uptake hydrogenase in *Helicobacter pylori*.» *FEMS Microbiol Lett*, 1996: 141:71-76.

Malaty HM, Graham DY, Klein PD, Evans DG, Adam E, Evans DJ. «Transmission of *Helicobacter pylori* infection. Studies in families of healthy individuals.» *Scand J Gastroenterol*, 1991: 26(9):927-32.

Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. «Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report.» *Gu*, 2007: 56(6):772-781.

Marshall BJ, Barret L, Prakash C, Mc Callum R, Guerrant R. « Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid.» *Gastroenterology*, 1990: 99:269-276.

Marshall BJ, Royce H, Anear DI, Goodwin CS, Pearman JW, Warren JR, Armstrong JA. «Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa.» *Microbios Lett*, 1984: 25:83-88.

Marshall BJ, Warren JR. «Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of Patients with Gastritis and Peptic Ulceration.» *Lancet Ltd*, 1984: 1(5):1311-1315.

Mégraud F, Bonnet F, Garnier M, Lamouliatte H. «Characterization of *Campylobacter pyloridis* by culture, enzymatic profile, and protein content.» *J Clin Microbiol*, 1985: 22:1007-1010.

Megraud.F. «*H pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing.» *Gut*, 2004: 53:1374-1384.

Mégraud.F. «Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route.» *Aliment Pharmacol Ther*, 1995: 2:85-91.

Mitchell HM, Hu P, Chi Y, Chen MH, Li YY, Hazell SL. «A low rate of reinfection following effective therapy against *Helicobacter pylori* in a developing nation (China).» *Gastroenterology*, 1998: 114(2):256-261.



Mobley.HL, Island.MD, Hausinger.RP. «Molecular biology of microbial ureases.» *Microbiol Rev*, 1995: 59:451-480.

Molinari.M, Salio.M, Galli.C, Norais.N, Rappuoli.R, LanzavecchiaA, C.Montecucco. «Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA.» *J Exp Med*, 1998: 187(1):135-140.

Moran.AP. «Structure-bioactivity relationships of bacterial endotoxins.» *Toxin Rev*, 1995: 14:47-83.

Moran.AP. «The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis.» *Aliment Pharmacol Ther*, 1996 : 10(1):39-50.

Moran.MP. «Cell surface characteristics of *Helicobacter pylori*.» *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1995 : 10(3-4):271-280.

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Morbiato%20L%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=11728476" Morbiato L , HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tombola%20F%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=11728476" Tombola F , HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Campello%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=11728476" Campello S , HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Del%20Giudice%20G%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=11728476" Del Giudice G , HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rappuoli%20R%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=11728476" Rappuoli R , HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zoratti%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=11728476" Zoratti M , HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Papini%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=11728476" Papini E . «Vacuolation induced by VacA toxin of *Helicobacter pylori* requires the intracellular accumulation of membrane permeant bases, Cl(-) and water. »

HYPERLINK "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728476>" \o "FEBS letters." *FEBS Lett.* 2001 Nov 23;508(3):479-83.

Moss.SF. «Review article: Cellular markers in the gastric precancerous process.» *Aliment Pharmacol Ther*, 1998 : 1:91-109.

Murata-Kamiya.N, Kurashima.Y, Teishikata.Y, Yamahashi.Y, Saito.Y, H.Higashi, H.Aburatani, T.Akiyama, RM Jr.Peeck, T.Azuma, M.Hatakeyama. «*Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells.» *Oncogene*, 2007: 26(32):4617-4626.



