



Année 2016



جامعة محمد الخامس بالرباط

N° de thèse : 16/16 CSVS

UNIVERSITÉ MOHAMED V SOUISSI
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE RABAT

CENTRE DES ÉTUDES DOCTORALES SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

FORMATION DOCTORALE : BIOLOGIE MÉDICALE, PATHOLOGIE HUMAINE ET
EXPÉRIMENTALE ET ENVIRONNEMENT

**Épidémiologie et résistance d'*Helicobacter pylori* aux antibiotiques
dans une population marocaine : étude phénotypique et
génotypique**

Thèse de Doctorat

Présentée et soutenue publiquement le : 25 Juillet 2017

PAR

Mme BOUIHAT Najat

MOTS CLÉS: *Helicobacter pylori*, Prévalence, Résistance, Antibiotique, Sérodiagnostic

JURY

PES. BENKIRANE Ahmed

Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat

PES. BENOUDA Amina

Université Abulcasis des Sciences de la Santé, Rabat

PES. EL OUENASS Mostapha

Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat

PES. MAHMOUD Mustapha

Faculté de médecine et de pharmacie de Fès

PES. IBRAHIMI Azeddine

Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat

PES. KABBAJ Hakima

Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat

Président

Directeurs de thèse

Rapporteurs

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَاصْبِرْ لِحُكْمِ رَبِّكَ فَإِنَّكَ بِأَعْيُنِنَا^ص وَسَبِّحْ بِحَمْدِ رَبِّكَ حِينَ تَقُومُ
(48) وَمِنَ اللَّيْلِ فَسَبِّحْهُ وَإِدْبَارَ النُّجُومِ (49)

الطور الآية 48 و 49

وقال تعالى:

سَنُرِيهِمْ آيَاتِنَا فِي الْآفَاقِ وَفِي أَنفُسِهِمْ حَتَّىٰ يَتَّبِعِنَ لَهُمْ أَنَّهُ الْحَقُّ

فصلت الآية 53

صدق الله العظيم

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ , وَالْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ وَالصَّلَاةُ وَالسَّلَامُ عَلَى سَيِّدِنَا مُحَمَّدٍ الصَّادِقِ الْوَعْدِ الْأَمِينِ , اللَّهُمَّ أَعْظِنَا وَلَا تَحْرِمْنَا , وَ أَكْرِمْنَا وَلَا تَهِنَّا , وَأَثِرْنَا وَلَا تَوَثِّرْ عَلَيْنَا , وَ أَرْضِنَا وَارْضَ عَنَّا , وَ صَلِّ اللَّهُمَّ عَلَى سَيِّدِنَا مُحَمَّدٍ النَّبِيِّ الْأَمِيِّ وَعَلَى آلِهِ وَ صَحْبِهِ أَجْمَعِينَ

أَمِينَ يَا رَبَّ الْعَالَمِينَ



A

Mes très chers parents

Houcine BOUIHAT et Fatima NAIMI

*Vous êtes pour moi source de joie et de réconfort.
Vos prières n'ont jamais cessé et si je suis à cette étape de la vie
c'est*

*grâce à vos encouragements et vos paroles de soutien.
Pour mon éducation vous avez fait beaucoup de sacrifices, pour
mon
bonheur vous ne vous êtes pas épargnés.*

*Les mots seuls ne pourraient exprimer tout mon amour ni mon
estime pour vous.*

Ce travail est le vôtre

A

la mémoire de ma grand-mère

Elle m'a toujours poussé et motivé dans mes études.

*J'espère que, du monde qui est sien maintenant,
elle apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance*

de la part d'une fille

qui a toujours prié pour le salut de son âme

Puisse dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde

A

mon très cher mari

Abdelali JERRAF

*Quand je t'ai connu, j'ai trouvé l'homme de ma vie,
Monâme sœur et la lumière de mon chemin.*

*Ma vie à tes côtés est remplie de belle surprises,
tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse
sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir
mes études.*

*Sans toi, tes conseils et tes encouragements,
ce travail n'aurait vu le jour.*

*Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein
et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et
de mon amour sincère et fidèle*

*Nulle dédicace ne pourrait exprimer mes sentiments et mon
profond attachement*

A

mes chers petits

Mohammed Amine, Nour, Ihsane

Aucune dédicace

ne serait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous,

votre joie et votre gaieté me combent de bonheur

*puisse dieu vous garder, éclairer votre chemin
et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers*

*Vous êtes ma source d'inspiration et mon plus grand
soutien*

A

*Mon frère Yassine
et mes sœurs Ghizlaine, Zineb , et Nadia*

*La fraternité est un faible mot pour décrire ce qui nous
unis.*

Nous avons partagé de très bons moments.

Nos éclats de rire et nos disputes sont le soleil de ma vie.

*Vous êtes ce merveilleux cadeau de notre Dieu
et je vous souhaite beaucoup de bénédictions.*

A

mes très chers amis

Je n'ose imaginer ma vie si vous n'aviez pas été là.

*Vous m'avez toujours témoigné affection, gentillesse et
patience.*

*Je vous dédie cette thèse et vous souhaite une longue et
heureuse vie.*

A

*tous ceux qui me sont chers
et que j'ai omis de citer.*

A

*tous ceux qui ont participé de près ou de loin à
l'élaboration de ce travail*

Je peux vous garantir une infinie reconnaissance



A

Notre maître et président du jury

Monsieur Ahmed BENKIRANE

Professeur de Gastroentérologie

*C'est un immense honneur et un privilège de vous avoir
comme
président de jury pour juger notre modeste travail.*

*Vos compétences scientifiques et surtout vos qualités
humaines
ont suscité en nous une profonde admiration.*

*Veillez trouver ici, l'expression sincère de notre respect
et
l'attestation de notre profonde considération.*

A
Mes maîtres

Madame Amina BENOUDA
ET
Monsieur Mostapha el OUENNASS
Professeurs en Microbiologie

*Nous vous remercions pour l'honneur
que vous nous avez fait en dirigeant ce travail.*

*Sans vos corrections et vos conseils
minutieux, ce travail n'aurait pu aboutir.*

*Vous nous avez toujours réservé un bon accueil
malgré vos obligations professionnelles.*

*Votre amabilité, votre sérieux,
votre compétence, et surtout vos qualités humaines et
professionnelles
nous inspirent une très grande admiration
et un profond respect.*

*Puisse ce travail être le témoignage de l'expression de nos
sincères remerciements et notre gratitude respectueuse*

A

Notre maître

Monsieur Christophe BURUCOA
Professeur de Bactériologie

*Vous nous avez fait l'honneur d'avoir participer à
l'élaboration de ce travail*

*Nous vous somme très reconnaissant pour l'aide précieuse
que vous nous avez apporté*

*Vous nous avez toujours accueillis avec sympathie et
modestie*

*Votre gentillesse extrême, votre compétence pratique,
vos qualités humaines et professionnelles,
ainsi que votre compréhension,*

*nous inspire une grande admiration et un profond respect,
sont pour nous le meilleur exemple*

*Veillez trouver ici l'expression de notre haute
considération et notre profond respect.*

A

Notre maître

Monsieur Mostapha MAHMOUD

Professeur en microbiologie

*Nous vous remercions pour la simplicité
que vous avez témoignée en acceptant de siéger parmi notre
jury de thèse*

*Vous nous avez reçu avec beaucoup d'amabilité,
nous vous en sommes reconnaissantes.
En acceptant de juger ce travail, vous nous accordez un
très grand honneur*

*Veillez trouver dans ce travail, l'expression de notre
gratitude et de notre grande estime.*

A

Notre maître

Monsieur Azeddine EL IBRAHIMI
Professeur en Biothechnologie

Nous sommes très heureux de l'honneur que vous nous faites en acceptant de faire partie de notre jury de thèse et pour avoir voulu examiner notre travail

votre présence est pour nous, l'occasion de vous exprimer notre admiration de votre compétence professionnelles et votre généreuse sympathie

Veillez trouver dans ce présent travail nos remerciements sincères.

A

Notre maître

Madame Hakima KABBAJ
Professeur en microbiologie

*Nous vous remercions pour la simplicité
que vous avez témoignée en acceptant de siéger parmi notre
jury de thèse*

*Vous nous avez reçu avec beaucoup d'amabilité,
nous vous en sommes reconnaissantes.
En acceptant de juger ce travail, vous nous accordez un
très grand honneur*

*Veillez trouver dans ce travail, l'expression de notre
gratitude et de notre grande estime.*

A

Notre maître

*Madame Nezha MOUANE
Professeur de Gastroentérologie*

Nous vous remercions tout particulièrement pour l'aide précieuse que vous nous avez apportée dans l'élaboration de ce travail.

Vous nous avez reçu avec beaucoup d'amabilité ; nous en avons été très touchés.

Veillez accepter l'expression de nos considérations les plus distinguées.

A

*Monsieur AMINE CHEIKH
Docteur en pharmacie*

Nous vous remercions tout particulièrement

Pour

*votre effort, votre aide précieuse et votre
disponibilité continue lors de la correction de
notre travail
et pour nous avoir aidé dans l'analyse statistique*

*Soyez assuré de notre reconnaissance, notre gratitude et
notre profond respect*

A

Tout le personnel de l'Hôpital Militaire de Rabat, l'Hôpital cheikh zaid, l'Hôpital d'enfant de Rabat, L'hôpital des spécialités de Rabat, EA 331 LITEC et Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, CHU de Poitiers, France, exerçant dans ses différents services et unités

Vous nous avez toujours réservé un bon accueil malgré vos obligations professionnelles

Nous sommes très heureuse de pouvoir exprimer notre profonde gratitude pour tous les efforts que vous avez déployés et l'oreille attentive que vous nous avez accordée afin que ce travail puisse aboutir

Veillez recevoir l'expression de notre reconnaissance et de notre respect

A

Notre directeur du Centre d'études doctorales

Monsieur TAOUFIK Jamal

Pour avoir été toujours à l'écoute de nos problèmes et en action pour rendre notre durée de thèse plus enrichissante, plus apaisante et plus fructueuse.

Merci

Tous les professeurs

*de la faculté de médecine
et de pharmacie de Rabat et ceux de
l'université Mohamed V Souissi qui ont
contribué à notre formation*

Liste des abréviations

ADN : Acide Dexosyribo-Nucleique

ARNr :Acide rubonucleique ribosomal

AINS : Anti Inflammatoire Non Stéroïdien

ATB : Antibiotique

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

C13 : Carbone marqué 13

CO2 : Dioxyde de carbone

Clo-test: Campylobacter like organism test

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CagA : Cytotoxin Associated Gene A

Dup A: Duodenal Ulcer promoting gene

Dhrs : Dirhams

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

E-test: Epsilometer-test

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FOGD : Fibroscopie oesogastroduodénale

Fla A : Flagelline majeur A

Fla B : Flagelline minneure B

H.Pylori: *Helicobacter Pylori*

IPP : Inhibiteur de la Pompe à Proton

IL8 : interleukine 8

MALT: Mucosa Associated Lymphoid Tissue

OipA: Outer inflammatory protein A

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

O2 : Oxygène

pH : force d'Hydrogène

PCR : Polymerase chain reaction

TRU : Test rapide à l'uréase

VacA: Vacuolatingcytotoxin A

Liste des figures :

Figure 1 : <i>Helicobacter pylori</i>	36
Figure 2 : Passage d'une forme spiralée à une forme coccoïde en cas de culture prolongée..	37
Figure 3 : Aspect de <i>Helicobacter pylori</i> après coloration de Gram.....	38
Figure 4 : Prévalence de l'infection à <i>H pylori</i> dans le monde.....	43
Figure 5 : Représentation schématique du rôle du système de sécrétion type IV dans les changements morphologiques, prolifération cellulaire et l'immunomodulation au cours de l'infection à <i>H. pylori</i>	50
Figure 6 : Différentes actions cellulaires de VacA au cours de l'infection chronique avec <i>H. pylori</i>	52
Figure 7: Déterminisme pathologique lié à <i>H. pylori</i>	59
Figure 8 : Résistance aux antibiotiques dans le monde.....	75
Figure 9: Frottis colorés par Giemsa.....	86
Figure 10: Aspect de colonies d' <i>H.pylori</i> sur gélose Columbia au sang.....	88
Figure 11 : Examen direct au microscope optique.....	88
Figure 12: Souche sensible au Métronidazole.....	90
Figure 13: Souche résistante au Métronidazole.....	90
Figure 14: Souche sensible à la clarithromycine.....	91
Figure 15: Sensibilité d' <i>H.pylori</i> par méthode de diffusion de disques.....	92
Figure 16: Résultats d'une analyse du gène de l'ARNr23s par PCR en temps réel scorpion..	98
Figure 17: Résultats d'une analyse du gène de la β -globine humain par PCR en temps réel...	99
Figure 18 : Distribution des CMI des <i>H.pylori</i> résistant à la claritromycine.....	112
Figure 19: Distribution des CMI des <i>H.pylori</i> résistant au métronidazole.....	113

Liste des tableaux :

Tableau I :Les différentes espèces du genre <i>Helicobacter</i> et leurs hôtes.....	34
Tableau II : Méthodes de diagnostics de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i>	68
Tableau III : Séquences de l'amorce et les sondes scorpion.....	95
Tableau IV : Quantités nécessaires pour préparer le mix d'un échantillon.....	96
Tableau V : Programmation et démarrage.....	97
Tableau VI : Lecture des fluorescences correspondantes à chaque mutation.....	98
Tableau VII : Interprétation des résultats.....	98
Tableau VIII :Séquence de l'amorce BGLO1 et BGLO2.....	99
Tableau IX :Distribution de l'infection à <i>H.pylori</i> selon les tranches d'âge.....	105
Tableau X :Distribution de l'infection à <i>H.pylori</i> selon le sexe.....	106
Tableau XI : Pourcentage de biopsies positives par le test à l'uréase.....	107
Tableau XII : Pourcentage de biopsies positives à <i>H.pylori</i> par PCR scorpion.....	107
Tableau XIII : Pourcentage des biopsies positives à <i>H.pylori</i> par l'examen anatomopathologique.....	107
Tableau XIV : Pourcentage des biopsies positives à <i>H.pylori</i> par culture.....	108
Tableau XV : Nombre des cas positifs et négatifs par TRU par rapport à la culture	109
Tableau XVI : Nombre des cas positifs et négatifs par PCR par rapport à la culture.....	109
Tableau XVII : Nombre des cas positifs et négatifs par l'examen anatomopathologique par rapport à la culture.....	110
Tableau XVIII : Performance des différentes techniques de diagnostic par rapport à la culture.....	110
Tableau XIX : Taux de résistance primaire d' <i>H. pylori</i> aux antibiotiques sur un total de 177 souches isolées	111
Tableau XX : Taux de résistance primaire d' <i>H. pylori</i> aux antibiotiques par Etest.....	112
Tableau XXI :Taux de résistance primaire d' <i>H. pylori</i> à la clarithromycine par PCRScorpion	113
Tableau XXII : Répartition des mutations ponctuelles conférant la résistance à la clarithromycine.....	114

TableauXXIII : Récapitulatif des taux de résistance retrouvés par les 3 méthodes utilisées.....	115
Tableau XXIV : Répartition des deux populations étudiées selon l'âge et le sexe.....	116
Tableau XXV : Séroprévalence de l'infection à <i>H.pylori</i> chez les enfants symptomatiques et asymptomatique.....	116
Tableau XXVI: Répartition des cas séropositifs et séronégatifs selon l'âge et le sexe.....	117
Tableau XXVII: Répartition des cas séropositifs selon le niveau socioéconomique.....	118
Tableau XXVIII : Répartition des cas séropositifs selon la présence des antécédents familiaux.....	118
Tableau XXIV : Répartition des signes cliniques chez les enfants symptomatiques.....	119
Tableau XXX : Comparaison des résultats de sérologie et des résultats del'anatomopathologie.....	120
Tableau XXXI : La régression logistique univariée et multivariée.....	120

Sommaire

Introduction	29
Revue de littérature	31
Helicobacter pylori	32
I. Historique	32
II. Taxonomie	33
III. Génétique	35
IV. Les caractères bactériologiques	36
1. Caractères morphologiques.....	36
2. Caractères cultureux.....	37
3. Caractères d'identification	38
3.1. Coloration de Gram	38
3.2. Caractères biochimiques.....	39
V. Épidémiologie, habitat et transmission	39
1. Niche écologique	39
2. Transmission de l'infection.....	40
2.1. Transmission interhumaine	40
2.2. Transmission oro-orale et gastro-orale.....	40
2.3. Transmission féco-orale	41
2.4. Transmission par les sources d'eau et les aliments	41
2.5. Transmission iatrogénique.....	41
3. Prévalence de l'infection à <i>H.pylori</i>	42
VI. Aspects cliniques des pathologies associées à <i>H. pylori</i>	43
1. Pathologies digestives :	43
1.1. Gastrite aiguë et chronique	44
1.2. Ulcère	44
1.3. Gastrite atrophique et métaplasie intestinale	44
1.4. Cancer gastrique	45
1.5. Lymphome du MALT	45
2. Pathologies extra-digestives :	45
2.1. Anémie ferriprive :	46
2.2. Purpura Thrombopénique Idiopathique (PTI) :	46
2.3. Carence en vitamine B12 :	47

2.4.	Pathologies dermatologiques :.....	48
2.5.	Pathologies cardiovasculaires :.....	48
2.6.	Pathologies broncho-pulmonaires :	48
VII.	Facteurs de virulence majeurs	48
1.	L'îlot de pathogénicité cag (cag PAI)	49
2.	La protéine CagA	49
	50
3.	Le Peptidoglycane.....	50
4.	La toxine vacuolisante VacA	51
5.	Les Adhésines et protéines de la membrane externe (OMP, Outer membrane proteins) .	53
5.1.	BabA (Blood group antigen binding adhesin).....	53
5.2.	SabA (Sialicacid binding adhesion)	53
5.3.	OipA (Outer inflammatory protein)	53
5.4.	DupA (Duodenal ulcer promoting gene).....	54
5.5.	FlaA.....	54
VIII.	Déterminisme pathologique associé à <i>H. pylori</i>.....	55
1.	Facteurs bactériens	55
2.	Facteurs de l'hôte	55
3.	Facteurs environnementaux	57
IX.	Méthodes de diagnostic.....	60
1.	Méthodes invasives	60
1.1.	Examen bactériologique des biopsies.....	60
1.2.	Examen anatomopathologique des biopsies	63
1.3.	Test rapide à l'uréase.....	64
1.4.	Amplification génique (PCR).....	64
2.	Méthodes non invasives	65
2.1.	Test sérologique.....	65
2.2.	Test respiratoire à l'urée marquée	65
2.3.	Recherche d'antigènes bactériens dans les selles	66
2.4.	Détection des anticorps dans la salive ou les urines	66
2.5.	Détection de séquences d'ADN spécifiques de <i>H.Pylori</i> dans les selles par PCR.....	66
3.	Indication des différents tests diagnostiques.....	67
X.	Sensibilité aux antibiotiques et résistances:	69
1.	Détermination de la sensibilité aux antibiotiques:	69
1.1.	Méthode de dilution en milieu gélosé :	69

1.2. Méthode en diffusion :.....	69
Le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) édite	69
1.3. Techniques de biologie moléculaire:.....	70
2. Résistance aux antibiotiques:	71
2.1. Résistance naturelle :	71
2.2. Résistance acquise:	71
XI. Traitement :	76
Matériel et Méthodes	82
Partie I : prévalence de l'infection à <i>H.pylori</i> et résistance primaire aux antibiotiques chez l'adulte	84
I. Étude bactériologique conventionnelle :	84
1. Lieu et période de l'étude :	84
2. Population étudiée :	84
3. Méthodologie de l'étude :	84
II. Étude moléculaire.....	93
1. Extraction de l'ADN:.....	93
2. Détermination de la résistance à la clarithromycine et les points de mutations par PCR scorpion :	93
Partie II : Prévalence de l'infection à <i>H.pylori</i> chez l'enfant	101
1. Type d'étude :.....	101
2. Population étudiée.....	101
3. Collection des données	101
4. Prélèvement	102
5. Test sérologique :	102
III. Analyse statistique :	103
IV. Approbation éthique et consentement.....	103
V. Limite de l'étude :	103
Résultats	104
I. Infection à <i>H.pylori</i> chez l'adulte :.....	105
1. Population totale étudiée :.....	105
2. Données démographiques :	105
2.1. Distribution de l'infection à <i>H.pylori</i> selon l'âge.....	105
2.2. Distribution de l'infection à <i>H.pylori</i> selon le sexe.....	106
3. Prévalence de l'infection à <i>H.pylori</i>	106
3.1. Détermination de l'infection à <i>H. pylori</i> par le test rapide à l'uréase (TRU):.....	106

3.2.	Détermination de l'infection à <i>H. pylori</i> par PCR.....	107
3.3.	Détermination de l'infection à <i>H. pylori</i> par anatomopathologie :.....	107
3.4.	Détermination de l'infection à <i>H. pylori</i> par culture :	108
3.5.	Corrélation entre les différentes techniques de diagnostic :	109
4.	Détermination de la résistance primaire d' <i>H. pylori</i> aux antibiotiques	111
4.1.	Prévalence de la résistance par méthode conventionnelle :.....	111
4.2.	Prévalence de la résistance à la clarithromycine par PCR scorpion :.....	113
4.3.	Mutations ponctuelles conférant la résistance à la clarithromycine	114
4.4.	Comparaison de la résistance à la clarithromycine par la méthode phénotypique et la méthode moléculaire :	115
II.	Séroprévalence de l'infection chez l'enfant :	116
1.	Population étudiée:.....	116
2.	Séroprévalence de l'infection à <i>H.pylori</i> chez la population étudiée :	116
3.	Facteurs de risque liés à l'infection à <i>H.pylori</i> :	117
4.	Évaluation du test sérologique (ELISA) par rapport aux résultats anatomopathologiques : 119	
	Discussion	121
	Conclusion	140
	Perspectives :	143
	Annexe.....	144
	Résumé.....	149
	Abstract	151
	ملخص.....	152
	Publications.....	153
	Références bibliographiques	154
	Abstract	173

Introduction

Helicobacter pylori est une bactérie Gram négatif spiralée, microaérophile, de croissance difficile, dont le réservoir principal est l'estomac de l'Homme (1), il est responsable de nombreuses pathologies gastroduodénales : gastrite chronique, ulcères gastroduodénaux et les deux néoplasies gastriques (l'adénocarcinome et le lymphome du mucosa associated lymphoid tissu (MALT)) (2).

L'acquisition de l'infection se fait principalement dans l'enfance entraînant une gastrite chronique qui, si elle reste asymptomatique dans 90% des cas, évolue parfois vers une maladie ulcéreuse (10% des cas), voire un cancer gastrique (1%) à l'âge adulte (3).

L'infection à *H. pylori* est l'une des infections chroniques les plus répandues dans le monde entier, sa prévalence varie selon les pays et leurs niveaux de développement. Elle varie entre 80 et 95% dans les pays en voie de développement, dont le Maroc appartient, tandis qu'elle se situe entre 15 à 30% pour les pays industrialisés. Si sa prévalence semble diminuer dans les pays développés, il s'agit toujours d'un problème majeur dans les pays en voie de développement (3).

Le diagnostic des infections à *Helicobacter pylori* repose sur de nombreuses techniques aux performances variées dont il faut bien connaître l'intérêt et les limites. Il se base sur une large gamme de méthodes regroupées selon qu'elles soient invasives ou non. Les techniques invasives pratiquées sur des biopsies obtenues par fibroscopie digestive comprennent l'examen histologique, le test rapide à l'uréase, la culture et l'amplification génique. Les techniques non invasives sont au nombre de trois: le test respiratoire à l'urée, la recherche de l'antigène dans les selles et la sérologie. Le choix se rapporte aux circonstances cliniques, à la sensibilité et à la spécificité du test mais aussi à son coût. Les techniques de biologie moléculaire ont été particulièrement développées pour le diagnostic rapide de l'infection par cette bactérie de croissance difficile. L'isolement par mise en culture de biopsies gastriques est délicat mais c'est à ce jour le moyen le plus sûr permettant la détermination de la sensibilité aux antibiotiques, la recherche de facteurs de virulence et le typage génétique.

La difficulté de l'isolement et de l'antibiogramme de *H. pylori* à partir de biopsies gastriques font que cette technique n'est pas actuellement pratiquée par les laboratoires. Cette situation n'était pas préjudiciable à la prise en charge thérapeutique des patients infectés tant que les résistances aux antibiotiques utilisés pour éradiquer l'infection étaient minimales. Un traitement

empirique associant deux antibiotiques choisis parmi la clarithromycine, le métronidazole et l'amoxicilline permettait une éradication dans 80% des cas et un traitement de deuxième ligne en cas d'échec permettait le succès thérapeutique. Malheureusement la situation a bien changé depuis quelques années, les résistances sont de plus en plus fréquentes et entraînent des échecs thérapeutiques (3).

Le bénéfice de l'éradication d'*Helicobacter pylori* est maintenant largement reconnu. La prescription de traitements probabilistes augmente la pression de sélection sur cette espèce. Sous l'effet de cette pression de sélection et grâce à sa grande adaptabilité, *H. pylori*, espèce initialement sensible à beaucoup d'antibiotiques, est en train d'évoluer et d'acquérir des résistances à certains des produits les plus utiles à son éradication. Les recommandations de la conférence de consensus de 1995 n'avaient pas suffisamment pris ce risque en compte. La récente révision de ce consensus recommande la mise en place de procédures d'évaluation et de suivi de la résistance d'*H. pylori* aux antibiotiques (4).

La connaissance du taux local de résistance aux antibiotiques est cruciale pour le choix d'un traitement empirique de première ligne adapté et efficace pour l'éradication de l'infection à *H. pylori* (3). Au Maroc la prévalence de l'infection d' *H. pylori* est de 69% à 75% mais les taux de résistance aux antibiotiques ne sont pas connus.

L'objectif majeur donc de notre travail de thèse a été de déterminer :

- 1) la prévalence de l'infection à *H. pylori* chez l'adulte et étudier la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques par méthodes conventionnelles et par méthode moléculaire.
- 2) la séroprévalence de l'infection à *H.pylori* chez l'enfant, chercher la corrélation de cette infection avec certains facteurs de risques chez l'enfant symptomatique et asymptomatique et discuter la place de la sérologie dans le diagnostic de l'infection à *H.pylori* chez les enfants symptomatiques à fin de faciliter leur prise en charge thérapeutique.

Revue de littérature

Helicobacter pylori

I. Historique

L'existence de bactéries spiralées dans l'estomac humain a été suspectée pendant plus d'un siècle et fut, d'ailleurs, mentionnée dans les travaux de quelques scientifiques. Mais, c'est au cours de l'année 1982, que deux chercheurs australiens, J.R. Warren et B.J. Marshall, confirmèrent l'existence d'une bactérie dans le milieu stomacal. Se référant aux anciennes publications, ils suspectèrent la présence, au niveau de la muqueuse gastrique, d'un micro-organisme proche du genre *Campylobacter*, susceptible d'être en cause dans la pathologie ulcéreuse. Ils décidèrent, afin de l'identifier, de mettre en culture des biopsies gastriques et d'utiliser des conditions de croissance similaires, sur gélose au sang cuit et en atmosphère micro-aéroophile. Les premières tentatives furent infructueuses en raison d'un temps d'incubation trop court. Puis, suite au long week-end de pâques de cinq jours, l'apparition de colonies a permis l'isolement d'une nouvelle bactérie. Elle fut d'abord baptisée *Campylobacter pylori* en raison de sa ressemblance avec le genre *Campylobacter*, de par sa morphologie spiralée et la présence de flagelles (1). Par la suite, l'étude de ses propriétés phénotypiques et génotypiques a conduit à la définition d'un nouveau genre nommé *Helicobacter*. La bactérie est alors renommée, *H. pylori* en 1989 (3).

Cette découverte mit du temps pour qu'elle soit acceptée par l'ensemble de la communauté scientifique car la mise en cause d'un micro-organisme dans la pathologie ulcéreuse leur était difficilement concevable. Cela signifiait également une remise en question totale des théories anciennes. Par la suite, une fois ce postulat accepté, *H. pylori* révolutionna le monde de la gastro-entérologie. La maladie ulcéreuse, jusqu'alors chronique avec de nombreuses poussées, devint une maladie essentiellement infectieuse (3), guérissable par simple traitement antibiotique.

Dans les années 90, un autre bouleversement s'opéra avec la mise en cause de la bactérie dans deux pathologies tumorales graves, l'adénocarcinome gastrique et le lymphome gastrique du MALT(4), modifiant totalement leur prise en charge.

En parallèle de ces révélations, *H. pylori*, par sa complexité, devint un fabuleux sujet d'étude pour les microbiologistes.

II. Taxonomie

Le genre *Helicobacter* appartient à la division des *Proteobacteria*, ordre des *Campylobacterales*, famille des *Helicobacteraceae*. Cette famille comprend aussi les genres *Wolinella*, *Flexispira*, *Sulforimonas*, *Thiomicrospora* et *Thiovolum*. A ce jour, le genre *Helicobacter* regroupe plus de 20 espèces reconnues, avec de nombreuses espèces en attente de reconnaissance (5). Les membres du genre *Helicobacter* sont tous microaérophiles et dans la plupart des cas catalase et oxydase positifs.

Depuis la première culture de *H. pylori* en 1982, de nombreuses autres espèces du genre *Helicobacter* ont été identifiées. Elles colonisent la muqueuse digestive de l'homme ou d'animaux (Tableau I) (6). On distingue les *Helicobacter* gastriques qui sécrètent une uréase des *Helicobacter* entérohépatiques. La grande majorité de ces *Helicobacter* autres que *pylori* infectent différentes espèces animales et rarement l'homme. Leur pouvoir pathogène est encore controversé (5).

Parmi les *Helicobacter* gastriques autres que *pylori*, seul *H. helmannii* peut infecter l'Homme. *H. helmannii* infecte habituellement les chiens, les chats, le porc et les primates. C'est une zoonose qui atteint l'homme de façon accidentelle. La prévalence de l'infection humaine à *H. helmannii* est très faible, de l'ordre de 0,5%. *H. helmannii* est facilement identifiable à l'examen direct par son aspect fortement spiralé, en "tire-bouchon". Il n'est pas cultivable in vitro avec les milieux utilisés pour la recherche de *H. pylori*. Il est responsable chez l'Homme d'une gastrite et l'infection à *H. helmannii* peut comme pour *H. pylori* évoluer vers un ulcère, un adénocarcinome ou un lymphome. Il serait sensible aux mêmes antibiotiques que *H. pylori*(6).

Tableau I : Les différentes espèces du genre *Helicobacter* et leurs hôtes (6)

Espèce	Hôte naturel	Hôte occasionnel
Helicobacter gastriques		
<i>H. acinonychis</i>	Guépard	
<i>H. bizzozeroni</i>	Chien	
<i>H. bovis</i>	Bovins	
<i>H. felis</i>	Chat, chien	
<i>H. heilmannii</i>	Homme, primates, chien, chat, porc	
<i>H. suis</i>	Cochon	
<i>H. mustelae</i>	Furet	
<i>H. nemestrinae</i>	Macaque	
<i>H. pylori</i>	Homme	Primates
<i>H. salomonis</i>	Chien	
<i>H. suncus</i>	Musaraigne	
Helicobacter entérohépatiques		
<i>H. bilis</i>	Chien, Souris	Homme
<i>H. canis</i>	Chien, chat	Homme
<i>H. cinaedi</i>	Hamster	Homme
<i>H. cholecystus</i>	Hamster	
<i>H. fennelliae</i>	Hamster	Homme
<i>H. hepaticus</i>	Souris	
<i>H. muradirum</i>	Souris, rat	
<i>H. canadensis</i>	Oiseaux, porc	Homme
<i>H. rodentum</i>	Souris	
<i>H. trogonum</i>	Rat	
<i>H. typhlonicus</i>	Souris	
<i>H. rappini</i>	Chien, mouton	Homme
<i>H. pullorum</i>	Porc, volaille	Homme
<i>H. pametensis</i>	Chat, porc	Homme

Plusieurs *Helicobacter* entérohépatiques peuvent infecter l'Homme : *H. cinaedi*, *H. fennelliae*, *H. canis*, *H. pametensis*, *H. pullorum*, *H. canadensis*, *H. rappini* et *H. bilis*. Les autres (tableau I) n'ont été isolés que chez des animaux (5). *H. cinaedi* et *H. fennelliae* étaient initialement classés parmi les *Campylobacter*. Ils ont été isolés de prélèvements rectaux chez des homosexuels masculins et de bactériémies chez des sujets immunodéprimés. *H. canis*, isolé de selles de chiens et de chat n'a été isolé qu'une fois chez un enfant diarrhéique. *H. pametensis*, *H. pullorum* et *H. canadensis* infectent les animaux (porc, volaille) et peuvent être responsable de gastro-entérites chez l'Homme (5,6). *H. rappini* (*Flexispirarappini*) a été isolé de diarrhée et de bactériémies chez l'homme. *H. bilis* peut être retrouvé au niveau des voies biliaires et du foie de souris. Chez l'homme, son ADN a pu être mis en évidence dans la bile des malades atteints de cholécystite chronique et son rôle pathogène est encore discuté (6).

Le rôle pathogène de ces *Helicobacter* autres que *pylori*, voire d'autres *Helicobacter* encore non identifiés, est encore source de controverses et d'hypothèses. La présence de séquences d'ADN spécifiques au niveau des lésions chroniques des voies biliaires, du foie et même au niveau des lésions inflammatoires chroniques de l'intestin ou cancéreuses du colon mais sans isolement par culture n'ont pas apporté suffisamment d'éléments formels de leur réelle implication dans ces pathologies graves (7).

III. Génétique

Tomb et al en 1997 (7) puis, Alm et al en 1999 (8) rapportent le séquençage en intégralité de deux souches de *H. pylori*, respectivement 26695 et J99. Celles-ci avaient été isolées dans les années 80 pour la souche 26695, en Grande-Bretagne chez un patient présentant une gastrite, et en 1994 aux USA pour la J99, chez un patient souffrant d'un ulcère duodéal. Depuis, on dispose de l'intégralité du génome de 10 souches de cette bactérie (26695, B38, B8, G27, HPAG1, J99, P12, PeCan4, Shi470, SJM180). Le chromosome bactérien de la souche 26695 de *H. pylori* est circulaire, représente 1,7 Méga paires de bases avec un G+C de 35 à 40% (9). Il contient environ 1500 gènes parmi lesquels, 55% sont communs à d'autres bactéries alors que 45% sont propres à *H. pylori* (10). La comparaison des deux génomes met en évidence une grande similarité (8), on retrouve 310 protéines avec plus de 98% d'homologies et 41 identiques entre les deux souches (11,8). *H. pylori* possède un grand polymorphisme (12), reflète

de son adaptation au milieu environnant. Cette bactérie évolue de manière indépendante dans chaque hôte, de telle sorte qu'en dehors d'une même famille ou d'une institution, il est inhabituel de retrouver deux souches identiques (8).

IV. Les caractères bactériologiques

1. Caractères morphologiques

H. pylori est un bacille à Gram négatif, de 2,5 μm à 5 μm de long et de 0,3 μm de large et de morphologie hélicoïdale ou spiralée en S. Cette bactérie possède 4 à 6 flagelles (contre un flagelle chez les *Campylobacters*) lui conférant sa grande mobilité et lui permettant de coloniser de façon chronique la muqueuse gastrique de la moitié de l'humanité (13)(Figure 1).

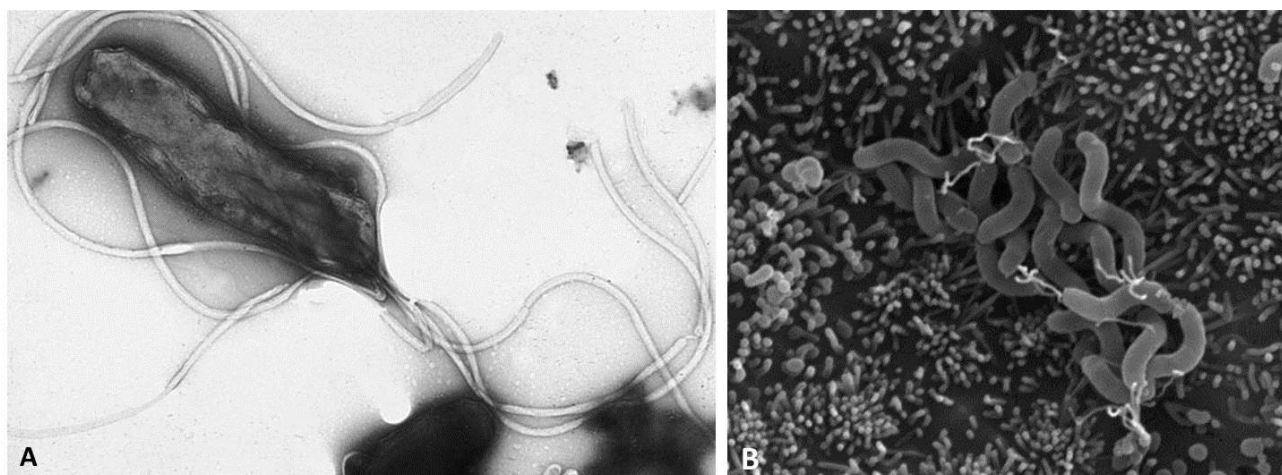


Figure 1 :*Helicobacter pylori* (d'après Tan, 2009)

Photos d'*Helicobacter pylori* prises en microscopie électronique. A. Une bactérie *H. pylori*, B. Amas d'*H. pylori* au niveau des cellules épithéliales gastriques (14)

L'aspect au Gram peut être varié avec des formes bacillaires en U, en C, en S ou en virgule. Sur les cultures vieillissantes, les formes bacillaires donnent des formes coccoïdes rondes (Figure 2). Ces coccoïdes sont incapables de se diviser en culture mais elles maintiennent un certain métabolisme et conservent des structures fonctionnelles compatibles avec la viabilité (15).

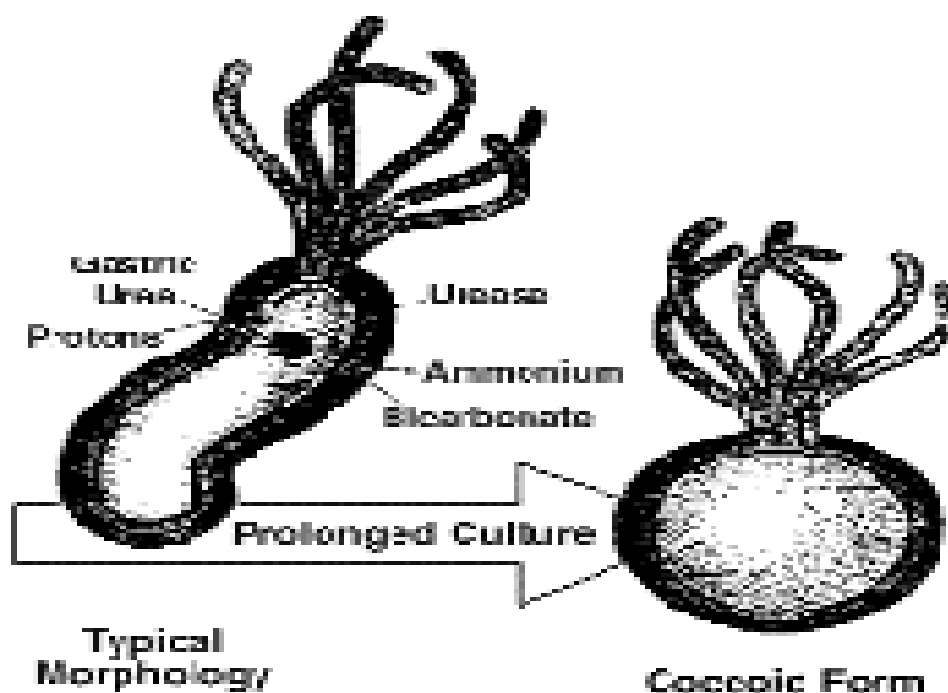


Figure 2 : Passage d'une forme spiralée à une forme coccoïde en cas de culture prolongée (16)

2. Caractères cultureux

La mise en culture de biopsies gastriques est la technique de référence pour mettre en évidence la colonisation de l'estomac par *H. pylori* (14). La réussite de la culture nécessite un ensemencement rapide après le prélèvement, afin de limiter au maximum le temps d'exposition de la bactérie à l'air ambiant.

Les cultures sont réalisées sur des milieux gélosés additionnés de sang frais, de préférence du sang de cheval ou de mouton, et le plus souvent rendus sélectifs par ajout d'antibiotiques afin d'améliorer la croissance bactérienne (milieu Skirow ou milieu TVPA : Triméthoprime, Vancomycine, Polymyxine, Amphotéricine) (17).

H. pylori présente un métabolisme oxydatif microaérophile c'est-à-dire que les *Helicobacters* ont besoin d'oxygène pour leur métabolisme mais à une concentration

inférieure à celle présente dans l'air. La concentration en oxygène optimale pour sa croissance serait de l'ordre de 3 à 5%. L'incubation se fait donc à 37° en atmosphère microaérophile(17).

H. pylori est une bactérie exigeante, sa culture est longue, difficile et délicate, sa croissance est lente. Ainsi dans les conditions optimales, les colonies apparaissent en 3 à 7 jours pour une primoculture et en 2 à 4 jours pour un repiquage. Les colonies sont petites, régulières, rondes, bombées, transparentes et luisantes (16).

3. Caractères d'identification

L'identification de *H. pylori* peut être réalisée non seulement par l'aspect des colonies mais aussi par l'examen microscopique après coloration de Gram et par la mise en évidence des caractères biochimiques.

3.1. Coloration de Gram

Après coloration, l'observation de *H. pylori*, bactérie Gram négatif, à l'objectif 100 et à l'immersion, montre des bactéries colorées en rose et de forme spiralée, ronde, en U ou en virgule (Figure 3).

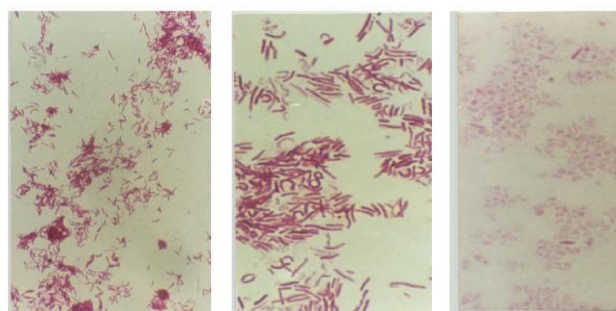


Figure 3 : Aspect de *Helicobacter pylori* après coloration de Gram, à l'objectif 100 et à l'immersion (16)

3.2. Caractères biochimiques

Les principaux critères d'identification biochimique de *H. pylori* sont la positivité de l'uréase, de la catalase et de l'oxydase.

L'uréase est une enzyme qui joue un rôle majeur dans la pathogénie de l'infection à *H. pylori*. En hydrolysant l'urée, normalement présente dans l'estomac, en ammoniacque, on admet que la bactérie tamponne son propre environnement et se protège de l'acidité gastrique. Cette protection est essentielle à la bactérie car sans elle, *H. pylori* est incapable de survivre à pH = 2 (16).

La catalase est une enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène, protégeant ainsi la bactérie des effets nocifs des métabolites de l'oxygène et plus particulièrement du peroxyde d'oxygène. Cette catalase ne serait pas indispensable pour la croissance bactérienne et la survie de *H. pylori* in vitro. Cependant, on considère la catalase comme un facteur de virulence car les mutants catalase négative n'ont jamais été retrouvés dans l'estomac humain infecté par *H. pylori* (17).

V. Épidémiologie, habitat et transmission

1. Niche écologique

Le liquide gastrique, très acide, possède un pouvoir bactéricide majeur. De ce fait, l'estomac était classiquement considéré comme stérile jusqu'à la découverte de *H. pylori*, seule bactérie pouvant survivre dans un tel environnement. Cette bactérie présente un bon exemple d'adaptation à une niche écologique spécifique car certaines caractéristiques lui permettent de survivre dans l'estomac et de coloniser la muqueuse :

- *H. pylori* produit une uréase qui hydrolyse l'urée du liquide gastrique en ammoniacque, permettant l'alcalinisation du milieu et la survie de la bactérie dans l'estomac acide.
- *H. pylori* échappe à l'acidité gastrique grâce à ses flagelles qui lui confèrent une grande mobilité au niveau du mucus.
- L'existence d'un système d'adhésines permet à la bactérie de se fixer sur des récepteurs de la cellule épithéliale gastrique.

L'estomac semble être la niche essentielle de *H. pylori* qui est retrouvé dans l'antre, le fundus et le liquide gastrique. Cependant, d'autres sites potentiels ont été explorés : les selles, la cavité buccale et la salive. Ainsi, de rares chercheurs ont pu y détecter des traces d'ADN par amplification génique (PCR) (18, 19,20).

2. Transmission de l'infection

Les caractéristiques exactes de contamination sont encore mal comprises. Toutefois ; les études épidémiologiques reconnaissent certains modes de transmission, le principal étant la contamination interhumaine par contact direct selon des modalités variables : oro-orale, féco-orale (21). La contamination indirecte par des sources d'eau et les aliments est aussi évoquée ainsi que plus rarement une voie iatrogénique durant les endoscopies.

2.1. Transmission interhumaine

La Transmission de personne à personne survient surtout durant la petite enfance. Elle est facilitée par l'immaturation de la muqueuse gastrique qui favorise l'implantation de la bactérie et par certains facteurs influençant la contamination notamment l'hygiène, les gastro-entérites, les contacts rapprochés et les logements surpeuplés (21). La voie intrafamiliale est prédominante: des parents aux enfants, au sein des fratries et entre conjoints (20). Elle a d'ailleurs été démontrée par des études moléculaires mettant en évidence une empreinte génétique identique pour les souches retrouvées chez les enfants et les parents (22). Néanmoins, le rôle de la mère semble prédominant dans la transmission : le risque d'infection chez l'enfant est plus élevé si elle est porteuse de la bactérie plutôt que le père (22).

2.2. Transmission oro-orale et gastro-orale

Elles représentent les voies de contamination interhumaine prédominantes et nécessitent un contact étroit entre individus ; la survie de la bactérie étant très brève en dehors de l'estomac .elles se font par le biais de la salive ou du liquide gastrique contaminés, lors de vomissement ou de reflux gastro-œsophagien (RGO) (20,22). Elles concernent aussi bien les pays industrialisés que les pays en développement mais avec des taux d'incidence différents selon le statut socio-économique du pays.

Dans les pays en développement, la surpopulation, la vie en communauté, le manque d'hygiène, les vomissements fréquents favorisent fortement la contamination (23). Certaines pratiques culturelles peuvent également faciliter la transmission oro-orale. Par exemple, dans certains pays africains, le taux d'incidence chez les enfants en bas âge est plus élevé dans les familles pratiquant la pré-mastication des aliments que dans celles n'ayant pas recours (21,6).

Dans les pays développés, les contaminations oro-orale et gastro-orale sont aussi majoritaires notamment au sein d'une même famille, par la salive et/ou liquide gastrique, des parents aux enfants. L'acquisition est aussi possible au sein des couples si l'un des conjoints est porteur (20).

2.3. Transmission féco-orale

H.pylori ne survit que très rarement au passage intestinal en raison du changement de pH et de la présence de sels biliaires (7). Cependant, à l'occasion d'une diarrhée, les selles peuvent renfermer des bactéries vivantes mais de manière inconstante, ce qui suggère une contamination féco-orale possible par l'intermédiaire des mains.

Cette voie est préférentielle dans les pays les moins avancés en regard des diarrhées fréquentes, de l'hygiène fécale sommaire et de l'absence d'assainissement des eaux usées (24). Dans les pays développés où les familles sont plus petites, les diarrhées moins fréquentes, l'hygiène adaptée et le traitement de l'eau efficace, la probabilité d'une telle transmission semble relativement faible.

2.4. Transmission par les sources d'eau et les aliments

Cette transmission concerne les pays en développement où la prévalence de l'infection est élevée et l'accès à l'eau potable est limité. La consommation de légumes crus a aussi été incriminée en raison d'une probable pollution par de l'eau contaminée (25). Dans les zones rurales des études ont montré que les enfants nageant dans les rivières et consommant l'eau ont un risque plus élevé d'infection (24,25) toutefois ces données sur la relation entre l'eau et l'infection par *H.pylori* nécessitent d'être confirmées.

2.5. Transmission iatrogénique

Cette voie concerne essentiellement les gastro-entérologues qui ont un risque plus élevé d'infection à *H. pylori* lors des endoscopies (25), ainsi que les infirmiers manipulant les sondes gastriques. La transmission peut aussi avoir lieu chez les patients par le biais des appareillages médicaux (endoscopes, instruments d'hygiène dentaire) mal désinfectés. Cependant, les procédures de désinfection minimisent fortement ce mode contamination.

3. Prévalence de l'infection à *H.pylori*

L'infection à *H.pylori* est l'infection bactérienne chronique la plus fréquente puisqu'elle touche 50% de la population mondiale. Cette forte prévalence est très inégalement répartie dans la population (Figure 4). La prévalence dans les pays en développement est très élevée pouvant atteindre 90% (26, 27, 28) alors qu'elle est plus faible dans les pays industrialisés(29,30). Ainsi en Amérique du Sud, Bangladesh, et Pakistan la prévalence est de 80%, alors que elle est de 26% en Suisse, 11% en Suède et 20% à 50% en France (30). Les populations les plus touchées dans les pays industrialisés sont les personnes de bas niveau socio-économique et celles originaires de pays en développement. La prévalence dans les pays industrialisés diminue fortement depuis plusieurs décades, vraisemblablement du fait de l'augmentation du niveau de vie, des conditions d'hygiène et de l'utilisation importante des antibiotiques (31). Dans les pays industrialisés, la prévalence s'élève progressivement avec l'âge. Le taux d'infection est de 5 à 10% chez l'enfant et atteint 20 à 50% chez l'adulte. Cette augmentation progressive est due à un effet cohorte. L'infection est acquise dans l'enfance, d'autant plus précocement que le niveau socio-économique est bas et persiste toute la vie de l'individu en absence de traitement efficace. Il y a très peu d'acquisition à l'âge adulte (22). La prévalence pour une tranche d'âge donnée est donc le reflet de la prévalence de l'infection à l'époque de la petite enfance de la population de cette tranche d'âge. Chez l'adulte, le taux d'infection est inférieur à 1% par année. On considère que l'incidence chez l'enfant dans les pays industrialisés est de 1% par an contre 3 à 10% dans les pays en voie de développement (30).

En Afrique, la prévalence globale se situe entre 70 et 98% de la population (26,27,28). Au Maroc l'infection à *H.pylori* concerne 70% de la population (32,33). Une cohorte rétrospective formée de 3619 cas présentant tous des signes d'appel gastroduodénaux (33), colligés sur une période de 5 ans, a retrouvé une prévalence globale autour de 67.4%. Cette prévalence a connu une régression progressive depuis 1996.

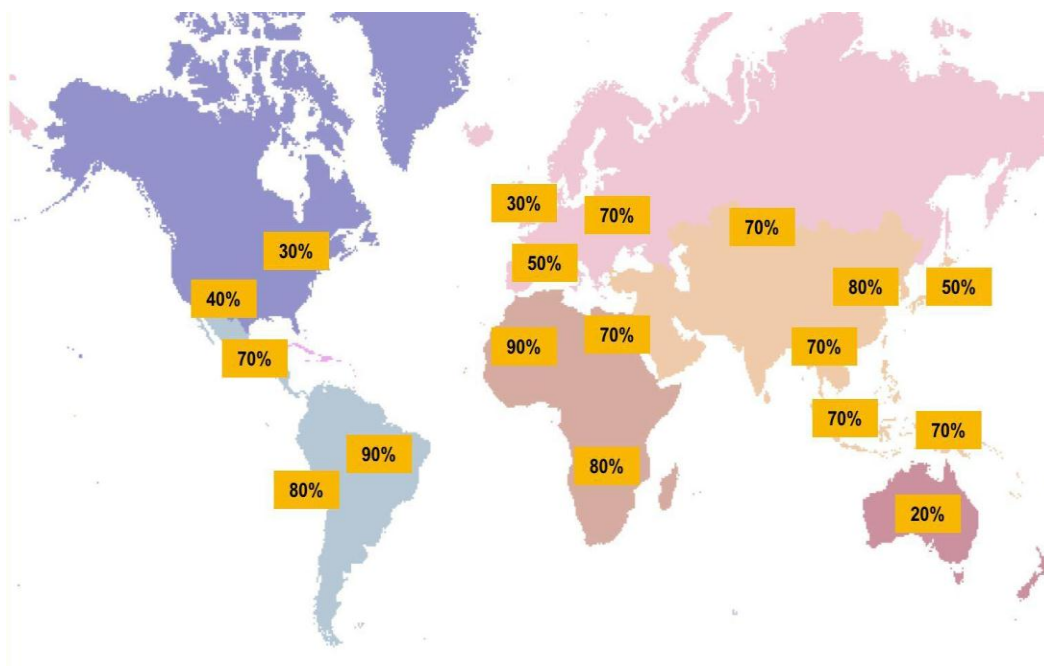


Figure 4 : Prévalence de l'infection à *H.pylori* dans le monde (Azevedo et al. 2009)(34)

VI. Aspects cliniques des pathologies associées à *H. pylori*

1. Pathologies digestives :

L'infection à *H. pylori* provoque systématiquement une gastrite aigue souvent asymptomatique mais pouvant évoluer vers des pathologies plus sévères telles que la gastrite chronique, les ulcères gastriques et duodénaux (10 à 20%), le cancer gastrique (1 à 2%) et le lymphome du MALT. *H. pylori* est actuellement la seule bactérie responsable d'un cancer chez l'Homme. L'adénocarcinome gastrique est la conséquence d'une évolution lente et prolongée de la gastrite chronique vers une atrophie de la muqueuse puis le développement sur cette atrophie de métaplasies puis de dysplasies pour aboutir au cancer.