- Najafi M, Sobhani M, Khodadad A, Farahmand F, Motamed F. «Reinfection Rate after Successful *Helicobacter pylori* Eradication in Children.» *Iran J Pediatr*, 2010; 20(1):58-62.
- Nardone.G. «Review article: molecular basis of gastric carcinogenesis.» *Aliment Pharmacol Ther*, 2003; 2:75-81.
- Olsen GY, Woese CR, Overbeek R. «The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology.» *J Bacteriol* , 1994: 176: 1-6.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. «Global cancer statistics, 2002.» *CA Cancer J Clin*, 2005: 55(2): 74-108.
- Peek RM, SA.Thompson, JP.Donahue, KT.Tham, JC.Atherton, MJ.Blaser, GG.Miller. «Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome.» *Proc Amer Assoc Phys* , 1998: 110:531-544.
- Perez-Perez GI, Taylor DN, Bodhidatta.L, Wongsrichanalai.J, Baze.WB, Dunn.BE, Echeverria.PD, Blaser.MJ. «Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infections in Thailand.» *J Infect Dis*, 1990 : 41(6):161-1237.
- Perry S, de la Luz MS, Yang S, Haggerty TM, Hurst P, Perez-Perez G, Parsonnet J. «Gastroenteritis and Transmission of *Helicobacter pylori* Infection in Households.» *Emerg Infect Dis*, 2006: 12(11): 1701–1708.
- Pesci EC, Pickett CL. «Genetic organization and enzymatic activity of a superoxide dismutase from the microaerophilic human pathogen.» *Helicobacter pylori. Gene*, 1994: 143:111-116.
- Queralt N, Bartolomé R, Araujo R. «Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain.» *J Appl Microbiol*, 2005: 98(4):889-95.
- Rejane Mattar, Sergio Barbosa Marques, Maria do Socorro Monteiro, Anibal Ferreira dos Santos, Kiyoshi Iriya and Flair Jose´ Carrilho. «*Helicobacter pylori* pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil.» *Journal of Medical Microbiology*, 2007: 56: 9–14
- Reyrat JM, Lanzavecchia S, Lupetti P, de Bernard M, C. Pagliaccia, V. Pelicic, M. Charrel, C. Ulivieri, N. Norais, X. Ji, V. Cabiaux, E. Papini, R. Rappuoli, J.L. Telford. «3D imaging of the 58 kDa cell binding subunit of the *Helicobacter pylori* cytotoxin.» *J. Mol. Biol.*, 1999: 290:459–470.
- Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, Atherton JC. «A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer.» *Gastroenterology*, 2007: 133(3):926-936.



- Rietschel.ET, Kirikae.T, Schade.FU, Mamat.U, Schmidt.G, Loppnow.H, Ulmer.AJ, Za`hringer.U, Seydel.U, Di Padova.F, Schreier.M, Brade.H. «Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function.» *FASEB J*, 1994: 8:217–225.
- Rohde M, Puls J, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R. «A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pyloricag* type IV secretion system.» *Mol. Microbiol*, 2003: 49:219-234.
- Rudi.J, Rudy.A, Maiwald.M, Kuck.D, Sieg.A, Stremmel.W. «Direct determination of *Helicobacter pylori* vacA genotypes and cagA gene in gastric biopsies and relationship to gastrointestinal diseases.» *Am J Gastroenterol*, 1999: 94(6):1525-1531.
- Saadat.I, Higashi.H, Obuse.C, Umeda.M, Murata-Kamiya.N, Saito.Y, H.Lu, N.Ohnishi, T.Azuma, A.Suzuki, S.Ohno, M.Hatakeyama. «*Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity.» *Nature*, 2007: 447(7142):330-333.
- Sakamoto.S, Watanabe.T, Tokumaru.T, Takagi.H, Nakazato.H, Lloyd.KO. «Expression of Lewisa, Lewisb, Lewisx, Lewisy, siayl-Lewisa, and sialyl-Lewisx blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue.» *Cancer Res*, 1989 : 49(3):745-752.
- Sander JO, Zanten VV, Dixon MF, Lee A. «The gastric transitional zones: neglected links between gastroduodenal pathology and *Helicobacter* ecology.» *Gastroenterology*, 1999: 116:1217–1229.
- Schade.C, Flemstrom.G, Holm.L. «Hydrogen ion concentration in the mucus layer on top of acid-stimulated and -inhibited rat gastric mucosa.» *Gastroenterology*, 1994: 107:180–188.
- Schmidt HM, Andres S, Kaakoush NO, Engstrand L, Eriksson L, Goh KL, Fock FM, Hilmi I, Dhamodaran S, Forman D, Mitchell H. «The prevalence of the duodenal ulcer promoting gene (dupA) in *Helicobacter pylori* isolates varies by ethnic group and is not universally associated with disease development: a case-control study.» *Gut Pathog*, 2009: 1(1):5. doi: 10.1186/1757-4749-1-5.
- Schmitt W, Haas R. «Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein.» *Mol. Microbiol*, 1994: 12:307–319.
- Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling HO, Josenhans C, Suerbaum S. «The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004: 101(14):5024-5029.
- Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. «Altered states: Involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999: 96(25): 14559–14564.