1.1. Gastrite aiguë et chronique

L'infection avec *H. pylori* induit une infiltration massive de polynucléaires neutrophiles au niveau de la muqueuse gastrique. La phagocytose des bactéries provoque la libération de substances toxiques induisant des lésions (35). Cet état inflammatoire ainsi que la persistance d'*H. pylori* sont des étapes clé dans le passage de la gastrite aiguë vers une gastrite chronique qui peut durer jusqu'à quelques semaines (36). A ce stade, une forte corrélation existe entre le niveau de sécrétion d'acide, la distribution de la gastrite et l'évolution vers l'ulcère ou le cancer (36). La gastrite touchant l'ensemble de l'estomac est généralement associée à une hypochlorhydrie pouvant évoluer vers un cancer gastrique. La gastrite à prédominance antrale au contraire, provoque une hyperchlorhydrie qui peut conduire au développement d'un ulcère duodéal (37).

1.2. Ulcère

Les ulcères gastriques et duodénaux se caractérisent par des lésions d'au moins 0.5 cm de diamètre pénétrant jusqu'à la couche musculaire. Ces deux types d'ulcères sont fortement associés à *H. Pylori* et se développent dans les sites où l'inflammation est la plus sévère (36). L'éradication d'*H. pylori* constitue la base du traitement antiulcéreux (37,38).

1.3. Gastrite atrophique et métaplasie intestinale

L'inflammation chronique induite par *H. pylori* peut entraîner une destruction des glandes gastriques et une perte de l'architecture normale de la muqueuse gastrique ce qui provoque la mise en place d'un épithélium de type intestinal. Cet état de gastrite atrophique et métaplasie intestinale a lieu chez 50% des patients infectés par *H. pylori* et aux endroits où l'inflammation est la plus sévère (39). Le risque gastrite atrophique dépend de la distribution de l'inflammation chronique active. Les patients chez qui la production d'acide est diminuée montrent une progression plus rapide vers l'atrophie (40). Les régions de métaplasie intestinale s'amplifient au cours du temps et augmentent considérablement le risque de cancer gastrique en fonction de la sévérité de l'atrophie.

1.4.Cancer gastrique

Environ 1 million de cas de cancer gastrique sont diagnostiqués par an, classant ce cancer 4^{ème} à l'échelon mondiale. Sur le plan histologique, le carcinome gastrique se présente sous deux formes : le cancer gastrique diffus constitué de cellules néoplasiques individuelles infiltrantes qui ne forment pas de structures glandulaires et l'adénocarcinome du type intestinal qui progresse à travers une série d'étapes histologiques (41). L'adénocarcinome de type intestinal est initié par la transition d'une muqueuse normale vers une gastrite chronique superficielle suivie d'une atrophie gastrique et d'une métaplasie intestinale pour enfin engendrer une dysplasie et un adénocarcinome (42).

Le rôle de *H. pylori* dans la genèse de l'adénocarcinome gastrique a été clairement démontré par la mise en évidence de mécanismes cellulaires de carcinogenèse par la bactérie. Le stress oxydatif généré au cours de l'infection peut contribuer à un dysfonctionnement cellulaire et *H. pylori* induit des endommagements oxydatifs directs au niveau de l'ADN (43,44,45). La génération d'espèces oxygénées réactives dans l'épithélium gastrique est associée à la présence de facteurs de virulence tels que la protéine CagA et l'îlot *cag* ce qui implique leur forte contribution au processus de carcinogenèse (46).

1.5.Lymphome du MALT

Le lymphome du MALT se caractérise par une infiltration massive de cellules lymphoïdes dans la lamina propria entraînant une destruction des glandes gastriques et la formation de lésions lympho-épithéliales (47). L'association entre le lymphome du MALT et la présence d'*H. pylori* est établie puisque environ 90% des sujets atteints de lymphome du MALT sont infectés à *H. pylori* (48,36).

2. Pathologies extra-digestives :

Depuis la découverte de *H.pylori*, de nombreuses études ont été publiées concernant son rôle dans des maladies extra-digestives. L'inflammation chronique de la muqueuse gastrique aurait des conséquences à distance. Certaines publications (49, 50,51) ont d'ailleurs confirmé son implication dans quelques pathologies. Le lien avec le Purpura Thrombopénique Idiopathique (PTI) est aujourd'hui bien établi. Des preuves existent également pour les anémies ferriprives inexplicées, la carence en vitamine B12 et l'urticaire chronique idiopathique.

D'autres associations sont encore hypothétiques. De nombreuses recherches sont faites à ce sujet mais les résultats restent souvent contradictoires. Les hypothèses physiopathologiques restent fragiles.

2.1. Anémie ferriprive :

cette anémie est relativement répandue à travers le monde, secondaire le plus souvent à une carence martiale ou une inflammation. L'implication de *H. pylori* dans la survenue d'une anémie ferriprive, a été évoquée après que des études aient montré que, lorsqu'aucune cause n'était retrouvée, notamment chez la femme jeune et l'enfant, l'éradication de la bactérie permettait la résolution de l'anémie avec ou sans supplémentation en fer (49, 50). Plusieurs hypothèses ont été évoquées : interférence de *H. pylori* via une hémorragie digestive occulte ou la séquestration du fer sans que l'on ait de réelle preuve (51). En revanche, Annibale et al. en 2003, ont montré que les sujets avec une infection à *H. pylori* et une anémie ferriprive, avaient une augmentation du pH gastrique (pH médian 7) et une diminution de la concentration d'acide ascorbique. Or, le pH optimal pour l'absorption du fer est de 3, et l'acide ascorbique permet la réduction du fer non héminique (Fe^{3+}) que l'on retrouve dans les céréales, produits laitiers et légumineuses en fer héminique (Fe^{2+}), préalable à son utilisation par l'organisme (52). Ciacci et al, ont montré que les sujets infectés, avaient une ferritinémie significativement plus basse que les non infectés et que l'éradication d'*H. pylori*, permettait une absorption du fer normalisée par rapport à la population témoin et donc, une augmentation de la ferritinémie (53). Ces arguments plaident en faveur d'un rôle de *H. pylori* dans la survenue de ces anémies ferriprives réfractaires, même s'ils ne donnent qu'une explication parcellaire puisque, par exemple, la prise d'IPP n'engendre pas d'anémie de ce type alors que le pH gastrique est là aussi augmenté.

2.2. Purpura Thrombopénique Idiopathique (PTI) :

Cette affection hématologique se caractérise par une thrombopénie secondaire à une destruction plaquettaire médiée par des auto-anticorps. Elle peut être secondaire à des maladies auto-immunes, infectieuses (hépatite C, VIH), lymphoprolifératives, ou bien être primitive. On parle de PTI lorsqu'aucune cause n'est retrouvée à une thrombopénie $< 100\ 000\ Pl/mm^3$, de plus de 6 mois, que l'on est en présence d'anticorps anti-plaquettes. En 1998, Gasbarrini et al ont montré que le traitement d'éradication d'*H. pylori* seul, chez des patients avec un PTI et

une infection à *H. pylori*, permet une réascension des plaquettes post-éradication de la bactérie et parfois la disparition des anticorps (54). Franchini et al, en 2005, dans une étude portant sur 524 patients ayant un PTI dont 306 infectés par *H. pylori*, ont montré une efficacité de l'éradication dans 83% des cas, avec dans 50% des cas, une réponse partielle ou complète plaquettaire (55). Enfin, en 2007, Emilia et al, ont rapporté, au cours d'un suivi de 60 mois post-éradication d'*H. pylori* chez 38 des 75 patients souffrant de PTI, qu'après l'éradication de l'infection à *H. pylori*, une augmentation des Pl a été observée dans 68% des cas. Quand ils s'intéressent au profil des souches de *H. pylori* chez les patients infectés avec PTI versus une population témoin infectée sans PTI, ils trouvent une proportion significativement plus importante de souches CagA, VacAs1 et iceA dans la population ayant un PTI (56). Ainsi, de plus en plus d'études, particulièrement japonaises et italiennes, ont montré un lien entre l'infection à *H. pylori* et la survenue d'un PTI. La physiopathologie est encore peu connue. La compilation des 1500 patients étudiés dans la littérature montre un taux de 53 % de réascension plaquettaire suite à l'éradication d'*H. pylori* dans les 3 mois, avec un maintien dans le temps jusqu'à 5 ans pour l'étude d'Emilia et al (56, 57).

2.3. Carence en vitamine B12 :

La vitamine B12 est apportée chez l'homme exclusivement par l'alimentation. Elle est liée aux protéines animales dont elle est libérée sous l'action de la pepsine et de l'acide gastrique. Lors de l'infection par *H. pylori*, la gastrite engendrée s'accompagne d'une diminution de la sécrétion acide et de la pepsine. La conséquence est la diminution de la vitamine B12 et une hyperhomocystéinémie. Il a été démontré chez les sujets âgés plus de 60 ans, en dosant l'homocystéinémie et la vitamine B12 dans leur sang avant et après éradication de *H. pylori*, que l'éradication de la bactérie permettait une augmentation significative du taux de vitamine B12 dans le sang à 6 et 12 mois et une diminution de l'homocystéinémie (58).

2.4.Pathologies dermatologiques :

Il n'existe pas de données probantes sur un rôle de *H. pylori* dans les dermatoses. Les études menées le sont souvent sur de petits effectifs. Il semble toutefois que, seul pour l'urticaire chronique, il y ait quelques données qui orientent vers un intérêt à l'éradication de la bactérie, bien qu'elles ne soient pas statistiquement significatives (59), là encore, les études se contredisent (60). En revanche, concernant la rosacée, le psoriasis et la dermatite atopique, on ne retrouve pas d'association avec *H. pylori*(61).

2.5.Pathologies cardiovasculaires :

Il en est de même, à l'heure actuelle on ne retrouve qu'une faible association entre pathologie athéromateuse et *H. pylori*. Peu d'arguments sont en faveur d'une association au phénomène de Raynaud (57).

2.6.Pathologies broncho-pulmonaires :

Des études cas-témoins basées sur des explorations sérologiques de l'infection à *H. pylori* semblent montrer qu'il existe un lien entre celle-ci et la bronchite chronique, les bronchectasies, la tuberculose pulmonaire et le cancer broncho-pulmonaire (62). Cependant, des études plus approfondies doivent être menées afin d'apporter de réelles preuves de ce lien.

VII. Facteurs de virulence majeurs

H. pylori possède une multitude de facteurs de virulence codés par des gènes dont le polymorphisme est à la base d'une pathologie plus ou moins sévère. Ces facteurs de pathogénicité peuvent déclencher et moduler la nature de la réponse inflammatoire et altérer l'intégrité de la muqueuse gastrique conférant à cette bactérie un caractère carcinogène et pro-inflammatoire.

H. pylori colonise très efficacement la muqueuse grâce à sa motilité, son chimiotactisme, sa résistance à l'acidité gastrique et son adhésion aux cellules épithéliales. La persistance de l'infection à *H. pylori* est rendue possible par des stratégies d'échappement aux défenses immunitaires via des mécanismes enzymatiques, des capacités à faire varier les motifs antigéniques présents à sa surface et le relargage d'antigènes immunodominants servant d'appâts aux anticorps (63).

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

L'îlot de pathogénicité *cag* (*cag* PAI) est un fragment d'ADN d'environ 40Kb composé d'environ 27 à 31 gènes. Cet îlot code pour un système de sécrétion type IV (SSTIV) permettant la translocation de la protéine CagA, du peptidoglycane ainsi que d'autres éléments à l'intérieur de la cellule épithéliale (63, 64, 65). Associé aux pathologies cliniques, *cag* PAI est un facteur de virulence déterminant d'*H. pylori* et les souches comportant cet îlot augmentent le risque de développement de gastrite atrophique et de cancer gastrique par rapport aux souches qui en sont naturellement dépourvues (figure 5) (66, 67).

2. La protéine CagA

Les souches d'*H. pylori* sont souvent disséminées en souches *cagA*⁺ ou *cagA*⁻, en fonction de la présence ou absence de la protéine bactérienne CagA codée par le gène *cagA* présent à l'extrémité de l'îlot *cag* (63). Cette protéine de 120 à 240 KDa est injectée à l'intérieur de la cellule épithéliale par le SSTIV. Une fois injectée, elle est phosphorylée par les kinases de la famille Abl et Src au niveau de la tyrosine des motifs glutamate-proline-isoleucine-tyrosine-alanine (EPIYA) ce qui va entraîner des altérations morphologiques cellulaires désignés par « becs de colibris » (68,69). La protéine CagA phosphorylée interagit avec plusieurs effecteurs à l'intérieur de la cellule hôte. Son association avec la tyrosine phosphatase SHP-2 induit l'activation des kinases ERK 1 et 2 (70). Le taux de CagA phosphorylée est régulé négativement par sa propre interaction avec l'extrémité C-terminale de la kinase Src (71). CagA perturbe également le cycle cellulaire de la cellule épithéliale via l'activation du facteur de

transcription AP-1 (72) qui est à l'origine de l'expression des proto-oncogènes tels que c-fos et c-jun. La protéine CagA non phosphorylée peut aussi avoir des effets pathogènes à l'intérieur de la cellule. Sa simple translocation entraîne l'activation aberrante de la β -caténine, des altérations au niveau des jonctions cellulaires apicales et une perte de polarité cellulaire (figure 6)(73).

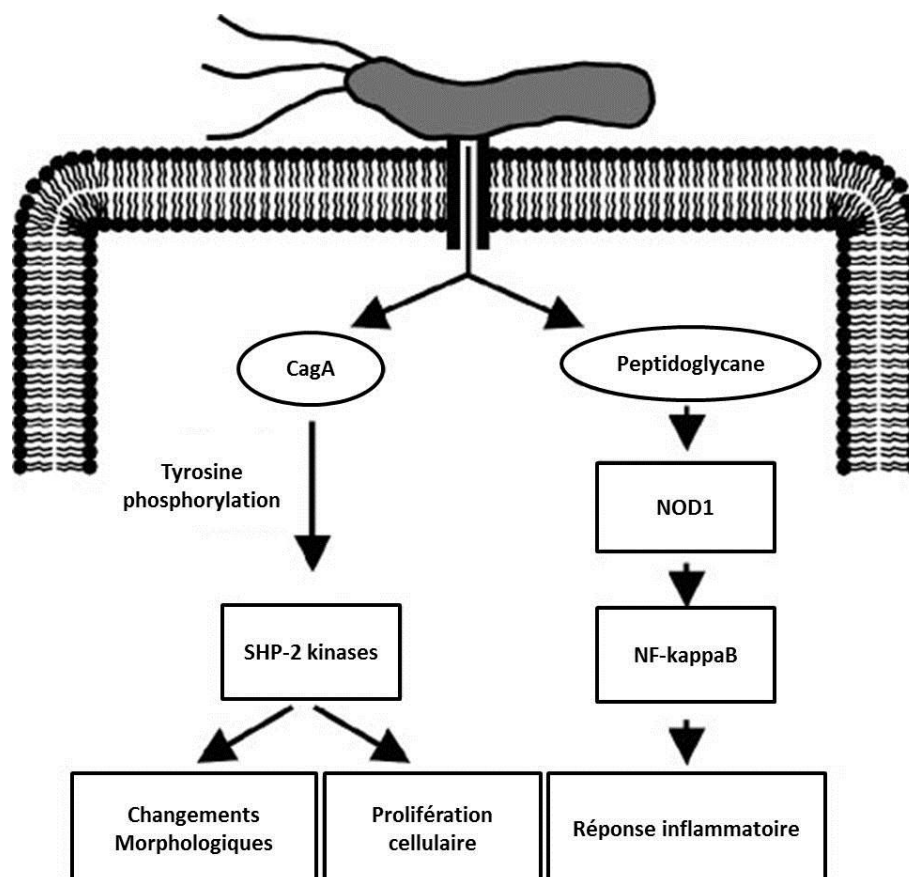


Figure 5 : Représentation schématique du rôle du système de sécrétion type IV dans les changements morphologiques, prolifération cellulaire et l'immunomodulation au cours de l'infection à *H. pylori*(modifié d'après Kusters, 2006) (36).

3. Le Peptidoglycane

L'interaction du peptidoglycane injecté par le SSTIV avec la molécule intracellulaire motifs-reconnaissante NoD1 détectrice du peptidoglycane enveloppant la paroi des bactéries à

gram négatif induit l'activation de réponses inflammatoires NF- κ B-dépendante entraînant la sécrétion de l'IL-8 (74) et la β -défensine 2 (75).

4. La toxine vacuolisante VacA

La cytotoxine vacuolisante VacA est codée par le gène *vacA* présent chez la majorité des souches d'*H. pylori*. Cette protéine hautement immunogène induit une vacuolisation intracellulaire *in vitro* (76) et est capable d'immunosuppression en bloquant l'activation des lymphocytes T ce qui contribue à la persistance et la longévité de l'infection (77). La séquence de VacA décrit un polymorphisme au niveau de deux régions, la région centrale (allèles *m1* et *m2*) et la région codant la séquence signal (allèles *s1* et *s2*). Les souches associant les allèles *s1/m1* présentent une forte activité cytotoxique alors que celles de génotype *s2/m2* n'ont pas d'activité cytotoxique (78). VacA altère la structure de la cellule épithéliale, agit sur le cycle cellulaire et joue un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire. Elle peut s'accumuler au niveau de la membrane interne des mitochondries induisant une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial, une libération du cytochrome c, l'activation des caspases 8 et 9 et l'induction d'apoptose (79, 80).

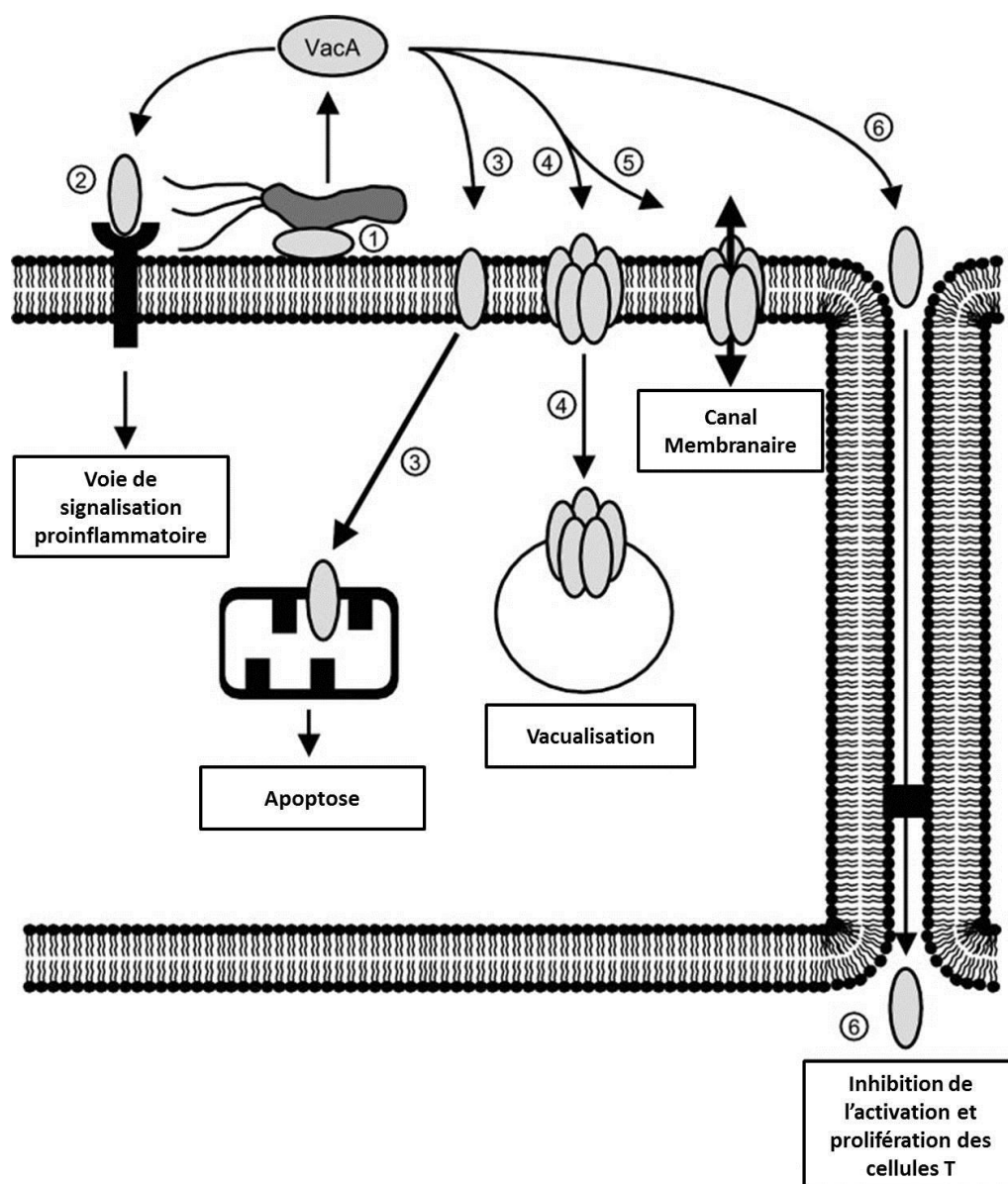


Figure 6: Différentes actions cellulaires de VacA au cours de l'infection chronique avec *H. pylori* (modifié d'après Kusters, 2006) (36).(1) Attachement de VacA à la surface de la cellule épithéliale, (2) Fixation de VacA sur son récepteur et initiation de la réponse inflammatoire, (3) Accumulation de vacA à la membrane mitochondriale et induction de l'apoptose, (4) Induction de la vacuolisation, (5) Formation d'un canal membranaire constitué de plusieurs molécules VacA entraînant une libération des nutriments hors de la cellule épithéliale, (6) Vac A traversant les jonctions serrées intercellulaires et inhibition de l'activation et prolifération des lymphocytes T.

5. Les Adhésines et protéines de la membrane externe (OMP, Outer membrane proteins)

L'adhérence d'*H. pylori* à l'épithélium gastrique facilite la colonisation, la persistance de l'infection et la délivrance des facteurs de virulence à l'intérieur des cellules épithéliales. Environ 4% du génome d'*H. pylori* code pour des protéines de la membrane externe dont l'expression est fortement associée aux pathologies gastroduodénales ce qui augmente le risque du cancer (81).

5.1. BabA (Blood group antigen binding adhesin)

BabA est une adhésine codée par le gène *babA2* qui se lie à l'antigène de groupe sanguin Lewis^b fucosylés situés à la surface des cellules épithéliales (82, 83). La présence de *BabA2* est associée à l'ulcère duodéal et au cancer gastrique (84).

5.2. SabA (Sialic acid binding adhesion)

SabA est une adhésine qui se lie à la structure sialylée de l'antigène du groupe Lewis^x exprimé à la surface des cellules épithéliales. Elle est associée au risque de développement de cancer gastrique mais pas au risque d'ulcère duodéal (85). L'expression de l'antigène sialylé Lewis^x est induite durant l'inflammation gastrique chronique, ce qui indique que *H. pylori* peut moduler les motifs de glycosylation des cellules de l'hôte pour améliorer l'adhérence et la colonisation (86).

SabA est régulée par variation de phase d'une façon à ce que son expression soit rapidement induite ou désactivée pour s'adapter aux changements de la niche gastrique (86).

5.3. OipA (Outer inflammatory protein)

OipA est une protéine membranaire inflammatoire de la famille OMP (87). La présence chez *H. pylori* du gène *oipA* fonctionnel est fortement associée aux ulcères duodénaux, au cancer gastrique et des infiltrations accrues de polynucléaires neutrophiles (85, 88). L'expression de OipA est associée à une production élevée d'IL-8 *in vitro* (89). OipA joue un rôle dans l'induction de l'inflammation gastrique et la production des cytokines

inflammatoires IL-1, IL-17 et TNF- α chez les gerbilles de Mongolie (90). OipA contribue également à l'induction de la métalloprotéase matricielle MMP-1 (matrix metalloproteinase) fortement associée au cancer gastrique (87).

5.4. DupA (Duodenal ulcer promoting gene)

Le gène *dupA* est situé dans la zone de plasticité du génome d'*H. pylori* et semble être un marqueur de virulence. *In vitro*, DupA augmente la production d'IL-8 (91). L'association entre la présence de *dupA* et le risque élevé de développement d'ulcère duodénal et/ou cancer gastrique est très variable entre différentes populations (41).

5.5. FlaA

H. pylori possède 3 à 5 flagelles unipolaires, engainés par une double couche phospholipidique. La rotation des flagelles assure la propulsion de la bactérie à travers le mucus gastrique très visqueux lui conférant ainsi la capacité de se mouvoir facilement dans la muqueuse. La rotation flagellaire est assurée par la protéine flagellaire motrice MotB codée par le gène *motB* (92). Les filaments flagellaires sont constitués d'un co-polymère de flagellines FlaA (sous-unité majeure) et FlaB (sous-unité mineure) (92). La présence d'une forme tronquée de FlaA due à une mutation du gène *flaA* diminue la mobilité d'*H. pylori* *in vitro*. *In vivo*, la présence de FlaA est indispensable pour la persistance de l'infection chez les rongeurs et porcelets gnotobiotiques (93). Contrairement à la flagelline des *Salmonelles* et autres pathogènes gram-négatifs, FlaA d'*H. pylori* possède une faible capacité pour activer le Toll-like receptor 5 (TLR5), ce qui permet à *H. pylori* d'échapper à la réponse immunitaire et persister dans la muqueuse gastrique (94, 95). La motilité d'*H. pylori* est désormais indispensable pour assurer une meilleure colonisation gastrique et contribue à la pathogénèse liée à la bactérie.

VIII. Déterminisme pathologique associé à *H. pylori*

L'évolution d'une infection asymptomatique à *H. pylori* ou d'une inflammation chronique vers des pathologies gastroduodénales plus sévères est la conséquence d'une interaction complexe entre les facteurs de virulence et diversité génétique de la souche bactérienne, les polymorphismes génétiques et prédispositions de l'hôte et les facteurs environnementaux.

Le déterminisme pathologique associé à *H. pylori* est donc dépendant des facteurs bactériens, de l'hôte et de l'environnement (Figure 7).

1. Facteurs bactériens

Les facteurs de virulence bactériens jouent un rôle déterminant dans l'issue de l'infection et ceci est dû à la vaste hétérogénéité génétique présente chez *H. pylori*. Les polymorphismes génétiques touchant *VacA* et *CagA*, parmi d'autres, influent l'évolution clinique de la pathologie. Les souches associant les allèles s1/m1 de *VacA* présentent une forte activité cytotoxique et sont associés aux lésions graves (96). La présence de *CagA* est également associée au développement d'ulcère duodéal et d'adénocarcinome gastrique (67).

2. Facteurs de l'hôte

Les facteurs de virulence bactériens ne sont pas les déterminants absolus de l'évolution de l'infection vers des stades pathologiques sévères. Les polymorphismes génétiques de l'hôte touchant les gènes impliqués dans la réponse inflammatoire sont associés à une prédisposition au cancer gastrique et sont impliqués le déterminisme pathologique.

IL1- β

La progression vers la carcinogenèse dépend de la nature de la réponse inflammatoire de l'hôte et d'une diminution de sécrétion gastrique d'acide. Une molécule qui interagit avec ces 2 paramètres est la cytokine proinflammatoire IL1- β dont l'expression est augmentée dans la muqueuse gastrique infectée par *H. pylori*(97). Les sujets ayant des polymorphismes d'expression élevée de l'IL1- β ont un risque plus élevé de développer une hypochlorhydrie, une atrophie gastrique et un adénocarcinome gastrique (98). De plus, l'IL-1 β semble moduler la sécrétion acide dans la muqueuse enflammée en la diminuant (99). L'augmentation

d'expression d'IL-1 β est également fortement associée à l'intensité de l'inflammation et atrophie gastriques (100). L'induction de l'IL1- β proinflammatoire au cours de l'infection à *H. pylori* associée à sa capacité d'inhibition de sécrétion acide et sa régulation par des promoteurs ayant des polymorphismes informatifs mettent en avant le rôle critique que joue cette cytokine dans le développement de cancer gastrique.

TNF- α

Le TNF- α est aussi une cytokine proinflammatoire inhibant la sécrétion acide et surexprimée au cours de l'infection à *H. pylori*. Les polymorphismes génétiques liés à cette cytokine sont associés au risque élevé de développement de cancer gastrique (98). La contribution du TNF- α au développement du cancer gastrique se fait probablement via des mécanismes de signalisation impliquant la voie de la β -caténine (101).

IL-10

Les polymorphismes réduisant l'expression des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 sont associés à un risque plus élevé de développement de cancer gastrique. Les effets combinatoires des polymorphismes touchant les gènes de l'IL1- β , TNF- α et IL-10 sur le développement de cancer a également été déterminé (98).

IL-8

Les polymorphismes génétiques touchant les gènes de la réponse immunitaire innée sont aussi lié à un plus grand risque de développement de cancer gastrique, tels que les polymorphismes de l'IL-8 ou du TLR-4 (41).

Les interactions entre les facteurs spécifiques de l'hôte et les facteurs bactériens d'*H. pylori* peuvent créer un environnement propice pour le développement d'autres espèces bactériennes, ce qui fait persister l'inflammation et l'induction continue de stress oxydatif augmentant ainsi le risque de cancer gastrique.

Cox-2

H. pylori active les enzymes proinflammatoires de la famille cyclooxygénases (Cox). Les cyclooxygénases catalysent des étapes clés dans la conversion de l'acide arachidonique en endoperoxide (PGH₂), substrat de nombreuses prostaglandines synthases qui catalysent la formation de prostaglandines (102). Les prostaglandines régulent une multitude de processus physiologiques, y compris l'immunité et le développement (102). L'expression de Cox-2 est inductible et stimulée par plusieurs facteurs de croissance et cytokines pro-inflammatoires telles

que le TNF- α , l'IFN- γ et l'IL-1 (103). L'expression de Cox-2 est augmentée in vitro en présence d'*H. pylori* et dans la muqueuse gastrique des sujets infectés (104). Cox-2 est également surexprimé au cours des lésions malignes. La capacité des produits de Cox-2 à promouvoir la néoplasie est démontrée. Ces molécules stimulent la prolifération cellulaire en inhibant l'apoptose ce qui induit une rétention des cellules mutagénisées, stimulent l'angiogenèse et la transformation cellulaire (105).

Sécrétion Acide

La pompe H⁺K⁺ ATPase est la pompe à proton gastrique primaire localisée dans des tubulovésicules dans le cytoplasme des cellules pariétales non stimulées. Après stimulation, la pompe H⁺K⁺ ATPase est recrutée vers la membrane apicale pour médier la sécrétion acide. *H. pylori* peut inhiber ou stimuler la sécrétion d'acide en fonction du contexte de l'infection. L'infection aiguë est souvent associée à une hypochlorhydrie résultant d'une surproduction de la cytokine proinflammatoire IL-1 β et l'inhibition du promoteur de la sous-unité α de la pompe H⁺K⁺ ATPase (106). VacA induit aussi une hypochlorhydrie via la protéolyse de l'eitrine ce qui perturbe les interactions entre le cytosquelette et la membrane apicale nécessaires pour la translocation de la pompe H⁺K⁺ ATPase pour assurer la sécrétion acide (107). *H. pylori* peut également diminuer la sécrétion acide en réprimant l'expression de la sous-unité α du gène codant l'H⁺K⁺ ATPase via l'activation et translocation de NF- κ B vers le noyau médié par ERK1 et 2 (107). L'infection chronique avec *H. pylori* peut induire une hypochlorhydrie ou une hyperchlorhydrie selon la distribution et sévérité de la gastrite. La gastrite touchant l'ensemble de l'estomac est généralement associée à une hypochlorhydrie pouvant évoluer vers un cancer gastrique. La gastrite à prédominance antrale au contraire, provoque une hyperchlorhydrie qui peut conduire au développement d'un ulcère duodéal (36).

3. Facteurs environnementaux

La consommation excessive de sel semble associée à un risque plus élevé de développement de cancer gastrique (41). Des travaux effectués chez les gerbilles de Mongolie montrent un effet synergique entre un régime alimentaire riche en sel et le développement de lésions malignes et du cancer gastrique d'une part (108) et l'augmentation de l'expression des cytokines proinflammatoires IL-1, IL-6 et TNF- α d'une autre part. Les mécanismes via lesquels le sel augmenterait le risque de développement de cancer ne sont pas entièrement

élucidés. Le sel diminuerait probablement le seuil pour la transformation maligne au niveau de l'épithélium gastrique et permettrait l'accès d'éléments carcinogènes dans le tissu gastrique par altération de la muqueuse. La production de cytokines en réponse à un régime riche en sel pourrait également contribuer au processus de carcinogène. Une possibilité intrigante soulevée récemment est la modulation de l'expression génique de *H. pylori* par le sel. Des études récentes montrent en effet une augmentation de l'expression de CagA en fonction de la concentration saline (109).

Le tabagisme augmente aussi le risque de développement de cancer gastrique. Les antioxydants naturels joueraient au contraire un rôle protecteur (41). Aujourd'hui il est clairement établi que les effets combinatoires de plusieurs facteurs environnementaux augmenteraient les risques de développement du cancer gastrique chez les sujets infectés par *H. pylori*.

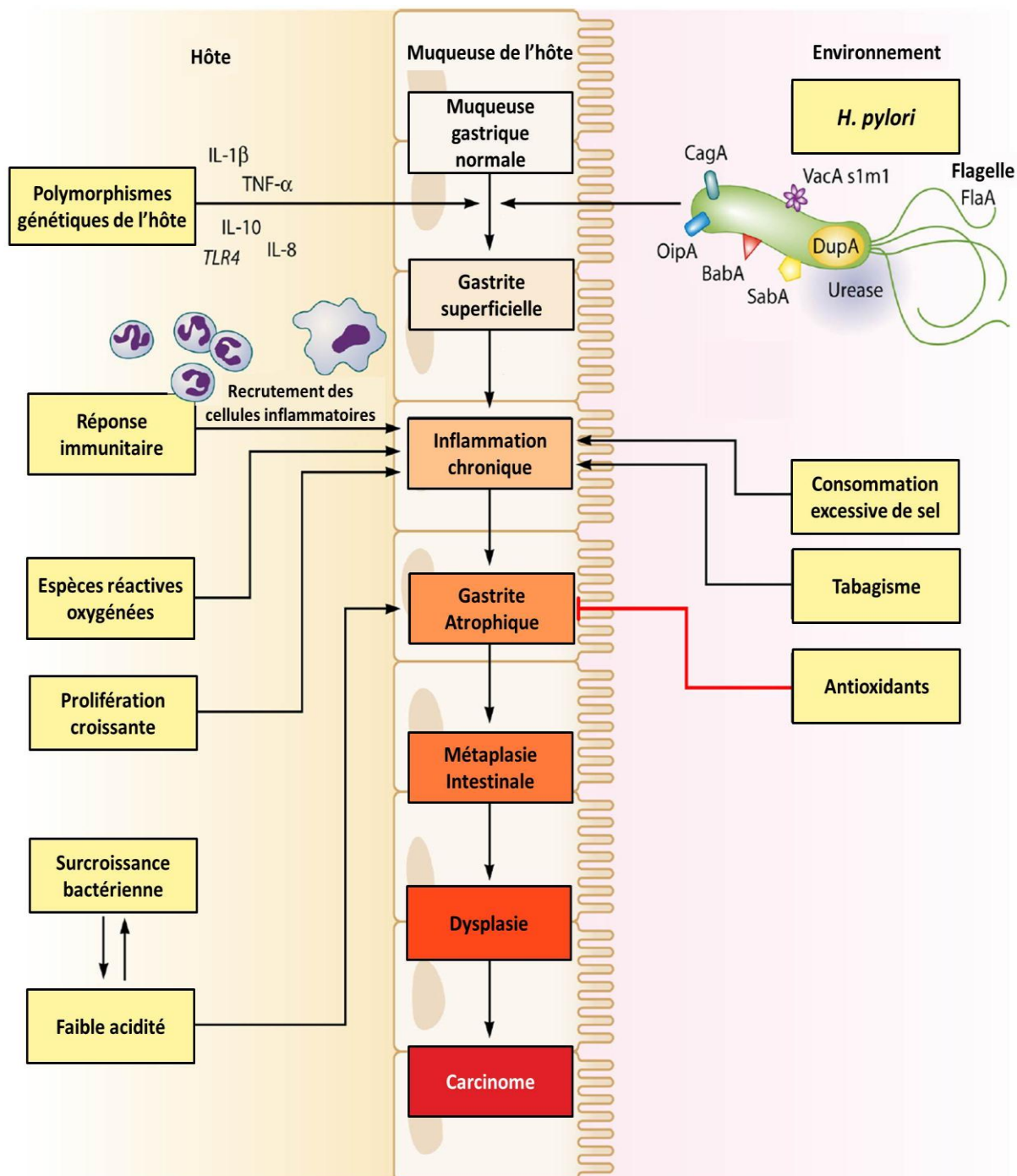


Figure 7 : Déterminisme pathologique lié à *H. pylori* (modifié d'après Wroblewski, 2010). L'évolution vers le cancer gastrique est la conséquence d'une interaction complexe entre les facteurs bactériens, de l'hôte et de l'environnement (41).

IX. Méthodes de diagnostic

Les méthodes permettant de faire le diagnostic d'une infection à *H. pylori* sont nombreuses et peuvent être regroupées en deux types : invasives nécessitant une biopsie de la muqueuse gastrique au cours d'un examen fibroscopique (examen anatomopathologique, culture, détection de séquences d'ADN spécifiques par PCR, recherche d'une activité uréasique) et non invasives (test respiratoire à l'urée marquée, détection d'antigènes dans les selles, sérologie, détection dans les selles de séquences d'ADN spécifique par PCR) (110). Les performances de ces techniques sont diverses et nécessitent une stratégie diagnostique associant plusieurs d'entre elles pour obtenir des performances diagnostiques optimales (tableau II). Certaines de ces techniques n'apportent que la notion de la présence ou non d'une infection à *H. pylori* (sérologie standard, antigènes dans les selles, test respiratoire, activité uréasique rapide). D'autres offrent la possibilité d'apprécier les conséquences de l'infection sur la muqueuse gastrique (anatomopathologie), d'établir l'antibiogramme et le typage de la souche infectante (culture), de rechercher certains gènes de résistance ou de virulence (culture, PCR sur biopsie ou sur selles). Le choix des techniques à mettre en œuvre sera en fonction de l'étendue nécessaire des résultats recherchés et de la possibilité ou non de réaliser une endoscopie (111).

Deux types de méthodes permettent de faire le diagnostic de l'infection à *H. pylori*, les méthodes dites directes ou invasives et les méthodes indirectes ou non invasives.

1. Méthodes invasives

Ces méthodes nécessitent habituellement la réalisation de biopsies gastriques effectuées lors d'une endoscopie gastroduodénale.

1.1.Examen bactériologique des biopsies

La culture est la méthode de diagnostic la plus spécifique. L'intérêt principal de la culture est la détermination de la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques et la recherche de marqueurs de virulence.

- **Prélèvement**

Deux biopsies, antrale et fundique, sont recommandées pour obtenir la meilleure sensibilité (110).

- **Milieus de transport**

H. pylori est très sensible à la dessiccation. Les biopsies gastriques doivent être acheminées rapidement au laboratoire dans un récipient stérile contenant 0,5 ml de bouillon thioglycolate ou de sérum physiologique stérile etensemencées dans les deux heures qui suivent le prélèvement. Au-delà, le prélèvement doit être stocké à 4°C dans un milieu de transport : bouillon Brucelle avec 20% de glycérol, milieu de transport de Stuart (Oxoid), Portagermpylori (bioMérieux). Si le délai dépasse 24 heures, la biopsie doit être acheminée congelée dans un tube sec. L'utilisation d'un container d'azote liquide est assez pratique entre l'unité de fibroscopie et le laboratoire (17).

- **Broyage des biopsies**

Les biopsies doivent être broyées soit à l'aide d'un broyeur de Potter, ou bien dilacérées au scalpel dans une boîte de Pétri stérile.

- **Examen direct**

Le produit de broyage est étalé en frottis sur une lame de microscope et coloré par la méthode de Gram. On peut également réaliser une empreinte par écrasement d'un fragment biopsique sur la lame. Il est préférable d'utiliser plutôt de la fushine comme contre colorant lors de la coloration de Gram que la safranine habituelle. *H. pylori* apparaît comme une bactérie incurvée, spiralée, à Gram négatif. Les bactéries sont parfois regroupées en banc de poisson. La lecture de la lame à fort grossissement en immersion doit être suffisamment prolongée pour conclure à la négativité de l'examen direct (16).

- **Ensemencement**

Le produit de broyage ou de dilacération est ensemencé en séparation sur milieu solide. La culture en milieu liquide est possible mais extrêmement difficile. Elle n'est donc pas recommandée pour l'isolement. Le milieu solide est constitué d'une base gélosée (milieu *Brucella*, cœur-cervelle, Columbia, Wilkins-Chalgren ou Mueller-Hinton) additionné de 10% de sang de cheval ou de mouton ou de sérum de veau fœtal. La base Columbia additionnée de

10% de sang de mouton convient à la plupart des souches. Les milieux commercialisés conviennent également (16).

Des mélanges sélectifs peuvent être utilisés pour inhiber la croissance des contaminants occasionnels. Le mélange de Skirrow utilisé pour l'isolement sélectif de *Campylobacter* est adapté à l'isolement sélectif de *H. pylori*. Il contient de la vancomycine (10 mg/L), du triméthoprime (5 mg/L), de l'amphotéricine B (2 mg/L) et de la polymyxine (2500 UI/L) (17).

- **Incubation**

Les géloses sont incubées à 37°C sous atmosphère humide et microaérobie, c'est à dire appauvrie en oxygène (5%). Cette atmosphère est obtenue dans une jarre étanche à l'aide de sachets générateurs d'atmosphère microaérobie (Campygen®, Oxoid). En subculture, de nombreuses souches poussent en atmosphère enrichie en CO₂ à 10% (16).

- **Isolement**

En primoculture les colonies apparaissent en 3 à 12 jours. Elles sont petites et luisantes. En subculture la croissance est plus rapide en 2 à 4 jours. Les primocultures doivent être incubées jusqu'à 12 jours et examinées tous les deux jours à partir du 3^{ème} jour. La transformation en forme coccoïde peut être rapide et diminue fortement la cultivabilité de la souche. Un réétalement sur la boîte d'isolement dès l'apparition des premières colonies permet une première amplification des souches à condition que la zone de réétalement ne contienne pas de contaminant. La subculture à partir de colonies isolées est très difficile à obtenir, bien plus qu'à partir de l'ensemble des colonies récoltées à l'écouvillon et déchargé dans 100 µL de bouillon Brucelle. Néanmoins l'obtention de clones purs à partir de colonies isolées a un intérêt puisque l'infection par plusieurs souches de *H. pylori* est possible (10% des cas) et surtout le mélange de clones résistants et sensibles aux antibiotiques de la même souche est également observé dans 10% des cas (17,112).

L'isolement de *H. pylori* est donc délicat. La positivité des autres techniques mises en œuvre (uréase, examen direct, PCR, histologie...) motivera la prolongation de l'incubation et surtout l'acharnement à obtenir la subculture des quelques colonies qui émergent sur la boîte d'isolement.

Le délai de réponse est de 3 à 12 jours en fonction des caractéristiques de la souche. La sensibilité de la culture dépend des performances du laboratoire et des conditions de transport. Elle est d'au moins 95 % si l'on prend pour référence le test respiratoire (16).

- **Identification bactériologique**

L'identification du genre et de l'espèce *H. pylori* ne pose pas de problème. Les exigences culturales (microaérophilie, gélose au sang, milieu sélectif), l'aspect spiralé à l'observation microscopique après coloration de Gram d'une colonie étalée sur une lame permettent d'identifier *Helicobacter*. La présence d'une activité catalasique, oxydasique et uréasique forte permettent l'identification de l'espèce *pylori*. Les *Helicobacter* non *pylori* ne poussent pas dans les conditions décrites. Seul *H. helmannii* peut infecter l'estomac humain mais sa morphologie en tire-bouchon est caractéristique (1,6).

- **Test à l'uréase au laboratoire**

Si l'activité uréasique n'a pas été recherchée au lit du malade, une partie du produit de broyage peut être mise en suspension dans 100 µl de milieu urée indole et placé à 37°C. Le virage colorimétrique observé dans les heures qui suivent l'ensemencement permet de suspecter la présence de *H. pylori*. La sensibilité de ce test est faible puisque 68% des biopsies pour lesquelles la culture sera positive présente une activité uréasique. Les faux positifs sont extrêmement peu nombreux, de l'ordre de 1,5%, même quand l'incubation est prolongée jusqu'au lendemain. Ce test rapide a l'avantage au laboratoire de motiver, quand il est positif, un réexamen soigneux de l'examen direct initialement jugé négatif (113).

- **Congélation, envoi de souches**

H. pylori peut être conservé plusieurs années à – 80°C en bouillon brucelle supplémenté de 20% de glycérol. Il est conseillé de congeler des cultures de moins de 48h contenant moins de 10% de formes coccoïdes (111).

1.2.Examen anatomopathologique des biopsies

L'examen histologique des biopsies permet de détecter *H. pylori* à la surface de la muqueuse ou dans les cryptes gastriques. Divers colorations sont utilisables, en particulier les colorations de Giemsa modifiée (la plus utilisée en pratique), et à l'hématoxyline-éosine (moins performante mais habituelle pour l'examen anatomopathologique) (110). Le diagnostic anatomopathologique est une très bonne méthode diagnostique (spécificité et sensibilité supérieures à 90%) (111, 112). Ces résultats sont cependant optimisés par la lecture des lames par un anatomopathologiste expert, ce qui paraît difficile dans la plupart des laboratoires

d'anatomopathologie. Un anatomopathologiste expérimenté utilisera l'inflammation présente, témoin de l'infection et analysera plus longtemps les biopsies apparemment négatives. La limite de cette technique est la qualité de la biopsie, qui peut être trop petite, mal orientée, mal fixée ou mal colorée. De plus, son délai de réponse supérieur à 24 heures ne permet pas la prescription d'un traitement au décours immédiat de l'endoscopie.

1.3. Test rapide à l'uréase

Le plus courant est le CLO-Test qui consiste à déposer un fragment de biopsie gastrique dans un milieu contenant de l'urée à pH=5 et des produits bactéricides sans incidence sur *H. pylori* (113). La production d'ammoniac grâce à l'importante activité uréasique de la bactérie entraîne une augmentation du pH et le virage au rose du rouge de phénol utilisé comme indicateur coloré. Ce test, peu coûteux, est très précieux pour le diagnostic rapide de l'infection car il peut être effectué par le clinicien lors de l'endoscopie mais la sensibilité est mauvaise en cas d'infection de faible intensité (on considère qu'il faut au moins 10^4 - 10^5 CFU/ml pour positiver le test) et après 24 heures, les bactéries uréase positive contaminantes de l'estomac peuvent donner des faux positifs.

1.4. Amplification génique (PCR)

Cette technique permet la détection de séquences d'ADN spécifiques de *H. pylori* dans des prélèvements gastriques (biopsies, suc, mucus) ou autres (salive, plaque dentaire, selles) (113). Cependant cette méthode ne permet pas d'affirmer la présence de bactéries viables. Son intérêt réside dans la détection de bactéries présentes en faible concentration (suivi post-thérapeutique). La PCR permet également de détecter, à partir de biopsies gastriques, des mutations chromosomiques responsables de la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones, et peut servir de moyens de typage dans les analyses épidémiologiques. La sensibilité et la spécificité de cette technique sont de l'ordre de 95% (112).

Malgré tous les problèmes liés à la PCR (risque de contamination, nécessité de personnel qualifié et de matériel spécialisé), cette technique s'avère être une bonne alternative à la culture dans le domaine du diagnostic de l'infection à *H. pylori*.

2. Méthodes non invasives

2.1. Test sérologique

Ce test est basé sur la recherche d'anticorps anti-*H. pylori* retrouvés dans le sérum : les IgG (114). Elles apparaissent 1 à 3 mois après le début de l'infection et persistent tout au long de la maladie. Ensuite, elles vont progressivement diminuer après l'éradication et se négativer en 6 mois à 2 ans.

La sérologie est utilisée dans le suivi thérapeutique et permet d'évaluer l'efficacité thérapeutique. L'efficacité d'une éradication thérapeutique s'accompagne d'une diminution significative (50% en 6 mois) des immunoglobulines circulantes (115). Plusieurs types de réactions sérologiques sont utilisés :

- ▶ L'agglutination passive
- ▶ La réaction immunoenzymatique : ELISA (le plus fréquent)
- ▶ L'immunoempreinte ou Western-Blot

2.2. Test respiratoire à l'urée marquée

Ce test permet de détecter une infection active. Son principe repose sur la mesure dans l'air expiré de la quantité de CO₂ marqué le plus souvent au carbone 13, isotope stable, suite au passage du CO₂ marqué dans la circulation sanguine. La formation du CO₂ résulte de l'hydrolyse gastrique par l'uréase de *H. pylori* d'urée enrichie en carbone 13 (C13) ingérée par le patient (113). L'air expiré est recueilli à 0 et 30 minutes. Ainsi en comparant la quantité de CO₂ marqué contenu dans l'air expiré, il est possible de prouver si le sujet est infecté ou non par *H. pylori*. La sensibilité et la spécificité de ce test sont supérieures à 95%. Les faux négatifs peuvent être dus à un traitement antibiotique, par inhibiteurs de la pompe à protons, par les sels de bismuth ou par le sucralfate (116). Ceci implique l'arrêt de ces types de traitement deux semaines avant le test. Malgré des données montrant la relation entre l'importance de l'excrétion du CO₂ marqué et l'importance de l'infection par *H. pylori*, le test respiratoire à l'urée reste un test qualitatif.

2.3. Recherche d'antigènes bactériens dans les selles

La détection d'antigènes de *H. pylori* dans les selles peut être effectuée à l'aide d'un test immunoenzymatique (Elisa). Les performances de ce test semblent prometteuses puisqu'il présente une sensibilité de 94% et une spécificité 93% en comparaison avec les tests classiques de diagnostic (anatomopathologie, test à l'uréase, culture) (113). Ce test pourra être utilisé en routine mais également pour les études épidémiologiques, notamment chez les enfants en raison de son caractère non invasif.

2.4. Détection des anticorps dans la salive ou les urines

La détection des anticorps dans la salive ou les urines serait utilisable au cabinet du médecin. Toutefois, la sensibilité et la spécificité de ces tests sont plus faibles que ceux de la sérologie. Ils n'ont actuellement pas de place en pratique courante (113).

2.5. Détection de séquences d'ADN spécifiques de *H. Pylori* dans les selles par PCR

Plusieurs publications récentes ont proposé cette technique non invasive. La difficulté due à la présence extrêmement fréquente d'inhibiteurs d'amplification dans les selles est contournée par l'utilisation soit de billes magnétiques (Dynabeads, DynalBiotech) recouvertes d'anticorps anti-*H. pylori* permettant d'extraire les *H. pylori* des matières fécales et de les séparer des inhibiteurs, soit de kit d'extraction sur colonne utilisant des anti-inhibiteurs (Qiaamp DNA Stool, Qiagen). Ces techniques d'extraction permettent ensuite d'amplifier par PCR des cibles spécifiques de *H. pylori*. Cette méthode non invasive semble prometteuse et demande à être validée en routine (113).

3. Indication des différents tests diagnostiques

Aucun test à lui seul n'est idéal pour la détection d'une infection active à *H. pylori*. Une combinaison de deux tests ayant une bonne sensibilité et spécificité est recommandée.

- **Dépistage de *H. pylori* sans pratique de biopsie :**

Les tests non invasifs sont recommandés chez les dyspeptiques jeunes, les personnes âgées, les enfants et les malades non coopérants. Cette stratégie du « test and treat » réduit le coût de prise en charge d'une infection à *H. pylori*. Elle utilise un test non invasif et un traitement empirique de 7 à 14 jours. Cette stratégie est très économique mais son efficacité est fortement entamée par l'augmentation des résistances aux antibiotiques responsables d'échecs thérapeutiques (111).

La recherche d'antigènes dans les selles ou le test respiratoire sont les méthodes non invasives les plus utiles dans cette indication.

- **Diagnostic de l'infection à partir de prélèvement de muqueuse gastrique :**

L'examen anatomopathologique est le test le plus simple et le plus sensible. Les tests à l'uréase permettent un diagnostic rapide après l'endoscopie autorisant, si cela est justifié, la prescription immédiate d'un traitement d'éradication. Le diagnostic par culture ou PCR est malheureusement rarement effectué en pratique courante. L'extension de sa disponibilité s'avère nécessaire du fait de l'augmentation de la fréquence des résistances. Les modalités d'acheminement des prélèvements auprès de laboratoires de bactériologie devraient être organisées. La PCR est un complément intéressant pour sa rapidité et pour renforcer l'attention du bactériologiste aux cultures en cours en cas de positivité (112).

La combinaison de ces différentes techniques apporte une sensibilité optimale et des notions complémentaires indispensables à l'appréciation globale de l'infection : lésions macroscopiques, localisation, histologie (métaplasie, dysplasie), sensibilité aux antibiotiques, marqueurs de virulence.

- **Contrôle de l'éradication :**

Seuls les tests non invasifs permettant de détecter une infection active ont un intérêt. La sérologie n'a donc pas d'indication dans le contrôle précoce de l'éradication. Les tests doivent être réalisés 4 à 6 semaines après la fin d'un traitement antisécrétoire ou antibiotique. Le test respiratoire à l'urée marquée a une sensibilité de plus de 87 % dans cette indication. S'il n'est pas disponible, la recherche d'antigènes dans les selles doit être proposée (4).