- Sewald X, Gebert-Vogl B, Prassl S, Barwig I, Weiss E, Fabbri M, Osicka R, M.Schiemann, DH.Busch, M.Semmrich, B.Holzmann, P.Sebo, R.Haas. «Integrin subunit CD18 Is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin.» *Cell Host Microbe*, 2008: 3:20-29.
- Sheu BS, Odenbreit S, Hung KH, Liu CP, Sheu SM, Yang H, Wu JJ. «Interaction between host gastric sialyl-Lewis X and *H. pylori* SabA enhances *H. pylori* density in patients lacking gastric Lewis B antigen.» *Am J Gastroenterol*, 2006: 101:36-44.
- Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A. «c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs.» *Mol Microbiol*, 2002: 43(4):971-80.
- Stingl.K, Altendorf.K, Bakker.EP. «Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis?» *Trends Microbiol*, 2002: 10:70–74.
- Suerbaum S, Michetti P. «*Helicobacter pylori* infections.» *N Engl J Med*, 2002: 347 : 1175- 1186.
- Suerbaum.S, Josenhans.C, Labigne.A. «Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange.» *J. Bacteriol*, 1993: 175:3278–3288.
- Sundrud.MS, Torres.VJ, Unutmaz.D, Cover.TL. «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 U S A*, 2004: 101(20):7727-7732.
- Suneesh KP, Anish K, Prakash Z, Joseph M. «Analysis of CagA, VacA and IceA genotypes of colonized *Helicobacter pylori* and Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) gene polymorphism among dyspepsia patients.» *Journal of Medicine and Medical Sciences* , 2011: 2:1060 -1066.
- Supajatura V, Ushio H, Wada A, Yahiro K, Okumura K, Ogawa H, Hirayama T, Ra C. «Cutting edge: VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines.» *J Immunol*, 2002: 168(6):2603-2607.
- Tahara.E. «Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. The application to molecular diagnosis.» *Cancer*, 1995: 75:1410-1417.
- Talarico.S, Gold.BD, Fero.J, Thompson.DT, Guarner.J, Czinn.S, Salama.NR. «Pediatric *Helicobacter pylori* isolates display distinct gene coding capacities and virulence gene marker profiles.» *J Clin Microbiol*, 2009: 47(6):1680-1688.



- Tammer.I, Brandt.S, Hartig.R, König.W, Backert.S. «Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering.» *Gastroenterology*, 2007 : 132(4):1309-1319.
- Tanaka J, Suzuki T, Mimuro H, Sasakawa C. «Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus.» *Cell. Microbiol*, 2003: 5:395-404.
- Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli M, Tecce MF, Censini S, Covacci A, Xiang Z, Papini E, Montecucco C, Parente L, Rappuoli R. «Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease.» *J. Exp. Med*, 1994: 179:1653–1658.
- Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT. «Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces.» *Lancet*, 1992: 340(8829):1194-1195.
- Torres J, Pérez-Pérez G, Goodman KJ, Atherton JC, Gold BD, Harris PR, la Garza AM, Guarner N, Muñoz O. «A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children.» *Arch Med Res*, 2000: 31(5):431-469.
- Torres.VJ, VanCompernelle.SE, Sundrud.MS, Unutmaz.D, Cover.TL. «*Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits activation-induced proliferation of human T and B lymphocyte subsets.» *J Immunol*, 2007: 179(8):5433-5440.
- Tsuda.M, Karita.M, Morshed.MG, Okita.K, Nakazawa.T. «A Urease-Negative Mutant of *Helicobacter pylori* Constructed by Allelic Exchange Mutagenesis Lacks the Ability To Colonize the Nude Mouse Stomach.» *Infect Immun*, 1994 : 62(8): 3586–3589.
- Tummuru.MK, Cover.TL, Blaser.MJ. «Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori* : evidence of linkage to cytotoxin production.» *Infect Immun* , 1993 : 61 : 1799-1809.
- Tytgat.GN. «Endoscopic transmission of *Helicobacter pylori*.» *Aliment Pharmacol Ther*, 1995: 2:105-110.
- Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergstrom J, Boren T, Danielsson D, Teneberg S. «The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils.» *J Biol Chem*, 2005: 280, 15390-15397.
- Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM. «Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma.» *Mol Cell*, 2000: 6(4):961-967.