Tableau II : Méthodes de diagnostics de l'infection à *Helicobacter pylori*(113)

Méthodes diagnostiques	Sensibilité	Indications
Invasives (biopsies) <ul style="list-style-type: none"> • Ana-path • Culture • PCR • Uréase 	<ul style="list-style-type: none"> > 95% > 95% > 95% 80% 	Celles de l'endoscopie Systématique si biopsie A associer à ana-path nécessaire car résistances Complément de la culture Au lit du patient
Non invasives <ul style="list-style-type: none"> • Test respiratoire • Ag dans les selles • Sérologie 	<ul style="list-style-type: none"> > 95% > 90% 80-90% 	« Test and treat » et contrôle d'éradication Etudes épidémiologiques

X. Sensibilité aux antibiotiques et résistances:

1. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques:

L'isolement d'*H.pylori* n'est pas facile du fait, de sa culture lente et de sa propension à se transformer en forme coccoïde lorsque les conditions ne sont pas optimales. Les méthodes classiques de détermination de la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques sont : la méthode de dilution agar et la méthode en diffusion (Epsilon-meter-test (E-test), disques d'antibiotiques). D'autre part, l'émergence, depuis plusieurs années, de résistances aux antibiotiques de cette bactérie, justifie la réalisation d'un antibiogramme lorsque c'est possible, a fortiori, après un échec thérapeutique. Aussi, des techniques ont émergé reposant sur la biologie moléculaire et visant à dépister les résistances notamment à la clarithromycine et aux fluoroquinolones. Celles-ci permettent de s'affranchir de la culture fastidieuse, de raccourcir le délai de rendu des résultats et d'avoir une bonne fiabilité.

1.1.Méthode de dilution en milieu gélosé :

La dilution en agar est considérée comme la méthode de référence. Elle a fait l'objet de standardisations et de recommandations par le Clinical Laboratory Standards Institute américain et par l'European *H. pylori* Study Group. Elle est utilisable lors des études épidémiologiques mais elle n'est pas adaptée à une pratique quotidienne (117).

1.2.Méthode en diffusion :

Le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) édite des recommandations visant à uniformiser la détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries. Pour *H. pylori*, elle est effectuée à partir d'un inoculum bactérien d'environ 10^9 bactéries/ml soit 3 MacFarland (McF). Au préalable, il convient de vérifier la présence de moins de 10 % de formes coccoïdes au sein de la culture. L'ensemencement se fait par inondation ou écouvillonnage sur un milieu Muller Hinton vieilli, additionné de 10% de sang

de cheval. La lecture se fait après 72h d'incubation à 35/37°C en micro-aérobiose; la recherche des doubles populations se fait à J4.

Les antibiotiques à tester en première intention sont l'Erithromycine (disque de 15UI), la ciprofloxacine (disque de 5µg). En cas de diamètre inférieur à 20 mm pour la ciprofloxacine, une détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est nécessaire par méthode Epsilometer (E)-test. Les résultats obtenus pour la ciprofloxacine sont valables pour la lévofloxacine et la moxifloxacine. Compte tenu de la faible résistance à l'amoxicilline, il n'est pas recommandé de tester cet antibiotique (CASFM 2014)(18). Par ailleurs, du fait du manque de concordance entre résistance in vitro et in vivo pour le métronidazole, il n'est pas recommandé de le tester en routine (18, 17,118).

1.3. Techniques de biologie moléculaire:

Les techniques moléculaires ont été surtout développées pour la détection des mutations conférant la résistance à la clarithromycine et aux fluoroquinolones, elles permettent une détection en quelques heures de la résistance au lieu de quelques jours pour l'antibiogramme classique. Après une extraction de l'ADN, le fragment du gène où est localisée la mutation est amplifié par PCR. La détection de la mutation est ensuite réalisée par restriction enzymatique (RFLP) ou à l'aide de sondes spécifiques. Différentes techniques de PCR temps réel ont été proposées raccourcissant encore le délai de réponse. Utilisées directement sur les biopsies gastro-duodénales, elles fournissent un résultat deux heures après la réception de la biopsie au laboratoire (112, 118).

2. Résistance aux antibiotiques:

2.1. Résistance naturelle :

H. pylori est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques : glycopeptides, sulfamides, triméthoprime, polymyxines, acide nalidixique, streptogramines, cefsulodine et anti-fongiques : nystatine, amphotéricine B et cycloheximide (118). Ceux-ci peuvent d'ailleurs être utilisés, afin de créer des milieux sélectifs. Du fait de son grand polymorphisme, *H. pylori* a également des résistances acquises qui relèvent majoritairement de mutations ponctuelles.

2.2. Résistance acquise:

Cette résistance concerne essentiellement les antibiotiques utilisés dans les protocoles d'éradication de la bactérie à savoir, la clarithromycine, le métronidazole, la ciprofloxacine, la rifabutine et la tétracycline. Les données varient d'un pays à l'autre en raison de politiques de prescription et de consommation d'antibiotiques différentes. Il semble que cette résistance soit liée essentiellement à l'utilisation de ces antibiotiques dans d'autres indications que l'éradication d'*H.pylori* et à une mauvaise compliance. Par exemple, pour la clarithromycine, elle serait en rapport avec sa prescription dans les infections respiratoires lorsqu'un germe atypique est suspecté (119, 120). En ce qui concerne le métronidazole, la résistance chez l'enfant ne semble pas être en rapport avec la prise de cet antibiotique prescrit dans les infections digestives, gynécologiques à germes anaérobies ou parasitaires comme c'est le cas pour l'adulte. Il semble que ces enfants soient porteurs de souches acquises auprès de leurs parents, ayant déjà le phénotype résistant (119). Il existe un lien entre résistance au métronidazole et origine géographique : la prévalence étant plus élevée chez les enfants d'origine africaine (121) ou les patients immigrés (120). Néanmoins, la tendance globale est à l'augmentation de la résistance primaire et secondaire de *H. pylori* aux antibiotiques.

2.2.1. Résistances à la clarithromycine

La résistance à la clarithromycine est la cause majeure des échecs d'éradication (122). Elle a un impact négatif dans la stratégie thérapeutique. Elle est actuellement de 20% en France, les taux d'éradication par trithérapie sont aujourd'hui inférieurs à 70 % (123, 124, 125).

La résistance à la clarithromycine était déjà évoquée dans les années 2000 comme un problème futur d'échec thérapeutique mais aucune recommandation particulière pour privilégier un autre antibiotique n'avait été prononcée. En France, deux études datées de 1996-1997 et 1999-2001 ont d'ailleurs confirmé ce fait, avec des taux de résistance respectifs estimés à 14.5% et 18.1 % soit une augmentation de 3.5% en quatre à cinq ans (117). La prescription a donc continué de croître et ce, dans diverses indications pathologique. En conséquence, la résistance à la clarithromycine s'est intensifiée par la diffusion croissante des macrolides notamment dans les pathologies respiratoires, et en particulier chez les enfants (otites, angines).

En Europe, les taux de résistance bactérienne sont très variables. Les pays du nord, par exemple les Pays-Bas, ont un taux de résistance plus faible de l'ordre de 5.6% que dans les pays du sud (31% au Portugal), s'expliquant par une utilisation plus raisonnée des antibiotiques dans les pays nordiques (48). Les macrolides induisent l'arrêt de l'élongation de la chaîne peptidique en se fixant sur la boucle peptidyl transférase du domaine V de l'ARN ribosomique 23S. Le mécanisme de résistance aux macrolides est bien connu se caractérisant par des mutations ponctuelles au niveau des gènes codant pour l'ARN ribosomal 23 S. ces mutations, en modifiant la structure des ribosomes, diminuent l'affinité des antibiotiques pour leur cible ribosomale et confèrent à la bactérie une résistance croisée pour les différents macrolides. Une seule mutation est donc suffisante pour obtenir un haut degré de résistance. Les trois mutations les plus fréquentes A 2142G, A 2143G, A 2142 C sont responsables de plus de 90% des cas de résistance à la clarithromycine (126,127).

2.2.2. Résistance au métronidazole

La résistance au métronidazole concerne plusieurs gènes. La plus représentée est la mutation du gène *rdxA* codant pour une nitroréductase indispensable à l'activation de l'antibiotique dans le cytoplasme bactérien. Des mutations sur d'autres gènes (*frxA* et *fdxB*) sont également impliquées dans les résistances aux nitro-imidazolés (13). Le grand nombre de mutations n'a pas permis d'établir des tests moléculaires pour leur détection (128). Les résistances sont déterminées par l'établissement de l'antibiogramme.

Actuellement, la résistance primaire au métronidazole est de 40 à 60 % en France (123) et s'est maintenue à ce niveau durant ces dix dernières années. Dans les pays en voie de développement, la prévalence de la résistance reste élevée (50-80%), le métronidazole étant très utilisé pour traiter certaines parasitoses (129). En Europe, les taux de résistance sont plus élevés dans l'Ouest (43%) (48).

2.2.3. Résistance à la lévofloxacine

La cible des fluoroquinolones est l'ADN gyrase. Elle est constituée de deux sous-unités A et B codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*. La résistance est liée à la survenue de mutations ponctuelles dans une région particulière du *gyrA* : la Quinolone Resistance Determining Region (QRDR) (128, 130). Comme pour la clarithromycine, cette résistance est associée à des taux d'échecs d'éradication importants. Elle ne peut être surmontée par une augmentation des doses ou de la durée de traitement (131).

L'émergence de la résistance à la lévofloxacine est récente. Depuis quelques années elle pose également problème et semble se développer très rapidement depuis dix ans. La prévalence était évaluée à 3-4% en France dans les années 1990 (132). Une nette augmentation du taux de résistance primaire a été observée entre la 2004-2005 (7.3%) et 2006-2007 (14.1%) (123). Dernièrement, la prévalence a été évaluée à 18% lors d'une étude européenne multicentrique (48), cette croissance est en corrélation avec l'utilisation accrue des fluoroquinolones dans le traitement de certaines infections (ORL, urinaire). Cette augmentation est particulièrement inquiétante puisque la lévofloxacine est utilisée lors des traitements de recours dans les stratégies d'éradication (128).

2.2.4. Résistance à l'amoxicilline :

Cette β -lactamine est la seule à être utilisée dans le traitement de *H. pylori*. La résistance est peu fréquente. En 1999, un essai multicentrique européen ne retrouvait aucune résistance parmi les 485 isolats testés (133). Depuis, on assisterait à une augmentation de cette résistance, en 2010, De Francesco et al. rapportent, dans une revue de la littérature de 2006 à 2009, un taux de résistance primaire mondial à cet antibiotique de 11,2%. Cependant, en Europe, sur 599 isolats testés à travers 2 études, le taux reste inférieur à 1 %. Les données concernant les continents asiatiques et africains sont hétérogènes avec d'importantes variations d'un pays à l'autre, et la méthodologie utilisée est parfois discutable (120). Aussi, le CASFM ne recommande pas, à ce jour, la recherche en routine de cette résistance (CASFM 2011). Le support génétique de cette résistance, serait la modification des protéines de liaison aux pénicillines, cibles des β -lactamines, notamment via des mutations au niveau du gène *pbp-1a* (118). Il n'a pas été mis en évidence de β -lactamases chez *H. pylori* (117).

2.2.5. Résistance à la tétracycline:

Cet antibiotique agit en se liant à la sous-unité 30S ribosomale, interférant ainsi avec la liaison de la protéine. Il semble que cela soit un des rares antibiotiques pour lequel on puisse incriminer un rôle de l'efflux dans la survenue de résistance chez *H. pylori* (118). Néanmoins, des mutations ponctuelles sont également responsables de cette résistance, notamment des mutations au sein de triplets AGA en positions 926 à 928. Il semble qu'il faille 3 mutations pour obtenir une vraie résistance, ceci explique sa rareté (118). Efflux et mutations aboutissent à un défaut d'accumulation de l'antibiotique dans la bactérie. Dans la revue de la littérature de De Francesco et al, elle est retrouvée à 5,9 % avec une grande disparité entre l'Afrique où elle atteint 43,9% et le reste du monde où elle oscille entre 2 et 3% (120).

2.2.6. Résistance à la rifabutine:

Cet antibiotique agit via l'inhibition de la sous-unité B de l'ARN polymérase ADN-dépendante. Sa résistance est liée à la survenue de mutations ponctuelles au sein du gène *rpoB* de la bactérie (118). Peu de données sont disponibles, 2 études sur les 31 répertoriées par De Francesco et al, rapportent une résistance à cet antibiotique : en Angleterre 6,6 % de résistance parmi 255 isolats, et en Allemagne, 1,4 % sur 1585 isolats testés(120). De plus, il convient d'être prudent dans la prescription de cet antibiotique car il fait partie des molécules utilisées dans la quadrithérapie anti-tuberculeuse. Il pourrait sélectionner des souches de Mycobactéries résistantes (128,134).

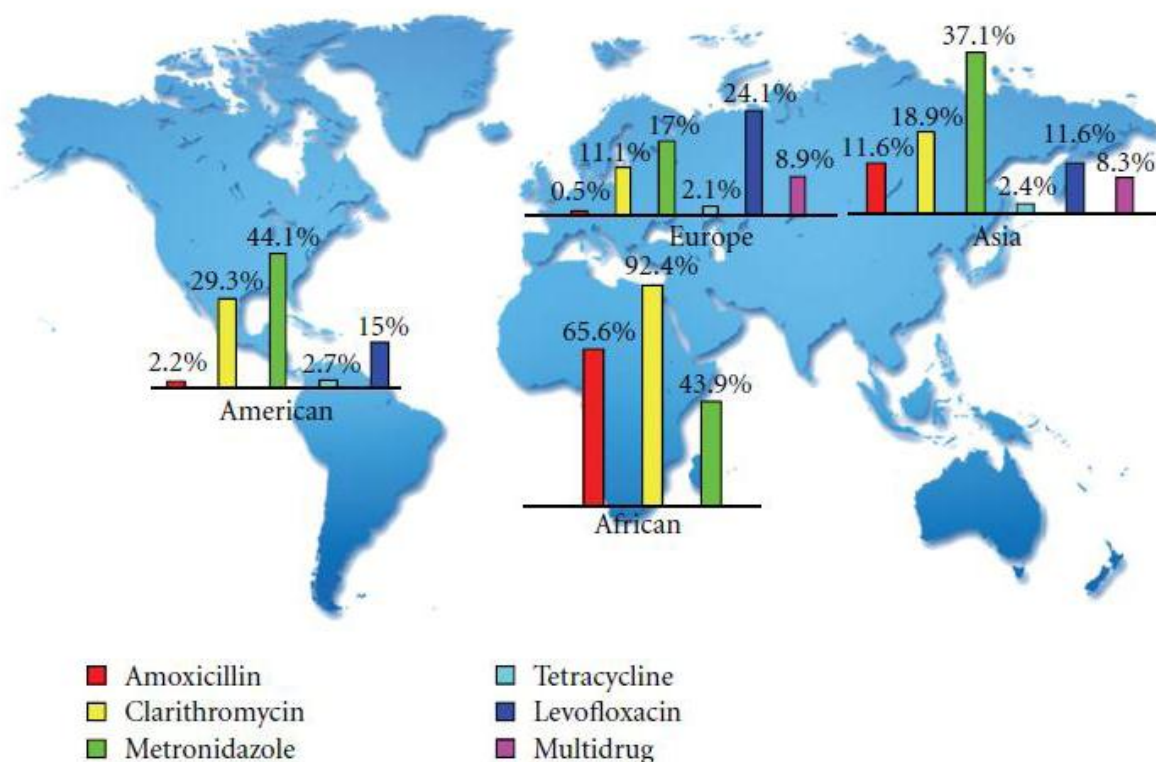


Figure 8 : Résistance aux antibiotiques dans le monde (132)

XI. Traitement :

Comme nous l'avons vue, l'implication de *H. pylori* dans la survenue de pathologies multiples gastroduodénales ou hématologiques, cancéreuses ou non, justifie, lorsqu'il est mis en évidence, l'instauration d'un traitement. Dès lors, à travers de nombreuses études menées, des recommandations ont été dictées, définissant quels sont les patients relevant d'un dépistage de l'infection bactérienne. La V^{ème} conférence de consensus de Maastricht, de 2016, est la dernière en la matière (135). Elle stipule qu'il convient de rechercher et de traiter la bactérie chez les patients présentant un parent au premier degré avec antécédent de cancer gastrique, les patients avec une pathologie ulcéreuse, une gastrite, une atrophie gastrique, un cancer gastrique, post-gastrectomie pour cancer ainsi qu'une anémie ferriprive sans autre étiologie retrouvée ou un PTI (51,55). Par ailleurs, il en est de même chez les patients traités par IPP au long cours, associés ou non à des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), ainsi que chez le patient sous AINS au long cours avec antécédent d'ulcère hémorragique ou non (13).

Chez l'enfant, il n'y a pas d'indication à rechercher et traiter une infection dans le contexte de douleurs abdominales récurrentes, les recommandations chez l'adulte s'appliquent à l'enfant (13, 31). Enfin, les patients présentant un syndrome dyspeptique peuvent relever d'une prise en charge «test and treat»: à savoir que, si le patient est âgé de moins de 45 ans, un test non invasif positif suffit à déclencher la prescription d'un traitement d'éradication (13).

Ce traitement repose sur la prescription d'un IPP simple dose, 2 fois par jour, qui permet de diminuer la sécrétion acide, et de favoriser l'action des antibiotiques. Deux

antibiotiques sont classiquement associés : la clarithromycine et l'amoxicilline aux doses respectives de 500mg × 2 et 1g × 2, en 2 prises par jour, pendant 7 à 14 jours. L'association des

antibiotiques repose sur le fort taux de mutations de la bactérie et sert à limiter l'émergence de résistants, comme c'est également préconisé pour le groupe *Mycobacterium tuberculosis*. Cette trithérapie est d'autant plus efficace qu'administrée plus de 7 jours (8). De nombreuses études confortent cette constatation selon laquelle 10 voire 14 jours de traitement sont plus efficaces que 7 jours. En cas de contre-indications à la clarithromycine, le métronidazole peut-être prescrit, 400 à 500mg × 2/jour (13). Ces recommandations sont valables dans les pays où la résistance à la clarithromycine est inférieure à 15 à 20%, sinon le métronidazole lui est substitué (136). Si le taux de résistance au métronidazole est inférieur à 40%, l'association clarithromycine-métronidazole est préférée (137). En deuxième intention, la quadrithérapie à base de bismuth, tétracycline, métronidazole et IPP est recommandée dans les pays où elle est disponible, sinon, une triple thérapie composée d'IPP et amoxicilline, métronidazole, tétracycline est possible. Cette quadrithérapie à base de bismuth présente un intérêt dans les régions où le taux de résistance à la clarithromycine et au métronidazole est élevé (138), et où l'on évitera la prescription de clarithromycine sans antibiogramme. En troisième ligne, le recours à la lévofloxacine ou la rifabutine est possible. En cas d'échec d'éradication, la recherche de résistances prend tout son sens (13). La mise au point de l'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (afssaps) de 2005 concernant : la prise en charge thérapeutique de l'éradication de *H. pylori* chez l'adulte et l'enfant, recommande, en première intention, le même schéma thérapeutique avec, en cas de contre-indication aux b-lactamines ou à la clarithromycine, l'administration de métronidazole en association respectivement à la clarithromycine ou à l'amoxicilline pendant 7 à 14 jours . En seconde intention, un traitement par IPP,

amoxicilline, métronidazole peut-être prescrit pendant 14 jours. Après échec de ces associations, les fluoroquinolones peuvent être proposées (139). Les anti-sécrétoires n'ont leur place que dans l'allergie, rare, aux IPP.

Compte tenu de l'émergence de ces résistances à l'origine d'échecs d'éradication de la bactérie dans le Monde entier, il est devenu nécessaire de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, initialement les trithérapies permettaient l'éradication de la bactérie dans 90 % des cas, actuellement, elle est observée dans 70 % des cas (134). Parmi ces nouvelles stratégies : la thérapie séquentielle, dont l'objectif est de passer outre cette résistance à la clarithromycine, facteur principal limitant de l'éradication (134). Une méta-analyse retrouve une supériorité du traitement séquentiel par rapport au traitement standard, avec une efficacité chez 2747 patients jamais traités, de 93,4 % versus 76,9 % respectivement (140). Ce traitement repose sur l'administration pendant les 5 premiers jours d'une association : amoxicilline 1g × 2 et IPP simple dose × 2, puis pendant les 5 jours suivant, d'une association IPP, clarithromycine 500mg × 2 et métronidazole 500 mg × 2 (136). Dans cette méta-analyse, l'observance était de 97,4 % avec le traitement séquentiel contre 96,8 % avec le standard, les effets indésirables étaient comparables. Malfertheiner et al., en 2011, dans un essai double aveugle comparant la trithérapie standard pendant 7 jours et une quadrithérapie à base de bismuth pendant 10 jours, chez des patients européens naïfs de tout traitement, montrent la supériorité de la quadrithérapie (138). Peu d'effets indésirables liés au bismuth ont été notés et la galénique sous forme d'une capsule combinant le bismuth aux deux antibiotiques, rend l'observance plus aisée. Ainsi, ces schémas thérapeutiques pourraient offrir une nouvelle perspective de traitement de l'infection. Certaines études s'intéressent au rôle des probiotiques notamment les lactobacilles qui sembleraient augmenter les taux

d'éradication de la bactérie et diminuer la survenue des effets indésirables liés au traitement (141).

De plus, les résultats du traitement concomitant sont améliorés par une prolongation de la durée du traitement à 14 jours. Les méta-analyses des essais contrôlés ont montré que les taux d'éradication en intention de traiter étaient proches de 90 % (135). Comme pour les traitements de 10 jours, une méta-analyse a montré que les traitements concomitants de 14 j étaient supérieurs aux traitements séquentiels (4). La quadrithérapie concomitante prolongée à 14 jours a été comparée à une quadrithérapie hybride dans laquelle les sept premiers jours de traitement comportait l'association IPP et amoxicilline à laquelle était adjointe le métronidazole et la clarithromycine les sept derniers jours. Bien que l'efficacité globale des deux traitements ne fut pas significativement différente, une tendance était observée en faveur du traitement concomitant (96,1 %) en comparaison de 92,0 % pour l'hybride. La tolérance de ces traitements prolongés n'a pas été comparée à celle de traitements plus courts. On note que l'étude comparant traitement concomitant et hybride avait relevé des effets indésirables chez 56 % et 47 % des patients respectivement. La différence n'était pas significative. Seul le goût métallique dans la bouche était plus fréquent entre les groupes. Ces effets indésirables avaient amené l'interruption du traitement pour 6 % des patients du groupe concomitant et 2,3 % de ceux du groupe hybride (136). Le traitement concomitant est également plus constamment efficace sur les souches résistantes par rapport au traitement hybride. En cas de résistance à la clarithromycine, les taux d'éradication sont de 92 % versus 62 % (139). Les souches résistantes au métronidazole (97 % vs. 82 %) et ayant une double résistance clarithromycine-métronidazole sont également statistiquement plus souvent éradiquées (79 % vs. 47 %) (136).

L'échec du traitement peut donc résulter d'une résistance acquise de la bactérie, qu'elle soit primaire ou secondaire, d'un manque de compliance du patient lié au nombre ou

aux effets indésirables des médicaments, d'un polymorphisme du cytochrome (CYP) CYP2C19 qui dégraderait trop précocement l'IPP pour permettre l'action des antibiotiques (136). Quoiqu'il en soit, devant la diminution d'efficacité des trithérapies standards recommandées dans l'éradication de la bactérie, il convient de se tourner vers de nouveaux schémas thérapeutiques et ensuite, d'essayer de les préserver de l'émergence de résistances.

Objectif de l'étude

Le but de cette étude a été :

- I- Déterminer la prévalence de l'infection à *H. pylori* chez l'adulte et étudier la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques. Ce travail de recherche a été réalisé en deux parties :
 - A- Méthode phénotypique : la Première partie consistait à l'étude bactériologique conventionnelle d'*H.pylori*: Isolement de la souche à partir des biopsies gastriques par culture puis identification des souches isolées par les caractères morphologiques et biochimiques et ensuite l'étude de la sensibilité de ces souches aux antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé.
 - B- Méthode moléculaire : La deuxième partie consistait à la détection de l'ADN bactérien et l'étude de la résistance primaire d'*H.pylori* à la clarithromycine ainsi que les mutations impliquées dans cette résistance directement à partir des biopsies gastriques par PCR.
- II- Évaluer la séroprévalence de l'infection à *H.pylori* chez l'enfant et chercher la corrélation de cette infection avec certains facteurs de risques associés chez l'enfant symptomatique et asymptomatique.

Matériel et Méthodes

Prévalence de l'infection à *H.pylori* et résistance aux antibiotiques chez l'adulte

Partie I : prévalence de l'infection à *H.pylori* et résistance primaire aux antibiotiques chez l'adulte

I. Étude bactériologique conventionnelle :

1. Lieu et période de l'étude :

Il s'agit d'une étude prospective réalisée sur une période de 5 ans (Janvier 2011 - Janvier 2016) au trois centres hospitaliers universitaires de Rabat. (Hôpital universitaires cheikh zaid, hôpital Militaire d'instruction Mohammed V et l'hôpital universitaires Ibn Sina) en collaboration avec le centre hospitalier universitaire de Poitiers, laboratoire de bactériologie.

2. Population étudiée :

L'étude a concernée des patients, adultes adressés aux dits centres hospitaliers pour une endoscopie digestive.

2.1. Critères d'inclusion :

Ont été inclus dans l'étude tous les patients âgés de plus de 17 ans, des 2 sexes, ayant bénéficié d'une endoscopie digestive haute avec biopsies antrales, au sein du service de gastro-hépto-entérologie et qui n'ont jamais reçus un traitement d'éradication contre *H.pylori*.

2.2. Critères d'exclusion :

les patients exclus de l'étude sont les enfants âgés inférieur à 17ans, les patients ayant déjà pris une antibiothérapie à fin d'éradiquer *H. pylori* ou des antisécrotoires dans les deux semaines précédant la fibroscopie gastriqueet les patients ayant une prise chronique des AINS

3. Méthodologie de l'étude :

3.1. Recueil des données:

Les informations de cette étude sont recueillies à partir du registre, des comptes rendus de l'endoscopie digestive, ainsi que les dossiers médicaux. Pour l'exploitation de ces différents renseignements, une fiche d'exploitation a été établie, comportant des données d'ordre épidémiologique, clinique, endoscopique, anatomopathologique et surtout la notion de traitement antérieur d'éradication de *H.pylori* (annexe 1).

3.2. Prélèvement :

Trois biopsies gastriques ont été pratiquées au niveau de l'antre pour chaque patient. Deux biopsies ont été placées dans 1ml de sérum physiologique pour l'étude bactériologique et moléculaire, la troisième a été mise dans du formol pour l'examen anatomopathologique.

Les biopsies gastriques ont été acheminées rapidement au laboratoire et ensemencées dans les deux heures qui suivent le prélèvement.

3.3. Traitement des biopsies au laboratoire :

La première étape consistait à l'enregistrement du patient. Ensuite les prélèvements ont été acheminés vers le lieu d'exploitation. Toute manipulation s'effectuait sous la hotte à flux laminaire.

3.4. Broyage des biopsies

Les biopsies ont été dilacérées avec un scalpel dans une boîte de pétri stérile. Le produit obtenu a été réparti en quatre tubes eppendorf stériles pour le test rapide à l'uréase, l'examen direct, la culture et la conservation.

3.5. Examen direct

Une goutte d'eau distillée a été déposée sur une lame propre et un fragment de biopsie a été déposé dans la goutte d'eau distillée. L'étalement se fait par des mouvements circulaires. La lame a été séchée à la température ambiante. La coloration a été faite par la Méthode de Gram. La lecture est faite ensuite au grossissement 100 à l'immersion à huile.

L'observation d'un bacille de forme hélicoïdale, longue, coloré en rose (Gram négatif) indiquait la présence de *H.pylori*. Elles sont parfois regroupées en banc de poisson (Figure 9).

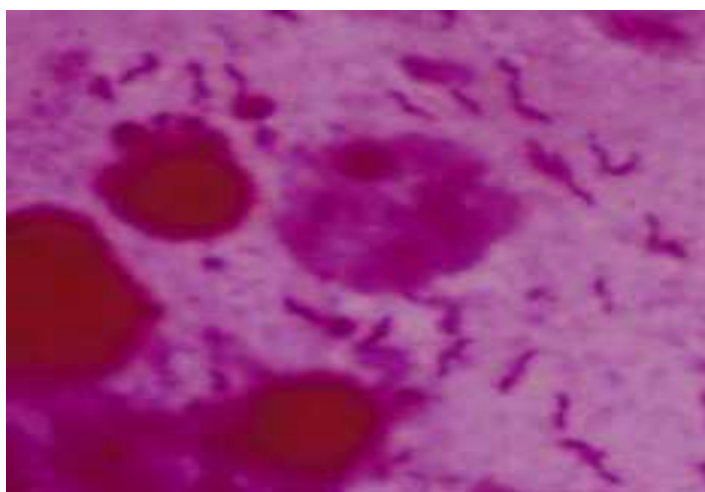


Figure9 :Frottis colorés par Giemsa (photo de l'étude)

3.6. Test à l'uréase au laboratoire

Un fragment de biopsie a été mis en suspension dans 100 µl de milieu urée indole et placé à 37°C. En présence de *H. pylori*, on observe un virage colorimétrique du milieu du jaune au rouge dans les heures qui suivent l'ensemencement.

3.7. Culture

3.7.1. Milieux de culture

Nous avons utilisé pour les cultures préalables à la réalisation de l'antibiogramme des milieux solide à base Columbia additionné de 10 % de sang de cheval et rendu sélectif par l'ajout d'un supplément de Skirrow (Oxoid, Basingstoke Hampshire, United Kingdom) contenant des antibiotiques (vancomycine (10 mg/L), triméthoprim (5 mg/L), amphotéricine B (2 mg/L), polymyxine (2500 UI/L)).

3.7.2. Ensemencement

La biopsie dilacérée a été ensemencée en quadrant sur le milieu solide sélectif. Trois boîtes ont été ensemencées pour chaque échantillon.

3.7.3. Incubation

Les boîtes de Pétri ont été mises dans une jarre étanche et incubées à 37°C sous atmosphère humide et microaérobie en utilisant des sachets générateurs d'atmosphère microaérobie (Campygen®, Oxoid). Les cultures étaient examinées tous les deux jours à partir du 3^{ème} jour, puis réincubées dans le générateur de microaérophilie. Toute culture a été examinée et exploitée après coloration de Gram. L'incubation des cultures négatives a été prolongée jusqu'aux 12 jours.

3.7.4. Identification bactériologique

En primoculture les colonies apparaissent en 3 à 12 jours. Elles sont petites, rondes et luisantes (Figure 10).

Les colonies apparues sont ensuite colorées par la méthode de GRAM. À l'examen direct, les bactéries sont des bacilles à Gram négatif, spiralées en forme de U ou de 0 (Figure 11). *H. pylori* a été identifié sur l'aspect typique de la coloration au Gram et la présence d'une activité uréasique, oxydasique et catalasique.

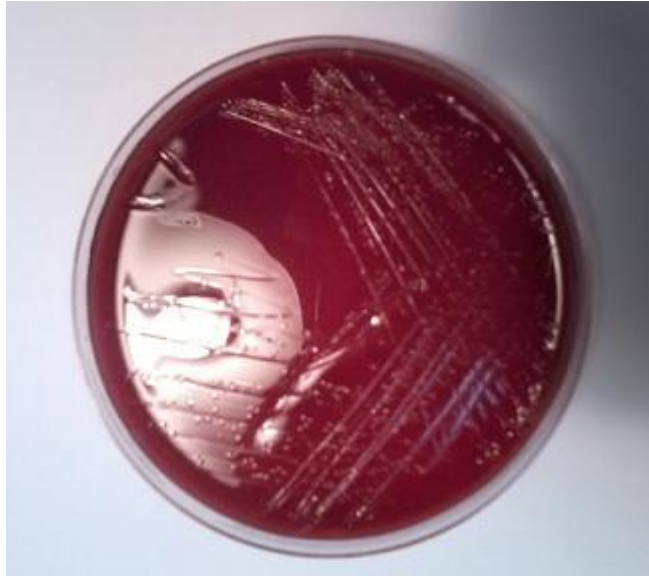


Figure 10: Aspect de colonies d'*H.pylori* sur gélose Columbia au sang (photo de l'étude)

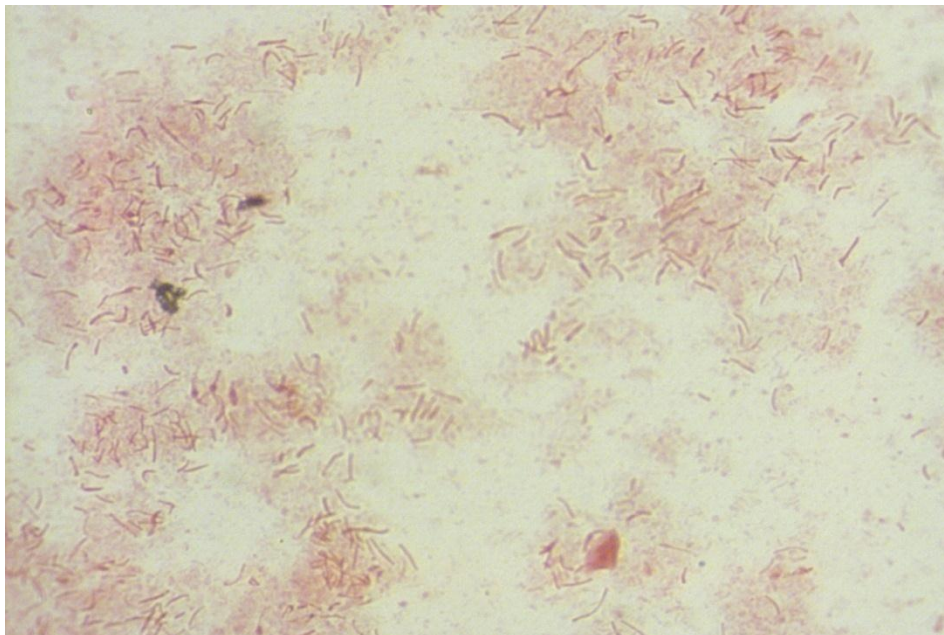


Figure 11: Examen direct au microscope optique (photo de l'étude)

3.8. Étude de la sensibilité aux antibiotiques par des méthodes phénotypiques :

L'étude de la sensibilité a été réalisée par deux méthodes phénotypiques de diffusion en milieu gélosé :

- la méthode de diffusion de disques (Oxoid) a été utilisée pour étudier la sensibilité d'*H.pylori* à :
 - la lévofloxacine (disque de 25 µg)
 - la tétracycline (disque de 30µg)
 - la rifampicine (disque de 30µg)
 - l'Erithromycine (disque de 15µg)
 - la ciprofloxacine (disque de 5µg)

- la méthode utilisant les Etest (AB Biodisk, Solna, Suède) pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) à la Clarithromycine, l'amoxicilline et le métronidazole

À l'aide d'un écouvillon stérile en coton, la culture a été déposée dans un tube contenant 2 ml d'eau stérile. L'absence de formes coccoïdes non cultivables était vérifiée par une coloration de Gram observée au microscope optique à l'immersion (objectif 100).L'inoculum a été ajusté à une opacité équivalente à 3-4 McFarland (~ 10⁹ UFC/ml). La suspension d'inoculum a étéensemencée par un écouvillon stérile plongé dans la suspension, et frottée dans trois directions sur une boîte de gélose Mueller-Hinton additionné de 10% de sang de cheval préalablement séché.

Les bandelettes de Etest de la claritromycine, le métrnidazole, l'amoxicilline et les disques d'Erithromycine, ciprofloxacine, lévofloxacine, tétracycline et rifampicine, ont été placés sur les géloses. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 48 heures dans une jarre avec un générateur de microaérophilie CampyGen (Oxoid, Basingstoke Hampshire, Royaume-Uni).

Les critères de l'EUCAST 2014 (18) ont été suivis pour l'interprétation de l'antibiogramme (<http://www.eucast.org>). Les souches ont été considérées comme résistantes à la clarithromycine lorsque la concentration minimale inhibitrice (CMI) est ≥ 1 µg/ml, au

métronidazole si les CMI est $\geq 8\mu\text{g/ml}$ et à l'amoxicilline si les CMI est $\geq 0.5\mu\text{g/ml}$ (figure12, 13,14)



Figure 12 :Souche sensible au Métronidazole(photo de l'étude)



Figure 13:Souche résistante au Métronidazole(photo de l'étude)



Figure 14 :Souchesensible à la clarithromycine (photo de l'étude)

Pour la méthode des disques (figure 15), les diamètres de la zone d'inhibition (mm) correspondent à :

- Lévofoxacine: résistant si < 17 mm, sensibles si > 20 mm;
- Ciprofloxacine: résistant si < 20 mm, sensibles si ≥ 20 mm;
- tétracycline: résistant si < 17 mm, sensibles si > 19 mm;
- Rifamycine: résistant si < 14 mm, sensibles si > 19 mm;
- l'Erithromycine : résistant si < 17 mm, sensibles si ≥ 22 mm.

Les résultats obtenus pour la ciprofloxacine sont valables pour la lévofoxacine et les résultats obtenus pour l'Erithromycine sont valables pour la claritromycine.

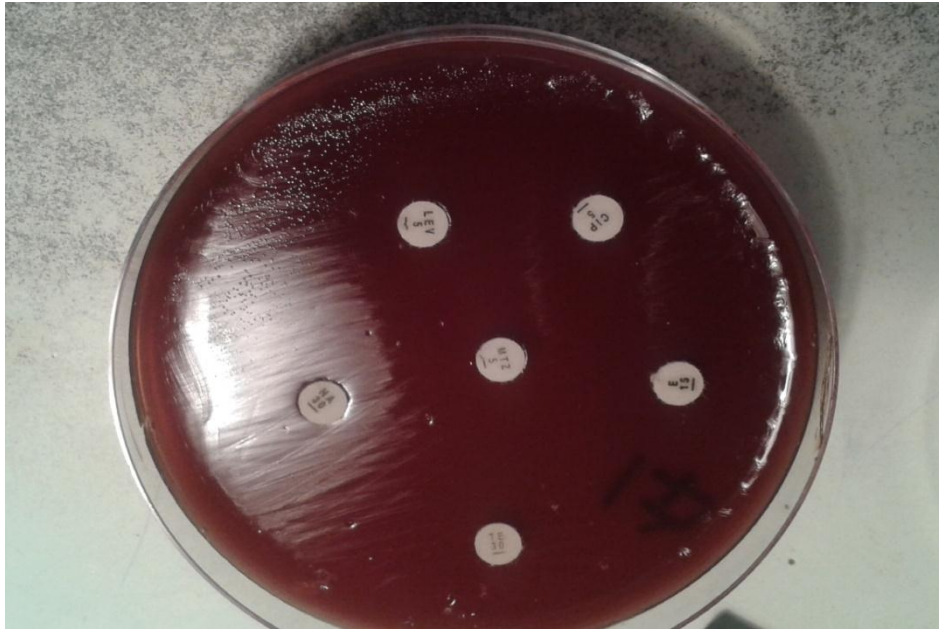


Figure 15: Sensibilité d'*H.pylori* par méthode de diffusion de disques

(Photo de l'étude)

II. Étude moléculaire

1. Extraction de l'ADN:

La technique d'extraction a été réalisée en utilisant le kit « QIAMP DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

L'ADN génomique bactérien a été extrait à partir des biopsies gastriques selon les instructions du fabricant. La lyse des biopsies a été réalisée dans 180µl de Tampon ATL (QIAMP) à 56°C. Le temps de lyse était estimé visuellement par la disparition des débris macroscopiques (pendant une heure environ), puis 70°C pendant 10 minutes. L'ADN a été élué dans 100µl de Tampon TE (10 mmol / L de Tris-HCl, 1 mmol / L d'EDTA (pH 8,0) et conservé à -20°C jusqu'à l'utilisation (annexe2).

2. Détermination de la résistance à la clarithromycine et les points de mutations par PCR scorpion :

2.1. Amplification de l'ADN :

La détermination de la résistance à la clarithromycine et les points de mutations par PCR scorpion a été réalisée au centre hospitalier universitaire de Poitiers, laboratoire de bactériologie selon Burucoa et al. (112)

❖ OBJECTIFS :

Décrire la méthode de détection en PCR multiplex temps réel des mutations du gène codant pour l'ARN 23S conférant la résistance à la clarithromycine chez *Helicobacter pylori* dans les biopsies gastriques. Trois mutations sont recherchées : A2143G, A2142G et A2142C.

❖ **Principe :**

Le principe de ce test est une PCR multiplex temps réel utilisant des amorces scorpion marquées, spécifiques de chaque mutation recherchée ou de la séquence sauvage.

Un fragment de 140 pb du gène de l'ARNr 23s des biopsies a été amplifié en utilisant l'amorce 23SF2 et des sondes scorpion (tableau III). En utilisant le smartycler 2.0 thermocycler, les réactions de PCR et hybridation ont été effectuées dans un volume de 25µl de premixExTaq (Takara, Shiga, Japon), 5µl d'extrait d'ADN des biopsies, 0,1µM de l'amorce 23SF2, 0,14µM de 23Ssc A2142G, 0,18µM de 23Ssc A2143G, 0,1 µM DE 23Ssc A2142C et 0,08µM de 23SscWT. L'amplification a été effectuée après une étape de dénaturation (95°C pendant 15 secondes) pendant 45 cycles, hybridation (55°C pendant 30 secondes) et élongation (72°C pendant 20 secondes). La fluorescence a été lue dans quatre canaux pour chaque échantillon : 6-carboxyfluorescien(FAM), Texas red, cy3 et Cy5 (figure 16). L'analyse des données a été réalisée avec le logiciel Cepheid.

Dans chaque série il a été amplifié quatre souches de *H. pylori* comme témoins positifs. Ces témoins ont été extraits et préparés à partir d'une souche de référence avec génotype sauvage(J99) et 3 souches résistantes à la clarithromycine (HP 825, HP 225 et HP 222) avec des mutations déterminées par séquençage du gène de l'ARNr23S (A2143G, A2142G, A2142C). Le contrôle négatif utilisé était de l'eau biologie moléculaire grade Dnase free.

❖ **Réactifs utilisés :**

- Prémix Ex Taq, perfect real Time
- Amorce 23S-F2
- Sonde scorpion 43G
- Sonde scorpion 42G
- Sonde scorpion 42C
- Sonde scorpion Sauvage HpS
- Eau Mol Bio grade (Dnase free)

Tableau III: Séquences de l'amorce et les sondes scorpion

Amorce et sondes	Séquences
23SF2	5'-TGCGAAATTCCTTGTCGG-3'
23SScWT	5'-FAM AAGGTAGGTGAAAATTCCTCC TACC BHQ1 HEG GGACCACGGGGTCTTT-3'
23SscA2142G	5'-Cy3 AAGGTAGGTGAAAATTCCTCC TACC BHQ1 HEG GGACCACGGGGTCTTC-3'
23SscA2143G	5'-Texas red AAGGTAGGTGAAAATTCCTC CTACC BHQ2 HEG GGACCACGGGGTCTC-3'
23SscA2142C	5-Cy5 AAGGTAGGTGAAAATTCCTCC TACC BHQ2 HEG GGACCACGGGGTCTTG-3'

❖ Préparation des réactifs :

- Eau Bio Mol est aliquotée dans des microtubes stériles sous une hotte. Les microtubes sont ensuite congelés à -20°C.
- L'amorce et les sondes scorpion sont reçues lyophilisées, elles sont reconstituées selon les recommandations du fabricant.
- Les solutions mères sont ensuite dans des microtubes de 2ml à une concentration de 10 µM pour les 4 sondes et 25 µM pour l'amorce.
- 4 témoins positifs : extraits préparés à partir de la souche *H.Pylori* sauvage J99 et de 3 souches de J99 mutées.

❖ Préparation du Mix :

- Dans chaque série sera amplifié :
 - Le contrôle négatif
 - 4 témoins positifs

- Décongeler les réactifs et les centrifuger rapidement.

Les quantités nécessaires pour préparer le mix sont indiquées dans le tableau IV.

Tableau IV : Quantités nécessaires pour préparer le mix d'un échantillon :

Réactif	Volume final 25µl (µl)
Prémix Ex Taq, perfect real Time	12,5
Sonde scorpion Sauvage HpS à 10µM	0,3
Sonde scorpion 43G à 10µM	0,3
Sonde scorpion 42G à 10µM	0,3
Sonde scorpion 42C à 10µM	0,1
Amorce 23S-F2 à 25µM	0,1
Eau Mol Bio grade	6,4

- Distribuer **20µl** de mix dans les tubes à PCR.
- Distribuer **5µl** de :
 - Eau Mol Bio grade
 - Chaque témoin positif
 - Chaque extrait d'échantillon
- Centrifuger rapidement dans la centrifugeuse de paillasse adaptée.

Tableau V : Programmation et démarrage :

Étapes	durée	température	cycle	Acquisition de fluorescence
	20s	95°C	1	-
Dénaturation	15s	95°C	45	
hybridation	30s	55°C		Oui
élongation	20s	72°C		

Tableau VI : Lecture des fluorescences correspondantes à chaque mutation

	Fluorophore
Sauvage	FAM
Mutation 43G	Tex Red
Mutation 42G	Cy3
Mutation 42C	Cy5

❖ **RESULTATS :**

Après réglage de chaque seuil pour chaque témoin :

Tableau VII : Interprétation des résultats

	FAM	Tex Red	Cy3	Cy5
Témoin Sauvage	+	-	-	-
Témoin 43G	-	+	-	-
Témoin 42G	-	-	+	-
Témoin 42C	-	-	-	+
Témoin négatif	-	-	-	-

Si ces critères ne sont pas vérifiés, l'analyse ne pourra pas être validée.

❖ **Interprétation des résultats (tableau VII) :**

- Un échantillon positif en FAM correspond à un patient infecté par une souche sauvage (Absence de mutation).
- Un échantillon positif en TexRed correspond à un patient infecté par une souche mutée, A2143G résistante à la clarithromycine.
- Un échantillon positif en Cy3 correspond à un patient infecté par une souche mutée, A2142G résistante à la clarithromycine.
- Un échantillon positif en TexRed correspond à un patient infecté par une souche mutée, A2142C résistante à la clarithromycine.

NB : une co-infection par plusieurs souches (sauvage et mutée) est possible.

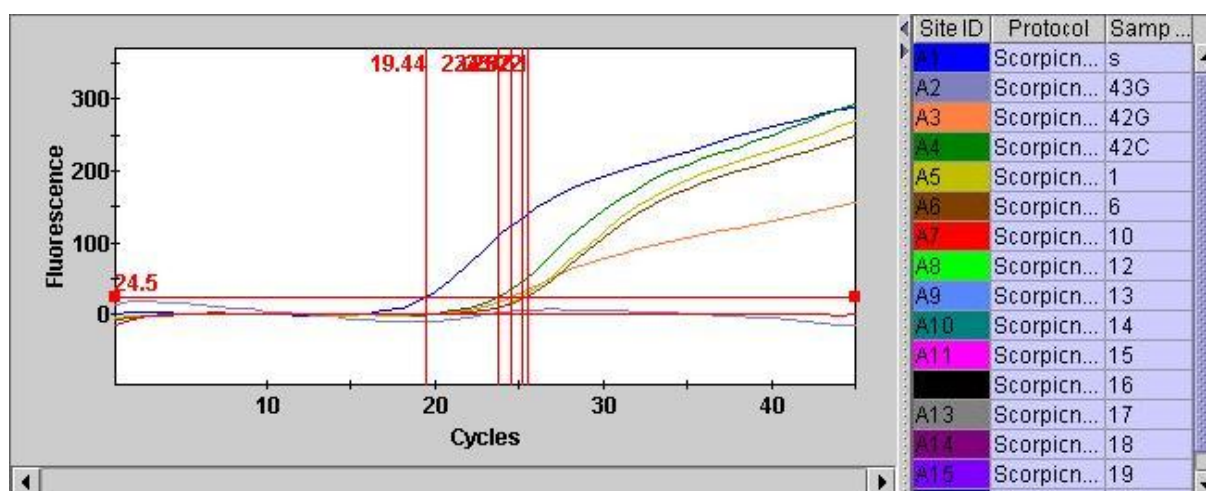


Figure 16: Résultats d'une analyse du gène de l'ARNr23s par PCR en temps réel scorpion(photo de l'étude)

2.2. Validation des résultats négatifs :

Un contrôle de l'absence d'inhibiteurs de la PCR a été effectué systématiquement pour tous les échantillons qui ont été négatif en PCR Scorpion. Un fragment de 110pb du gène codant pour la β -globine humaine a été amplifié par PCR en temps réel en utilisant les amorces BGLO1 et BGLO2 (tableau VIII) et détecté par le Sybr-green (figure 17). Ce contrôle a été effectué pour chaque échantillon de biopsie dans un volume final de 25 μ l de Premix Ex Taq (Takara, Shiga, Japon), 5 μ l d'extrait d'ADN des biopsies, 0,25 μ M d'amorces et 0,5xSybr vert 1 (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). L'amplification a été effectuée en 1 cycle à 95 ° C pendant 10 s et 40 cycles de 95 ° C pendant 5 s, 55 ° C pendant 3 s, et 72 ° C pendant 10 s. (112)

Tableau VIII : Séquence de l'amorce BGLO1 et BGLO2

amorces	séquence
BGLO1	5-ACACA ACTGTGTGTTCACTAGC-3'
BGLO2	5-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'

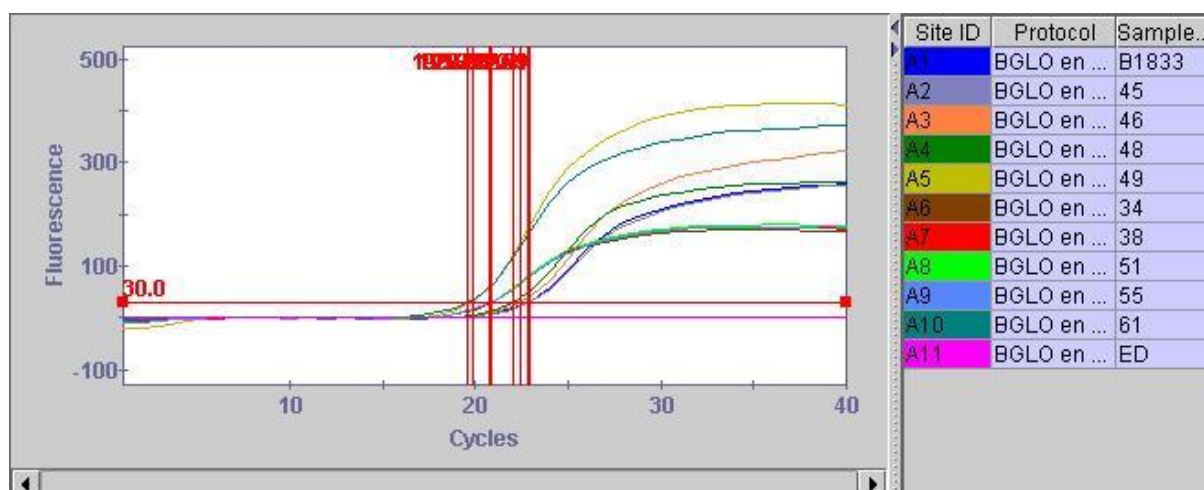


Figure 17: Résultats d'une analyse du gène de la β -globine humaine par PCR en temps réel (photo de l'étude)

Prévalence de l'infection à *H.pylori* chez l'enfant

Partie II : Prévalence de l'infection à *H.pylori* chez l'enfant

1. Type d'étude :

Il s'agit d'une étude prospective qui a été conduite dans deux centres hospitaliers universitaires de Rabat au Maroc (Hôpital Universitaires Cheikh Zaid et l'hôpital d'Enfant de Rabat) du Janvier 2015 à 31 Aout 2016.

2. Population étudiée

2.1.Critères d'inclusion :

L'étude a intégrée 270 enfants âgés de 2ans à 17ans repartis en deux groupes. Le premier groupe (groupe 1) a inclus 164 enfants sains consultant pour autres symptômes non digestive, le deuxième groupe (groupe 2) a inclus 106 enfants présentant une symptomatologie digestive et ayant une indication pour une endoscopie gastroduodénale avec biopsie à la recherche d'une infection à *H.pylori* par méthode anatomopathologique.

2.2. Critères d'exclusion :

Ont été exclus de l'étude les adultes âgés de plus de 17 ans.

3. Collection des données

Un questionnaire a été rempli par les parents précisant des renseignements démographiques (âge, sexe), des facteurs de risque environnementaux : le type d'habitat (traditionnel, moyen ou moderne) et le revenu mensuel des parents (faible : si < 2000 DH, moyen : entre 2000 et 5000 DH et bon : si > 5000 DH, et des données cliniques : symptômes (cause de consultation: anémie, vomissement, douleurs abdominales chroniques survenues plus que trois fois dans les trois derniers mois), antécédents familiaux de maladies peptiques (gastrite, ulcère, cancer gastrique). Les résultats des examens anatomopathologiques ont été collectés à partir du dossier médical du patient (annexe 1).

4. Prélèvement

Tous ces enfants ont été soumis à un prélèvement de sang total (3 à 4 ml) en vue d'une étude sérologique portant sur *H.pylori*. L'accord des parents de l'enfant était obtenu au préalable dans tous les cas.

5. Test sérologique :

L'infection à *H.pylori* a été élaboré sur la présence des anticorps anti *H.pylori* par la méthode immuno-enzymatique « Elisa H.pylori IgG » (VEDALAB- France). Cette réaction utilise un antigène de *H. pylori* dosé à 1 mg/ml. Sur cet antigène, fixé sur une cupule de microplaque de titration, on dépose le sérum dilué du malade. Après incubation, la fixation de l'anticorps (sérum) sur l'antigène est révélée par un conjugué couplé à la peroxydase. L'ensemble est révélé par un substrat TMB. L'intensité de la coloration mesurée par spectrophotomètre à 450nm, est directement proportionnelle à la concentration des échantillons en anticorps anti-Hp de classe IgG. Un seuil de 20U/ml a été retenu comme positif d'après les recommandations du fabricant.

III. Analyse statistique :

La saisie des données a été effectuée sur Excel et l'exploitation des résultats sur le logiciel SPSS (Statistical Package for the Social sciences) version 13.

Les variables qualitatives ont été exprimées en pourcentage et en effectifs. Les variables quantitatives ont été exprimées en moyenne \pm écart type ou en médiane avec un seuil de significativité $p \leq 0,05$.

La corrélation entre statut sérologique et autres paramètres qualitatifs et quantitatifs a été établie avec les tests Khi 2 (ou Fisher exact) et les tests de Spearman et Mann-Whitney. Les variables associées au test sérologique ont été étudiées par régression logistique univariée et multivariée. Les variables qui ont été associées statistiquement significatives au test sérologique ou ont eu une valeur de p inférieure à 0,3 dans l'analyse univariée ont été utilisées dans l'analyse multivariée. Le niveau d'importance a été fixé à 5%.