- Van der Hulst RWM, Verheul SB, Weel JFL, Gerrits Y, Tenkate FJW, Dankert J, Tytgat GNJ. «Effect of specimen collection techniques, transport media, and incubation of cultures on the detection rate of *Helicobacter pylori*.» *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1996: 15:211-215.
- van der Wouden EJ, Thijs JC, van Zwet AA, Sluiter WJ, Kleibeuker JH. «The influence of in vitro nitroimidazole resistance on the efficacy of nitroimidazole-containing anti-*Helicobacter pylori* regimens: a meta-analysis.» *Am J Gastroenterol*, 1999 : 94(7):1751-1759.
- van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Pena AS, Midolo P, Ng EK, Atherton JC, Blaser MJ, Quint W. «Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*.» *J Clin Microbiol* , 1998: 36:2597-2603.
- van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer WA, Quint W. «Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*.» *Gastroenterology*, 1998: 115:58-66.
- Varis K, Taylor PR, Sipponen P, Samloff IM, Heinonen OP, Albanes D, Härkönen M, Huttunen JK, Laxén F, Virtamo J. «Gastric cancer and premalignant lesions in atrophic gastritis: a controlled trial on the effect of supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene. The Helsinki Gastritis Study Group.» *Scand J Gastroenterol*, 1998: 33(3):294-300.
- Ward JE, Akiyoshi DE, Regier D, Datta A, Gordon MP, Nester EW. «Characterization of the *virB* operon from an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid.» *J Biol Chem*, 1988 : 263(12):5804-14.
- Wewer V, Kalach N. «*Helicobacter pylori* infection in pediatrics.» *Helicobacter* , 2003: 8(1):61-67.
- Willhite DC, TL.Cover, SR.Blanke. «Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome c release are independent outcomes of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation.» *J Biol Chem*, 2003: 278(48):48204-48209.
- Willhite D, Blank SR. «*Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity.» *Cell Microbiol*, 2004: 6:143-154.
- Winans SC, Burns DL, Christie PJ. «Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules.» *Trends Microbiol*, 1996 : 4(2):64-8.
- Xia.Y, Yamaoka.Y, Zhu.Q, Matha.I, Gao.X. «A comprehensive sequence and disease correlation analyses for the C-terminal region of CagA protein of *Helicobacter pylori*.» *PLoS ONE*, 2009: 4(11): e7736.



- Xiang.Z, Censini.S, Bayeli.PF, Telford.JL, Figura.N, Rappuoli.R, Covacci.A. «Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin.» *Infect Immun*, 1995 : 63(1): 94–98.
- 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 production.» *Gastroenterology*, 2002: 123(2):414-424.
- Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. «A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000: 97(13):7533-7538.
- Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O, El-Zimaity EM, Reddy R, Arnqvist R, Graham DY. «*Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease.» *Gut*, 2006: 55(6):775-781.
- Yordanov D, Boyanova L, Markovska R, Gergova G, Mitov I. «Significance of *Helicobacter pylori* vacA intermediate region genotyping-a Bulgarian study.» *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012: 74(3):253-257.
- Zheng PY, Jones NL. «*Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein.» *Cell Microbiol*, 2003: 5:25-40.
- Zhou.Y, Huang.Y, Shao.CH, Wang.XH, Zhang.BF. «cagA,vacA and iceA genotypes of *Helicobacter pylori* isolated from children in Shanghai.» *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2012: 12(4):267-271.
- Zivar S, Farhad M, Sheiyda A, Elham T. «Prevalence of vacA and cagA Genotypes of *Helicobacter pylori* in Iranian Children with Peptic Ulcer Disease.» *World Applied Sciences Journal* , 2011: 12 (6): 840-844.
- Zullo A, De Francesco V, Hassan C, Morini S, Vaira D. «The sequential therapy regimen for *Helicobacter pylori* eradication: a pooled-data analysis.» *Gut*, 2007: 56(10):1353-1357.