Pour déterminer le taux de résistance primaire clarithromycine on a pris les résultats de la PCR Scorpion en raison de sa meilleure sensibilité bien connue pour détecter la résistance clarithromycine.

IV. Approbation éthique et consentement

L'approbation éthique a été obtenue auprès du Comité d'Ethique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V et un consentement éclairé écrit a été obtenu des participants à l'étude. Les méthodes d'étude ont été réalisées conformément aux lignes directrices approuvées.

V. Limite de l'étude :

Nous n'avons pas pu réaliser la culture et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques chez la population infantiles par manque de moyens financiers. Nous pensons compléter l'étude si les moyens le permettraient.

Résultats

I. Infection à *H.pylori* chez l'adulte :

1. Population totale étudiée :

Pendant la période d'étude, 367 biopsies ont été collectées auprès de 367 patients: 309 de l'hôpital militaire Mohamed V, 39 de l'hôpital Cheikh Zaid et 19 de l'hôpital Ibn Sina.

Ils étaient 161 (44%) hommes et 206 (56%) femmes, âgés de 19 à 80 ans, avec une moyenne d'âge de 47,4± 14.5. Le Sexe-ratio et la moyenne d'âge n'étaient pas statistiquement différents.

2. Données démographiques :

2.1. Distribution de l'infection à *H.pylori* selon l'âge

la plus forte prévalence a été notée chez les sujets appartenant à la tranche d'âge située entre 40-49 ans (28,2 %) suivie d'une fréquence de 22,3% des patients positifs à *H. pylori* chez la classe d'âge située entre 50 et 59 ans (tableauIX).

Tableau IX : Distribution de l'infection à *H.pylori* selon les tranches d'âge

Tranche d'âge	Nombre	Pourcentage(%)
19-29 ans	31	12,2
30-39	36	14,1
40-49	72	28,2
50-59	57	22,3
60-69	42	16,5
Plus de 70	17	6,7
Total	255	100,0

2.2. Distribution de l'infection à *H.pylori* selon le sexe

Notre série démontre que *H. pylori* est positive chez 41,2% des hommes et 58,8% des femmes (tableau X), avec une différence statistique non significative ($p = 0,18 > 0,05$)

Tableau X: Distribution de l'infection à *H.pylori* selon le sexe

Sexe	Nombre	Pourcentage (%)
Masculin	105	41,2
Féminin	150	58,8
Total	255	100

3. Prévalence de l'infection à *H.pylori*

3.1. Détermination de l'infection à *H. pylori* par le test rapide à l'uréase (TRU):

Le test rapide à l'uréase a été positif pour 248 biopsies sur 367, soit 67,6%.

Tableau XI : Pourcentage de biopsies positives par le test à l'uréase

TRU	Nombre	Pourcentage (%)
Positif	248	67,6
négatif	119	32,4
Total	367	100

3.2. Détermination de l'infection à *H. pylori* par PCR

Sur le total des biopsies collectées (367), 255 cas ont été positifs soit une prévalence de 69,5%

Tableau XII : Pourcentage des biopsies positives à *H. pylori* par PCR Scorpion

PCR	Nombre	Pourcentage (%)
Positif	255	69,5
négatif	112	30,5
Total	367	100

3.3. Détermination de l'infection à *H. pylori* par anatomopathologie :

3.3.1. Prévalence de l'infection à *H. pylori*

L'examen histologique a été positif dans 256 biopsies sur 367, soit 69,8% des cas.

Tableau XIII: Pourcentage des biopsies positives à *H. pylori* par l'examen anatomopathologique

Examen anatomopathologie	Nombre	Pourcentage (%)
Positif	256	69,8
négatif	111	30,2
Total	367	100

3.3.2. Types de pathologies gastriques associées à l'infection à *H.pylori*

L'examen endoscopique a détecté que 319/367 (87,1 %) de la population étudiée étaient atteints de gastrites chroniques, 29 (7,8%) patients avaient un ulcère duodéal et 19 (5,1%) avaient un ulcère gastrique.

L'examen histologique a démontré que (87,5%) des patients présentant un ulcère (48) ont été infectés par *H. pylori*. D'autre part cet examen a détecté 2 dysplasies et un lymphome de MALT.

3.4. Détermination de l'infection à *H. pylori* par culture :

La culture a été effectuée uniquement sur 255 biopsies des 367 collectées. Elle était positive chez 69,6% des cas.

Tableau XIV: Pourcentage des biopsies positives à *H.pylori* par culture

Culture	Nombre	Pourcentage (%)
Positif	177	69,6
négatif	78	30,4
Total	255	100

3.5. Corrélation entre les différentes techniques de diagnostic :

La sensibilité et la spécificité des différents tests utilisés pour la détermination de l'infection à *H.pylori* ont été étudiées par rapport à la culture prise comme Gold Standard.

3.5.1. Test à l'uréase

Tableau XV : Nombre des cas positifs et négatifs par TRU par rapport à la culture

	Culture positive	Culture négative	Total
TRU positif	173	2	175
TRU négatif	4	76	80
total	177	78	255

Le test à l'uréase étudié présentait une sensibilité de 97 % et une spécificité de 97% par rapport aux données de la culture. Les valeurs prédictives positives et négatives étaient respectivement de 99% et 95%.

3.5.2. PCR Scorpion

Tableau XVI : Nombre des cas positifs et négatifs par PCR par rapport à la culture

	Culture positive	Culture négative	Total
PCR positif	177	0	177
PCR négatif	0	78	78
Total	177	78	255

La PCR présentait une sensibilité de 100 % et une spécificité de 100% par rapport aux données de la culture. Les valeurs prédictives positives et négatives étaient respectivement de 100% et 100%.

3.5.3. Examen anatomopathologique

Tableau XVII: Nombre des cas positifs et négatifs par l'examen anatomopathologique par rapport à la culture

	Culture positive	Culture négative	Total
Anapath positif	174	5	179
Anapath négatif	3	73	76
Total	177	78	255

L'examen anatomopathologique présentait une sensibilité de 98 % et une spécificité de 93% par rapport aux données de la culture. Les valeurs prédictives positives et négatives étaient respectivement de 97% et 96%.

Tableau XVIII : Performance des différentes techniques de diagnostic par rapport à la culture

	TRU	Histologie	PCRScorpion
Sensibilité	97%	98%	100%
Spécificité	97%	93%	100%
VPP	99%	97%	100%
VPN	95%	96%	100%

4. Détermination de la résistance primaire d'*H. pylori* aux antibiotiques

4.1. Prévalence de la résistance par méthode conventionnelle :

4.1.1. Résistance aux antibiotiques par méthode de diffusion de disque

TableauXIX : Taux de résistance primaire d'*H.pylori* aux antibiotiques sur un total de 177 souches isolées

antibiotique	%(Nbre) Résistants	% Sensible
Erithromycine	25,4 (45/177)	74,6 (132/177)
Ciprofloxacine	10,7(19/177)	89,3(158/177)
Lévofloxacine	10,7(19/177)	89,3(158/177)
Amoxicilline	0	100(177)
Tétracycline	0	100(177)
Rifampicine	0	100(177)

4.1.2. Résistance aux antibiotiques par méthode deE-test :

Tableau XX : Taux de résistance primaire d'*H. pylori* aux antibiotiques par Etest

Antibiotique	% (Nbre) Résistants	% (Nbre) Sensible	CMI 50 (mg/L)	CMI 90 (mg/L)
Clarithromycine Etest	25.4 (45/177)	74,6 (132/177)	0.03	64
Métronidazole	40.1 (71/177)	59,9 (106/177)	1.5	256
Amoxicilline	0	100 (177)		

Quatre patients, parmi les 177, étaient infectés par une souche résistante à la fois à la clarithromycine et au métronidazole (2%).

➤ **Distribution des CMI des *H.pylori* résistant à la clarithromycine**

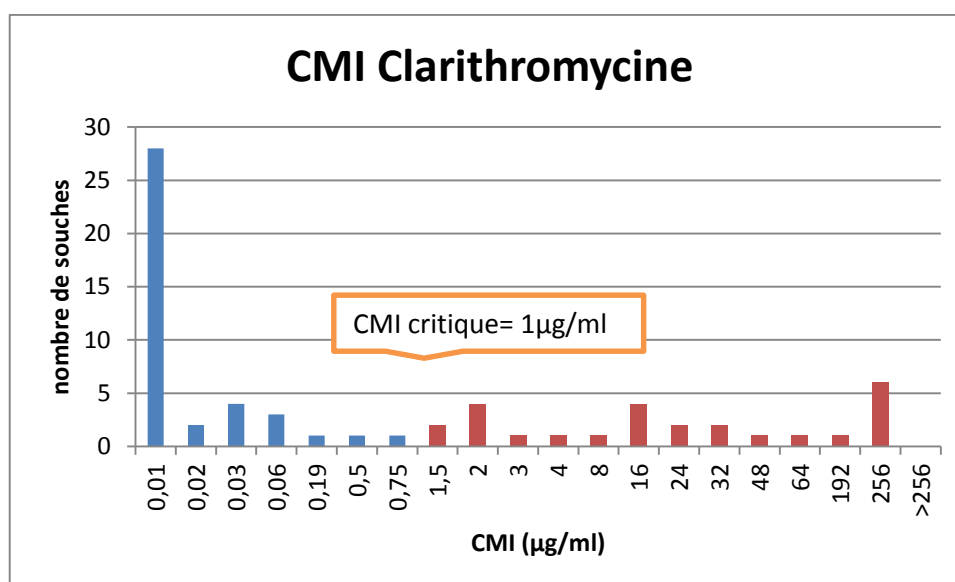


Figure 18: Distribution des CMI des *H.pylori* résistant à la clarithromycine

➤ Distribution des CMI des *H.pylori* résistant au métronidazole :

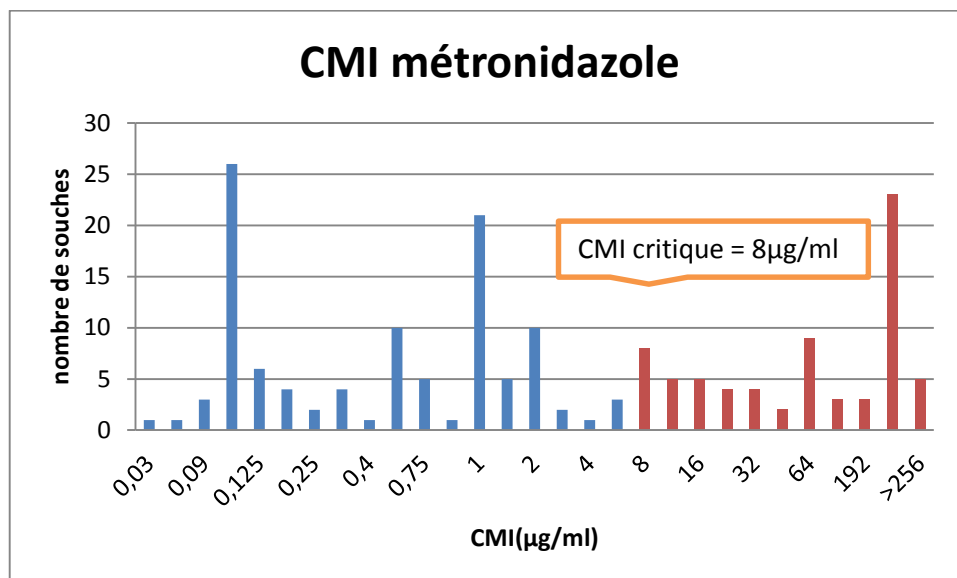


Figure 19: Distribution des CMI des *H.pylori* résistant au métronidazole

4.2. Prévalence de la résistance à la clarithromycine par PCR scorpion :

La résistance primaire à la clarithromycine par PCR scorpion était de 28,6% (73/255).

Tableau XXI : Taux de résistance primaire d'*H. pylori* à la clarithromycine par PCR

Antibiotique	%(nbre) Résistant	%(nbre)Sensible
Clarithromycine PCR	28.6 (73)	71,4 (182)

4.3. Mutations ponctuelles conférant la résistance à la clarithromycine

la PCR scorpion a détecté la mutation A2142G chez 61,6%(45/73) et A2143G chez 35,6%(26/73) et A2142C chez 8,2% (6/73). En utilisant la PCR Scorpion nous avons aussi révélé la présence d'une population double (sensible et résistante). 32 des 73 patients résistants ont été infecté à la fois par le type sauvage et le génotype résistant.

Le tableau suivant présente la répartition des différentes mutations ponctuelles conférant la résistance à la clarithromycine chez *H. pylori* isolé.

Tableau XXII: Répartition des mutations ponctuelles conférant la résistance à la clarithromycine

Résistance	Mutations	Nombre	%
Sensible	Type sauvage	182	71.4
Résistant		73	28.6
	A2142G	32	
	A2143G	11	
	A2142C	0	
	A2142G + Type sauvage	13	
	A2143G + Type sauvage	13	
	A2142C + Type sauvage	4	
	A2143G + A2142C	1	
	A2143G+A2142C +Type sauvage	1	

4.4. Comparaison de la résistance à la clarithromycine par la méthode phénotypique et la méthode moléculaire :

Sur les 255 biopsies testées par la culture, la résistance primaire à la clarithromycine était de (25,4%) alors que par la PCR Scorpion le taux de résistance était de (28,8%). Cette différence est due aux Six souches qui ont été détectées sensibles à la clarithromycine par Etest alors que la PCR Scorpion a détecté un mélange d'un allèle (sensible) de type sauvage et un allèle muté (résistant).

Tableau XXIII: Récapitulatif des taux de résistance retrouvés par les 3 méthodes utilisées

ATB	Cl	Mtz	Amx	Cipro	Lévo	Tetra	Rifa
Disque	25,4%	-	0%	10,7%	10,7%	0%	0%
Etest	25,4%	40.1%	0%	-	-	-	-
PCR	28.6%	-	-	-	-	-	-

II. Séroprévalence de l'infection chez l'enfant :

1. Population étudiée:

Un total de 270 enfants âgés entre 2 et 17 ans ont été inclus à l'étude dont 164 (61%) enfants étaient asymptomatiques (groupe 1) et 106 (39%) étaient symptomatiques (groupe 2). L'âge moyen de la population étudiée a été de $7,9 \pm 4,5$ ans, le sexe ratio M/F a été de 1,1.

Tableau XXIV : Répartition des deux populations étudiées selon l'âge et le sexe

Variable	Total	Symptomatiques	Asymptomatiques
Nombre	270	106 (39%)	164 (61%)
Age (Médian en an)	$7,9 \pm 4,5$	6,9 \pm 4,6	8,6 \pm 4,3
Sexe M/F	1,1	1	1,1

2. Séroprévalence de l'infection à *H.pylori* chez la population étudiée :

La présence d'anticorps de type IgG anti-*H.pylori* a été mise en évidence chez 144 des 270 enfants étudiés, soit 53% des cas. Chez les enfants asymptomatiques, ce taux a été de 41,5% (68/164) vs 72% (76/106) chez les enfants symptomatiques. La différence entre les deux groupes était statistiquement significative $p < 0,001$.

Tableau XXV : Séroprévalence de l'infection à *H.pylori* chez les enfants symptomatiques et asymptomatiques.

Variable	Total	Symptomatiques	Asymptomatiques	p
Nombre	270	106 (39%)	164 (61%)	
Sérologie				< 0,001
Positive	144 (53%)	76 (72%)	68 (41,5%)	
Négative	126 (47%)	30 (28%)	96 (58,5%)	

3. Facteurs de risque liés à l'infection à *H.pylori*:

3.1. Âge et sexe :

La différence de distribution de la séroprévalence de l'infection à *H.pylori* selon les tranches d'âge a été significative chez les deux groupes ($p < 0.001$). Chez les enfants symptomatiques, le taux des anticorps anti-*H.pylori* a été élevé chez la tranche d'âge située entre 2 et 6 ans (**56,6%**) vs **23,5%** chez les enfants asymptomatiques. En revanche, la tranche d'âge la plus touchée chez les enfants asymptomatiques était située entre 6 et 11 ans : **41,2%** vs **21%** chez les symptomatiques.

Tableau XXVI: Répartition des cas séropositifs et séronégatifs selon l'âge et le sexe

Variables	Symptomatique N = 76	Asymptomatique N = 68	p
Age			$< 0,001$
2 - 6	56,6% (43/76)	23,5% (16/68)	
6 - 11	21,1% (16/76)	41,2% (28/68)	
12 - 16	22,4% (17/76)	35,3% (24/68)	
Sexe			0,613
M	55,3% (42/76)	60,3% (41/68)	
F	44,7% (34/76)	39,7% (27/68)	

3.2. Niveau socioéconomique

Les enfants symptomatiques ont été issus d'un milieu socioéconomique plus défavorable que les enfants asymptomatiques. Le niveau d'habitat a été très modeste à modeste chez le groupe 2 vs groupe 1 avec une différence significative ($p < 0,001$). Pour le revenu des parents, quoique qu'il a été faible chez les 2 groupes étudiés, il reste significativement plus faible chez les parents des enfants du groupe 2 ($p = 0,016$).

Tableau XXVII: Répartition des cas séropositifs selon le niveau socioéconomique

Variables	Séropositifs 144	Symptomatique N = 76	Asymptomatique N = 68	p
Habitat				0,001
Très modeste	86 (59,7%)	64,5% (49/76)	54,4% (37/68)	
Modeste	46 (31,9%)	35,5% (27/76)	27,9% (19/68)	
bon	12 (8,3%)	0% (0/76)	17,6% (12/68)	
Revenu				0,016
Faible	113 (78,5%)	81,6% (62/76)	75,0% (51/68)	
moyen	24 (16,7%)	18,4% (14/76)	14,7% (10/68)	
élevé	7 (4,9%)	0% (0/76)	10,3% (7/68)	

3.3. Antécédents familiaux :

Les antécédents familiaux de maladies peptiques a été retrouvé chez **73,5%** du groupe 1 vs **52,6%** du groupe 2.

Tableau XXVIII : Répartition des cas séropositifs selon la présence des antécédents familiaux

Variables	Symptomatique N = 76	Asymptomatique N = 68	p
Antécédents			0,01
Absence	47,4% (36/76)	26,5% (18/68)	
Présence	52,6% (40/76)	73,5% (50/68)	

3.4. Symptômes cliniques:

L'association des douleurs abdominales chroniques et la présence d'*H.pylori* a été observée dans 80% des enfants *H.pylori* séropositifs vs 53,3% chez les enfants *H. pylori* séronégatifs. La différence a été significative. Pour les autres symptômes étudiés (anémie et vomissement), la séoprévalence a été faible chez l'ensemble des enfants symptomatiques.

Tableau XXIV : Répartition des signes cliniques chez les enfants symptomatiques

Symptomatologie	Total	Séropositifs	Séronégatifs
Douleurs abdominales	72,6% (77/106)	80,3% (61/76)	53,3% (16/30)
	P<0,001		
Anémie	16% (17/106)	9,2% (7/76)	33,3% (10/30)
Nausées et vomissement	11,3% (12/106)	10,5% (8/76)	13,3% (4/30)

4. Évaluation du test sérologique (ELISA) par rapport aux résultats anatomopathologiques :

5.1. Comparaison des résultats de la sérologie avec les résultats d'anatomopathologie

Le test sérologique étudié présentait une sensibilité de 76,3 % et une spécificité de 73,3% par rapport aux données d'anatomopathologie. Les valeurs prédictives positives et négatives étaient respectivement de 87,8% et 55%. La corrélation entre les deux

variables, sérologie positive et résultat anatomopathologique, est significative ($p < 0,001$).

Tableau XXX : Comparaison des résultats de sérologie et des résultats de l'examen anatomopathologique

Examen anatomopathologique	Séropositifs	Séronégatifs	Total
Positif	58 (76,3%)	8 (26,7%)	66 (62.3%)
Négatif	18 (23,7%)	22 (73,3%)	40 (37.7%)
Total	76 (72%)	30 (28%)	106 (100%)

5.2. Les variables indépendantes associées à l'examen anatomopathologique :

L'analyse de la corrélation entre le résultat anatomopathologique et les autres variables qualitatives chez les enfants symptomatiques a montré que le résultat anatomopathologique est corrélé de façon significative avec l'âge, les symptômes, les antécédents, le niveau d'habitat et le niveau de revenu. Ces variables dont la corrélation est statistiquement significative avec l'examen anatomopathologique ont été associés à l'examen sérologique afin d'évaluer la significativité de la corrélation.

Tableau XXXI : La régression logistique univariée et multivariée :

Variables indépendantes	Analyse univariée			Analyse multivariée		
	β	95% IC	P	β	95% IC	P
Age	1.5	0.83 – 2.71	0.18	2.6	1.14 – 4.57	0.019
Symptomatologie	3.5	1.42 – 8.86	0.006	4.9	1.71 – 13.94	0.003
Antécédents	13.10 ⁸	0.00 -	0.997			
Niveau Habitat	0.5	0.22 – 1.16	0.109	1.91	0.36 – 10.06	0.44
Niveau Revenu	0.3	0.10 – 0.64	0.004	0.10	0.01 – 0.66	0.017

Discussion

DISCUSSION

I- Prévalence de l'infection

Helicobacter pylori est responsable de différentes pathologies de la muqueuse gastroduodénale. La moitié de la population mondiale est touchée par cette infection (13). *H. pylori* est présent dans toutes les régions du globe avec une prévalence plus élevée dans les pays en voie de développement. Au Maroc la prévalence est d'environ 70% chez l'adulte (32,37). Dans notre étude, nous rapportons une forte prévalence de l'infection à *H. pylori* chez les personnes référées pour une endoscopie gastro-duodénale (69,5%). Cette fréquence se situe dans les limites des valeurs rapportées par plusieurs études marocaines. En 2004, dans une étude menée dans la région du Gharb-Chrarda-BeniHssen, Attaf N. et al a démontré une prévalence de (67,4%)(33). Nos résultats ont été également similaires à ceux retrouvés dans d'autres pays en voie de développement, ainsi, la prévalence de l'infection à *H.pylori* a été de 69% en Côte d'Ivoire (142). Cependant la prévalence de notre série reste inférieure à celle retrouvée en Arabie saoudite (80%) (143) ou encore en Algérie (78%) (144). En revanche notre prévalence reste plus élevée aux données européennes où cette fréquence ne dépasse pas 30% (13, 132).

1. Facteurs influençant l'infection à *H.pylori*

Certains facteurs influencent l'incidence et la prévalence de l'infection à *H. pylori* comme l'âge, le genre, les facteurs ethniques, les facteurs géographiques et les facteurs socioéconomiques.

1.1. Sexe :

Dans notre étude, aucune différence significative n'a été mise en évidence selon le sexe. Les données classiques sur des études de séroprévalence de l'infection à *H.pylori* dans diverses populations montrent des taux identiques dans les deux sexes (22, 33, 143). Elmanama et al ont démontré que les deux sexes sont indifféremment touchés par l'infection due à *H. pylori* (145), confirmant les résultats de notre série.

1.2. Age :

Dans notre série la plus forte prévalence (28,2%) a été retrouvée chez les sujets appartenant à la tranche d'âge située entre 40 et 49 ans. Nos résultats concordent avec les données retrouvées par d'autres auteurs (33). Ce pendant dans d'autres études européennes la prévalence est fortement rapportée chez les patients qui sont autour de 60 ans (15,23). Notre observation selon laquelle les patients infectés sont plus âgés peut s'expliquer par l'effet de cohorte: les personnes âgées ont été infectées dans leur enfance à une époque où la prévalence de l'infection était plus élevée. En effet, certains travaux ont montré que la contamination se fait tôt dans l'enfance (6, 21, 145).

1.3. Pathologies associées:

L'infection par *H. pylori* est devenue le facteur étiologique incontournable de nombreuses pathologies gastriques. Ainsi notre étude a détecté que 87,1% de la population étudiée avaient une gastrite chronique, 7,8% patients avec un ulcère duodéal, 5,1% avec un ulcère gastrique, 2 dysplasies et un lymphome de MALT. L'analyse de nos résultats a démontré que (87,5%) des patients atteints d'un ulcère étaient infectés par *H. pylori*. Il existe une corrélation entre l'ulcère duodéal et la présence de *H.pylori*. Dans une série tunisienne menée par Ben Ammar A et al, parmi 78 patients ulcéreux duodéaux, l'infection à *H. pylori* a été présente chez 77 patients soit 98,7 % (38), ce qui corréle avec les résultats de notre série. *H. pylori* est aussi à l'origine de la survenue de plusieurs pathologies digestives dont la gastrite qui est souvent asymptomatique. Des auteurs marocains rapportent que *H. pylori* est associé souvent à une gastrite chronique atrophique avec une prévalence de 95,56 % (33). Ces résultats concordent avec ceux retrouvés dans notre étude.

Il est à noter que cette population atteinte de gastrites et d'ulcères constituerait un terrain à risque pour la survenue d'un cancer. Il est aujourd'hui clairement établi que *H. pylori* est responsable du cancer gastrique et qu'aucun cancer de ce type ne se développe en l'absence de cette bactérie. Les études menées par Haruma.k ont montré une prévalence plus élevée d'infections à *H. pylori* dans les populations affectées de cancers gastriques que dans les populations témoins (146). Néanmoins, le nombre de patients susceptibles de développer un cancer est minime comparativement à l'importance de la population infectée par *H. pylori*

(146), ceci concorde avec les résultats de notre série où le cancer n'a été détecté que chez un seul patient.

2. Performance des tests utilisés pour le diagnostic de l'infection :

Ce travail a permis de mieux situer les niveaux de performance des tests de diagnostic qu'on a utilisés, il donne aux utilisateurs des indications qui leur permettent de comparer la sensibilité et la spécificité de test à l'uréase, de l'examen anatomopathologique et la détection moléculaire (PCR) par rapport à la culture.

2.1. Test à l'uréase :

La sensibilité et la spécificité du test à l'uréase pour la détection de l'infection à *H. pylori* étaient respectivement 97% et 97%. Ce test est peu utilisé en pratique courante comme une méthode de diagnostic, il est souvent associé à une autre technique pour confirmer un résultat. Il a une sensibilité de 80 % et une spécificité de 95 % par rapport à la culture (16). La lecture précoce à 20 min diminue la sensibilité. La lecture à 24 h est aussi à proscrire en raison de l'activité uréasique d'autres bactéries qui peuvent être présentes chez les malades (*Proteus*). La sensibilité de ce test est réduite si la densité bactérienne est faible ou après la prise récente d'un traitement antisécrétoire ce qui explique qu'il ne peut être utilisé pour évaluer l'éradication (17).

2.2. Examen anatomopathologique :

Dans notre étude, la sensibilité et la spécificité de l'examen anatomopathologique, par rapport à la culture, pour la détection de l'infection à *H. pylori* étaient (Se 0.98 et Sp 0.93). L'examen histologique est la méthode la plus couramment utilisée au Maroc, c'est la technique privilégiée en routine en raison de sa disponibilité, de sa réalisation aisée dans les laboratoires contrairement aux autres tests. L'histologie permet aussi d'observer l'état de la muqueuse gastrique à partir des biopsies et ainsi, de caractériser la sévérité de la gastrite en évaluant la typologie des lésions : inflammation, atrophie, métaplasie intestinale et dysplasie. Elle assure la prévention du cancer gastrique (113).