Annexe

1. Le tampon TBE

Le TBE est un tampon de migration utilisé en électrophorèse. La composition de ce tampon pour une concentration de 10X est:

Tris base	—————>	108g/L
Acide borique	—————>	55g/L
EDTA	—————>	9,3g/L

Le pH du tampon est mesuré par un pH mètre, et ajusté à un pH 8, avec du HCl et du NaOH. Ensuite le TBE préparé est stérilisé et dilué à une concentration 1X (100ml du tampon 10X dans 900ml de l'eau distillée stérile).

2. Le tampon PBS

Le tampon PBS sert surtout à rincer les cellules et à les conservés. La composition du tampon PBS à une concentration 10X est:

KCl	—————>	2g/L
NaCl	—————>	80g/L
Na ₂ HPO ₄	—————>	14,4g/L
KH ₂ PO ₄	—————>	2,4g/L

Après la préparation du tampon, il est ensuite stérilisé et dilué à une concentration de 1X.

3. La solution de lyse

Le rôle de chacun des réactifs de la solution dans la lyse cellulaire est :

- Le Tris HCl joue le rôle d'un tampon.
- Triton (X100) est utilisé pour perméabiliser les membranes cytoplasmiques et nucléaires.
- La protéinase K permet de digérer les cellules et d'extraire les acides nucléiques (ADN ou ARN).
- Tris HCl :

Pour 1L de Tris HCl, 157,64 g de Tris (1M) est dissoute dans 1L d'eau distillée stérile.

4. Les réactifs de la PCR

Le rôle de chacun des réactifs de la solution dans la lyse cellulaire est :

- l'ADN à amplifier, qui sert comme un ADN matrice
- Les oligonucléotides (ou amorces), spécifiques du segment d'ADN voulu, pour s'hybrider aux séquences complémentaires sur les brins opposés de l'ADN matrice flanquant la région cible
- l'ADN polymérase (ici la Taq polymérase), qui intervient dans la réplication d'ADN
- Le tampon, pour maintenir le pH stable



- $MgCl_2$, qui donne un pH et une concentration saline optimale au bon fonctionnement des amorces et de la Taq polymérase.
- mélange des quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN
- l'eau distillée, utilisé dans la réaction comme catalyseur

5. Le bromure d'éthidium

Le bromure d'éthidium est un agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN.

Le bromure d'éthidium est un produit dangereux, qui doit être manipulé avec précautions. Les résidus doivent être éliminés comme un déchet dangereux. Le bromure d'éthidium ayant la faculté de se lier à l'ADN, il possède un effet mutagène important, et pourrait être également cancérigène et tératogène

6. Le tampon de charge

Préparation du tampon de charge

- 2,5 mg de Bleu de bromophénol
- 300 μ l de glycérol
- 700 μ l d'eau distillée stérile

Utilisation du tampon de charge

Le bleu de bromophénol est utilisé comme marqueur coloré afin de vérifier le bon déroulement d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou d'une électrophorèse en gel d'agarose.

Le bleu de bromophénol est légèrement chargé négativement à un pH modéré : il migre alors dans la même direction que de l'ADN ou des protéines sur le gel. La distance de migration varie en fonction de la densité du gel et de la composition du tampon, mais



dans les conditions typiques d'utilisation (gel d'agarose à 1 % dans un tampon TBE), le bleu de bromophénol migre à la même distance qu'un fragment d'ADN d'environ 500 paires de bases.

7. Stérilisation du matériel

La stérilisation du matériel s'effectue à l'aide d'un autoclave, qui utilise la vapeur d'eau comme un agent stérilisant. La température dans l'autoclave augmente jusqu'à 120°C, ainsi la chaleur associée à l'humidité provoque la destruction des germes en réalisant une dénaturation protéique.

Les matériaux stérilisés sont : l'eau distillée, le PBS, le TBE, les connes de la micropipette, les tubes eppendorf et les tubes de PCR.