Les performances inférieures de l'histologie trouvées dans notre comparaison par rapport à la détection moléculaire pourraient être dues au nombre réduit de biopsies recueillies pour l'examen histologique. Bien que les lignes directrices consensuelles recommandent 4 à 5 biopsies. Lorsqu'une exploration endoscopique est réalisée, plusieurs biopsies doivent être pratiquées sur différents sites afin d'augmenter les chances de prélever la bactérie et ainsi

d'améliorer la sensibilité du test. En effet, la répartition et la densité de la population bactérienne est très hétérogène dans l'estomac, l'infection prédomine généralement au niveau de l'antrum mais parfois, elle peut être plus marquée dans le fundus (14, 110).

2.3. PCR Scorpion

Notre étude confirme les excellentes performances de la PCR Scorpion (Se 100%, Sp 100%), l'amplification génique par PCR est une technique moléculaire qui a une excellente sensibilité et spécificité pour le diagnostic de l'infection, supérieures à celle de l'histologie (98,2 % vs 87,7% et 97,5 % vs 91,3 %, $p < 0,001$) (112) et donne un résultat rapide en deux à trois heures. Elle permet simultanément le diagnostic de l'infection, la détection des principales mutations en cause dans la résistance aux antibiotiques. La difficulté, le manque de sensibilité et le long délai de réponse de la culture ont motivé la mise au point de techniques génétiques rapides et spécifiques par PCR et maintenant par PCR temps réel.

Ainsi, l'extraction de l'ADN à partir d'une biopsie gastrique est possible à l'aide de kits commercialisés voire d'extracteurs automatiques après une lyse par la protéinase K. De nombreuses amorces ont été proposées, celles qui apportent une sensibilité et une spécificité maximales sont celles qui permettent d'amplifier des fragments des gènes *glmM* codant la phosphoglucosamine mutase, *ureA* codant la sous unité A de l'uréase, 26-kDa SSA et l'ARNr16S. L'utilisation d'une sonde d'hybridation pour révéler le fragment amplifié, soit par southern-blot, soit par PCR temps réel, augmente la spécificité de la détection. Elle est le plus souvent couplée à la détection des mutations conférant la résistance à la clarithromycine, le fragment du gène où est localisée la mutation est amplifié par PCR. La détection de la mutation est ensuite réalisée par restriction enzymatique (RFLP) ou à l'aide de sondes spécifiques (DEIA, OLA, LIPA). Ces techniques de PCR-RFLP, PCR temps réel ont pu être adaptées à la détection de la résistance aux fluoroquinolones et aux tétracyclines bien que le besoin d'une détection rapide de la résistance rare à ces molécules peu utilisées soit limité.

La trop grande complexité des mutations responsables de la résistance au métronidazole n'ont pas permis de proposer un test génétique rapide de la détection de cette résistance.

Ainsi, les mécanismes de résistance à la clarithromycine peuvent être étudiés avec la PCR en temps réel (112). Plus récemment, un nouveau test moléculaire nommé HelicoDR®, basé sur la PCR multiplexe couplée à l'hybridation, permet la détection des résistances associées à la clarithromycine et aux fluorquinolones (128).

La détection moléculaire est une alternative à la culture avec antibiogramme, d'autant qu'elle nécessite des conditions de transport moins contraignantes que la culture. Elle a l'avantage aussi d'être une méthode rapide réalisable sur des bactéries non viables (112, 124). Cependant, malgré son coût en diminution, elle reste une méthode chère dans notre contexte.

2.4. Culture bactérienne

Dans cette étude nous avons obtenu une concordance de 100% de la culture avec la PCR. Habituellement, la PCR est légèrement supérieure (3-5%) à la culture en sensibilité pour détecter *H. pylori* (112,147). La culture est la méthode de référence pour le diagnostic de *H.pylori*, elle présente un autre intérêt majeur puisqu'elle permet la détermination de la sensibilité bactérienne vis-à-vis des différents antibiotiques par la réalisation de l'antibiogramme. Sa spécificité est excellente, la sensibilité est très variable en raison de certaines contraintes à la bactérie (147). *H.pylori* est un pathogène exigeant et très fragile, il doit être protégé de la dessiccation et du contact avec l'O₂. Les conditions de prélèvement et de transport doivent donc être optimales pour assurer la viabilité de la bactérie jusqu'au laboratoire. La concordance totale entre la culture et la PCR observée dans notre étude pourrait être expliquée par les excellentes conditions, de la phase pré-analytique, que nous avons utilisées pour la réalisation de la culture en essayant de ne pas dépasser 2 heures entre la collecte de la biopsie et l'incubation des milieux de culture. Nous avons aussi opté pour 12 jours d'incubation en les examinant tous les deux jours à partir du 3^{ème} jour. . En primoculture les colonies apparaissent en 3 à 12 jours. En subculture la croissance est plus rapide en 2 à 4 jours. Nous n'avons pas attendu d'avoir de grosses colonies pour repiquer les cultures. Nous avons réalisé un réétalement sur la boîte d'isolement dès l'apparition des premières colonies ce qui nous a permis d'obtenir un inoculum riche en colonie pour réaliser l'antibiogramme.

Le test de sensibilité phénotypique de *H. pylori* est considéré comme un test compliqué et semble donc difficile à appliquer à grande échelle dans un pays en développement. Nous démontrons ici que les obstacles retrouvés à la réalisation de la culture et la détermination de la sensibilité d'*H. pylori* aux antibiotiques ne sont pas insurmontables à condition qu'il y est une bonne coopération entre les cliniciens et les biologistes.

II- Résistance d'*H.pylori* aux antibiotiques :

L'éradication de *H. pylori* permet de traiter la maladie ulcéreuse gastroduodénale, la plupart des lymphomes gastriques du MALT, et probablement prévenir l'apparition de l'adénocarcinome gastrique. Les antibiotiques recommandés par la conférence de consensus de Maastricht IV 2010 sont la clarithromycine, le métronidazole, l'amoxicilline, la lévofloxacine et la rifabutine (4).

La combinaison de deux ou trois de ces antibiotiques est nécessaire pour assurer une éradication optimale de *H.pylori* et ainsi limiter l'émergence de mutants résistants. Ils peuvent être associés différemment selon les schémas thérapeutiques. Les antibiotiques utilisés en première ligne sont l'amoxicilline, la clarithromycine et le métronidazole. La lévofloxacine et la rifabutine sont utilisées en traitement de secours (134, 136).

L'impact Clinique de la résistance aux antibiotiques est majeur il est la principale cause des échecs thérapeutiques. Il a été montré que la résistance à la clarithromycine réduit l'efficacité du traitement de la première ligne jusqu'à 70% (3, 125, 127). La résistance acquise correspond à l'apparition d'une résistance à un antibiotique chez une souche normalement sensible au départ. Elle s'acquiert à la suite d'événements génétiques variés : mutations chromosomiques ou acquisition de gènes (plasmides ou transposons). *H.pylori* est concerné par les résistances survenant par mutation chromosomique ponctuelle. Elles peuvent exister avant même la mise sous traitement, on parle de résistance primaire, ou bien, survenir en cours de traitement : c'est la résistance secondaire (12, 13,).

Concernant *H.pylori*, la résistance acquise concerne les macrolides, les fluoroquinolones, les nitro-imidazolés, l'amoxicilline et les rifampicines (26).

Dans cette étude nous n'avons pas détecté de résistance à l'amoxicilline, à la tétracycline ni à la rifampicine. La résistance à l'amoxicilline est apparue à la fin des années 1990, mais reste très rare, ne dépassant pas 1,4% dans les grandes séries (13). La résistance à la tétracycline et la rifampicine sont également exceptionnelles (13,147). Les antibiotiques inducteurs de résistance sont principalement les macrolides et les nitro-imidazolés. Les résistances primaires aux quinolones sont encore peu fréquentes (26).

1. Résistance à la clarithromycine:

La clarithromycine est un antibiotique considéré comme bactériostatique. Son activité bactériostatique est supérieure sur *H.pylori* comparativement aux autres macrolides en raison de sa diffusion tissulaire. Cet antibiotique appartient à la famille des macrolides dont la cible est représentée par le domaine V de l'ARN 23S. Lorsque l'antibiotique s'y lie, il y a interruption de l'élongation de la protéine et donc, arrêt de la traduction (117). La résistance est principalement en rapport avec l'apparition de 3 types de mutations ponctuelles en positions 2142 (A2142G et A2142C) et 2143 (A2143G) (118).

Des transitions adénine→guanine surviennent aux positions 2142 (A₂₁₄₂G) et 2143 (A₂₁₄₃G) ainsi que la transversion adénine →cytosine en position 2142 (A₂₁₄₂C) (112, 125). Celles-ci sont responsables d'un changement conformationnel et d'une diminution de la liaison de l'antibiotique à sa cible. L'efflux et le mécanisme à l'origine du phénotype MLS_B, ne semblent pas jouer de rôle majeur dans cette résistance (117). Versalovic et al, ont décrit pour la première fois ces mutations chez *H. pylori*, par ailleurs déjà décrites chez *Escherichia coli* (*E. coli*) (125). Actuellement, la résistance primaire est de 17,2 % à l'échelle mondiale avec en Europe un taux de 11,1 %, en Asie 18,9 % et en Amérique 29,3 % (120). En France, Raymond et al rapportent un taux de 26 % de résistance globale à la clarithromycine chez l'adulte, sur les 530 isolats testés entre 2004 et 2007, avec une résistance secondaire significativement supérieure à la résistance primaire, 68 % versus 19,1 % (123). Chez l'enfant, la résistance est de 22,8 %; la mutation A2143G est responsable de la résistance dans 90 % des cas (121).

Dans notre étude, le taux de résistance à la clarithromycine a été de 28,6%. Ce taux a été parmi les taux les plus élevés observés dans le monde. La distribution des CMI de la clarithromycine a démontré que 39% des souches présentaient des CMI élevées allant de (16 à 256mg/L). La CMI 50 qui est la plus petite concentration de la clarithromycine permettant d'inhiber la croissance de 50% des souches d'*H.pylori* isolées et qui signifie un marqueur de la sensibilité naturelle a été de 0,03mg/L et la CMI90 qui est la plus petite concentration permettant d'inhiber la croissance de 90% des souches et qui est un marqueur de la résistance acquise a été de 64mg/L. Il a été démontré que le niveau de résistance à la clarithromycine primaire de *H. pylori* dans un pays est positivement corrélé à l'utilisation de macrolides dans la communauté (48). En Afrique, très peu d'études sont disponibles, elles indiquent une faible résistance à la clarithromycine: 0% en Gambie, Nigeria et l'Éthiopie, 1% au Sénégal, 1,7% au Congo, 6,4% au Kenya et 20% en Afrique du Sud. (26, 27, 28, 148, 149,150). Au Maghreb, ces données sont

rare et les deux études réalisées sont une étude prospective multicentrique menée de 2005 à 2007 en Tunisie qui a rapporté une prévalence de la résistance primaire à la clarithromycine de 15,4% (129) et plus récemment une autre de 2008 à 2014 menée en Algérie a signalé une prévalence de résistance primaire à la clarithromycine atteignant 33% (144). À travers la Méditerranée, l'Espagne et la France, présentent des taux de résistance primaire plus faible : 19 à 21,3% en France, 13,3 à 14,7% en Espagne (147,151). Mais des taux similaires de résistance à la clarithromycine ont été observés dans d'autres pays d'Europe du Sud (Grèce 24,7%, Italie 26,7%) (48).

Deux études cliniques récentes menées au Maroc ont suggéré un taux élevé de résistance à la clarithromycine. La première, menée en 2009, a montré des taux d'éradication inférieurs à 80% pour la trithérapie à base de clarithromycine (ITT 78.2, PP 79.6) (32). La deuxième, menée en 2012, a montré une baisse des taux d'éradication obtenus par ce traitement (ITT 65.9, PP 71) (37), ce qui suggère une augmentation du taux de résistance à la clarithromycine (37). Nous rapportons une prédominance de la mutation l'A2142G (61,6%) tandis que la mutation A2143G qui prédomine en France (81,9%), en Algérie (81%) et en Tunisie (88,1%) (147, 144, 129), ce qui confirme l'émergence locale de cette résistance sous la pression de sélection par la consommation de macrolides plutôt que la propagation épidémique des gènes de résistance. Une étude plus récente publiée en 2015 menée par H.Inouss et al a rapportée que le taux de consommation des antibiotiques au Maroc a augmenté de 9,68 DDD/1000Hab/jour en 2003 à 13,85 DDD/1000Hab/jour en 2012 et que le taux de consommation des macrolides est de 1,61DDD/ 1000 Hab/ jour en 2012 soit 11,9% de la consommation (187); ce qui constitue un facteur de risque pour l'augmentation des souches résistantes aux antibiotiques. En Tunisie, le taux de consommation annuelle d'antibiotiques a été évalué à 4%, le taux de consommation des macrolides dépasse 4 millions d'unités par an et le taux de résistance d'*H.pylori* à la clarithromycine était de 14,6% (129).

En utilisant la PCR scorpion, nous avons révélé la présence d'une population double chez des patients infectés par des souches résistantes. Parmi les 73 patients présentant une souche résistante, 32 (43,8%) ont été infectés par au moins 2 allèles différents du gène de l'ARNr 23S dans la même biopsie, l'un de ces 32 patients hébergeant un mélange de 3 allèles: un type sauvage sensible et deux mutations différentes, ce qui suggère une infection mixte avec une souche sensible et résistante (hétérosistance). Les multi-infections révélées par l'hétérosistance sont plus fréquentes dans les pays à forte prévalence d'infection et de résistance. En Tunisie,

43% des patients infectés avaient une double population alors que le taux de résistance à la clarithromycine était seulement de 14,6% (129).

Autre résultat de cette étude, six souches isolées ont été détectées comme sensibles à la clarithromycine par Etest et la PCR Scorpion a détecté un mélange d'un allèle de type sauvage (sensible) et d'un allèle muté (résistant). Dans chacun de ces six cas, le seuil de cycle (nombre de cycles de PCR pour atteindre le seuil positif) était plus élevé pour l'allèle résistant que pour l'allèle sensible, ce qui indique une sous-population d'isolat résistant en quantité inférieure à l'allèle sensible. La bonne sensibilité de cette méthode moléculaire pour détecter ce mélange a été déjà démontrée (112), elle permet la détection d'une sous-population résistante jusqu'à 1% dans un inoculum contenant 99% de la souche sensible.

2. Résistance au métronidazole:

La résistance au métronidazole est en moyenne 3 fois plus élevée que pour les macrolides (13). Les imidazolés, font partie avec le tinidazole, des premiers antibiotiques prescrits dès 1987 dans l'essai double aveugle de Marshall (152). C'est actuellement l'antibiotique pour lequel on observe le plus haut taux de résistance. Ces antibiotiques sont des pro-drogues nécessitant une activation par réduction dans la cible, du groupement nitré. Ceci a pour conséquence la génération de radicaux libres, toxiques pour l'ADN qui génèrent des mutations létales (117). Le mécanisme de résistance repose sur de l'efflux (ToIC) ainsi que sur la survenue de mutations ponctuelles notamment au niveau du gène *rdxA*, d'autres protéines avaient été suggérées dans des études utilisant des approches biochimiques et génétiques : ferrédoxine, protéines ferrédoxine-like, flavodoxine, flavine oxydoréductase (*frxA*), 2 oxoglutarate oxydoréductase, et la pyruvate ferrédoxine oxydoréductase (118). L'inactivation de impliqués dans ces systèmes a entraîné la résistance au métronidazole. Cette résistance est de 34,9 % chez l'adulte européen et de 25,7 % chez l'enfant(119). Parmi les facteurs de risques retrouvés associés à cette résistance, c'est le fait d'être de sexe féminin ($p < 0,001$). Notre prévalence (40,1%) apparaît plus élevée que celle rapportée dans les études européennes (153), mais reste inférieur à celle trouvée en Tunisie (56%)(129) et en Sénégal (85%)(148). Dans notre série la répartition des CMI a montré que 23 souches présentaient des CMI très élevées (256 mg/L). la CMI 50 du métronidazole permettant d'inhiber la croissance de 50% des souches d'*H.pylori* isolées était de 1,5 mg/L et la CMI90 était de 256 mg/L.

Dans notre étude, nous avons aussi retrouvé que la résistance primaire au métronidazole est supérieure chez les femmes par rapport aux hommes en raison de la large utilisation des imidazoles dans les infections gynécologiques. La même explication a été avancée par Koletzko et al dans leur étude où ils ont constaté que le métronidazole a été largement utilisé en Afrique et en Asie pour traiter les maladies parasitaires et les infections gynécologiques (154).

3. Résistance à la lévofloxacine

La lévofloxacine est issue de la famille des fluoroquinolones. La lévofloxacine est un antibiotique bactéricide, inhibiteur d'une enzyme, l'ADN gyrase, qui permet le déroulement de l'ADN bactéricide nécessaire à la division lors de la croissance bactérienne (128). Elle est utilisée en deuxième et troisième ligne de traitement (131).

H. pylori, du fait d'un génome de taille restreinte, est dépourvue de certaines enzymes, dont la topoisomérase IV. C'est donc l'ADN-gyrase qui cumule toutes les fonctions. C'est une enzyme qui est constituée de deux sous-unités A codées par le gène *gyrA* et deux sous-unités B codées par le gène *gyrB*. Celle-ci est par conséquent, la seule cible des quinolones (130). La résistance aux fluoroquinolones est principalement due à des mutations de la région QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) du gène *gyrA* principalement au niveau des bases 87 et 91 (13, 128, 130).

A ce jour, les principaux mécanismes de résistance retrouvés chez *H. pylori* sont la survenue de mutations au sein de *gyrA*. Il a été décrit 11 mutations responsables de cette résistance, regroupées au niveau des codons 86, 87, 88 et 91 (128, 155). Il n'a pas été démontré, à ce jour, de rôle probant de l'efflux ou de mutation de *gyrB* dans le mécanisme de cette résistance (156). Nous rapportons dans cette étude un taux de résistance à la lévofloxacine de 10,7%. L'utilisation des fluoroquinolones dans la communauté conduit actuellement à l'augmentation des taux de résistance du fait de sa prescription pour les maladies urogénitales et les maladies respiratoires. En France, sur 530 souches collectées chez des adultes entre 2004 et 2007, 13,2 % étaient résistantes aux fluoroquinolones, avec une augmentation significative de cette résistance : de 7,3 % entre 2004 et 2005 à 14,1 % entre 2006 et 2007 ($p=0,04$) (123). De Francesco et al, rapportent une fréquence mondiale de 16,2 % de résistance aux fluoroquinolones chez *H. pylori*, avec des taux supérieurs en Europe (24,1 %) par rapport à l'Asie (11,6 %). Cette méta-analyse ne rapporte pas de données africaines concernant la résistance de *H. pylori* à ces antibiotiques (120).

4. Résistances doubles :

L'observation d'une double résistance primaire aux macrolides et aux nitro-imidazolés semble peu fréquente, il existe une double résistance primaire à la clarithromycine et au métronidazole chez 0,8 à 9,1 % des souches européennes testées (119). En revanche, la double résistance secondaire au traitement est plus fréquente (30,4 vs 17,3 % chez des enfants français) et peut avoisiner la moitié des cas (13).

Ainsi, la résistance aux antibiotiques de cette bactérie hautement polymorphe sur le plan génétique a une tendance nette à l'augmentation. Celle-ci semble en rapport, de manière prépondérante, avec la survenue de mutations ponctuelles (118) suite à une exposition préalable aux antibiotiques, d'autant que la compliance du patient au traitement est faible (127,134). L'observance du traitement est d'autant plus diminuée que le nombre de comprimés à prendre est élevé, et que ces antibiotiques ne sont pas dénués d'effets indésirables (136). La résistance résulte d'une pression de sélection des antibiotiques (118). A ces constatations, une récente étude a mis en évidence l'existence de doubles populations chez un même patient, avec des profils de résistance différents, que le patient ait été ou non, traité auparavant. Ces populations étaient retrouvées à des localisations distinctes au sein de l'estomac. Ceci, plaide en faveur de la nécessité de réaliser des antibiogrammes à partir de prélèvements étagés de la muqueuse (157).

Dans notre étude, bien que nous ayons observé une résistance élevée au métronidazole (40,1%), la double résistance (résistance à la clarithromycine et au métronidazole) a été étonnamment rare (4 cas, 2%). Avec de fortes prévalences de la résistance à la clarithromycine (28,6%) et au métronidazole (40,1%), on peut s'attendre plus à des résistances doubles. Nous n'avons pas trouvé de différence démographique significative entre les patients infectés par une souche résistante à la clarithromycine et les patients infectés par une souche résistante au métronidazole pour expliquer ce résultat. Dans cette situation particulière, l'alternative est d'utiliser un traitement guidé par les résultats de la détection de résistance. Plusieurs études ont montré les bienfaits médicaux et économiques d'une stratégie thérapeutique guidée par la résistance phénotypique (158-153). La résistance de *H. pylori* aux antibiotiques a un fort impact sur la réussite des traitements. Plusieurs articles rapportent dans la littérature la comparaison de l'efficacité d'un traitement adapté aux résultats d'un antibiogramme à celle d'un traitement empirique, Un traitement adapté aux résultats d'un antibiogramme nécessite une endoscopie, une biopsie, la réalisation de l'isolement et de l'antibiogramme alors qu'un traitement empirique ne nécessite qu'un test non invasif pour poser le diagnostic d'infection à *H. pylori*.

Mais les meilleurs taux d'éradication des traitements adaptés à l'antibiogramme évitent plus d'échecs thérapeutiques et donc moins de retraitements et de contrôles d'éradication (124, 156,159).

La connaissance du taux local de résistance aux antibiotiques est cruciale pour l'adaptation du choix local d'un traitement empirique de première ligne efficace pour l'éradication de l'infection par *H. pylori* (32). La Trithérapie standard contenant de la clarithromycine, proposée lors de la première conférence de Maastricht en 1997 pour traiter l'infection à *H. pylori*, est devenue universelle comme l'ont recommandé toutes les conférences de consensus organisées dans le monde. La perte d'efficacité observée dans de nombreux pays depuis le début du XXI^e siècle est due à l'augmentation de la prévalence de la résistance à la clarithromycine de *H. pylori* (48). Au Maroc, comme dans de nombreux pays, la trithérapie empirique à base de clarithromycine est largement utilisée comme traitement d'éradication de première ligne de l'infection par *H. pylori*, mais le taux de résistance primaire à la clarithromycine était inconnu. Nous avons démontré par la présente étude un taux de résistance de 28,6%, qui est largement supérieur au seuil de 15-20% recommandé par le rapport de consensus de Maastricht IV ce qui nous emmène à proposer aux cliniciens d'abandonner le traitement de première ligne à base de clarithromycine. Deux possibilités peuvent être proposées pour le traitement des patients infectés par *H. pylori*: soit un nouveau schéma impliquant une combinaison de plus d'antibiotiques pour le traitement empirique de première ligne ou une nouvelle stratégie thérapeutique guidée par des tests de sensibilité aux antibiotiques. Dans les régions où la résistance à la clarithromycine est élevée, des quadrithérapies contenant du bismuth sont recommandés pour le traitement empirique de première ligne (4,139, 141). Au Maroc, cependant, le bismuth n'est pas disponible. En conséquence, des traitements concomitants ou séquentiels sont recommandés en dépit des conséquences écologiques et des effets indésirables.

III- Séroprévalence de l'infection chez l'enfant :

L'infection à *Helicobacter Pylori* est une infection chronique essentiellement acquise durant l'enfance (160, 161). Les pays en voie de développement restent les plus touchés avec des taux qui peuvent atteindre 90% (162). La diminution de la prévalence globale de l'infection

à *H.pylori* observée dans plusieurs pays pourrait être attribuée à l'amélioration du niveau socio-économique dans la population ainsi qu'à l'élimination active de la bactérie par traitement antibiotique durant l'enfance (139,163).

Ainsi et vu le taux de prévalence élevé que nous avons rapporté, dans la première partie de cette étude, chez les patients adultes, nous nous sommes proposé de déterminer la prévalence de l'infection à *H.pylori* chez une population pédiatrique, de discuter certains facteurs de risque liés à cette infection ainsi que la place de la sérologie dans le diagnostic d'*H. pylori* chez les enfants symptomatique à fin de faciliter leur prise en charge thérapeutique.

1- Prévalence de l'infection :

1.1.Population générale :

Un total de 270 enfants âgés entre 2 et 17 ans ont participé à l'étude dont 164 (61%) enfants étaient asymptomatiques (groupe 1) et 106 (39%) étaient symptomatiques (groupe 2). Dans notre série, la présence d'anticorps anti *H. pylori* a été détectée chez 53% de l'ensemble des enfants étudiés (symptomatique et asymptomatiques). Ce taux a été proche de ceux retrouvés chez la population infantile dans d'autres pays en voie de développement tel que la Jordanie (55%) (164) et l'Iran (50 %) (165). Cependant, il reste plus élevé comparativement à d'autres pays comme la Turquie (44%) (166) ou encore le Liban (21%) (167). Notre taux a été aussi bien plus élevé comparativement aux données trouvées dans les pays occidentaux comme en Allemagne (11,3%), l'Italie (22%) et la Pologne (33%) (168, 169, 170).

Cette prévalence varie aussi dans les sous populations étudiées au sein du même pays. Elle serait plus élevée chez les patients symptomatiques que ceux qui sont asymptomatiques.

1.2.Prévalence de l'infection à *H pylori* chez les enfants asymptomatiques :

Les études sérologiques montrent que la prévalence de l'infection à *H pylori* est plus élevée dans les pays en voie de développement que dans les pays développés, ceci a été noté même dans la population asymptomatique. Dans notre étude, chez les enfants asymptomatiques, la prévalence a été de 41,5% (68/164). Ce taux est en situation intermédiaire: plus faible que celle

des séries pédiatriques des autres pays en voie de développement comme le Côte d'Ivoire (55%), Nigeria (69%) mais plus élevée que celle rapportée dans les pays industrialisés tel que l'Espagne (21,2%), Belgique (7,3%), États-Unis (31%) (171).

1.3. Prévalence de l'infection à *H. pylori* chez les enfants symptomatiques :

Dans notre étude la séroprévalence a été de 72%. En comparant ce résultat avec les données de littérature, notre séroprévalence semble proche des séroprévalences retrouvées dans des études effectuées dans les pays du Maghreb, en Tunisie, Maherzi et al et Bouktir et al ont rapporté successivement 54% et 62.3% (171, 172). Au Maroc, une étude réalisée à Rabat par Erreimi N et al a trouvé une prévalence de l'infection à *H. pylori* de 71% (173), une autre étude de cohorte rétrospective a rapporté un taux d'infection de 66.4% (33). Par contre, cette prévalence est considérée beaucoup plus élevée par rapport aux prévalences retrouvées dans les pays d'Europe et d'Amérique(174).

2. Prévalence selon Les facteurs de risque

2.1. Age :

Plusieurs études ont montrés que la prévalence d'infection varie avec l'âge (3,145). Dans notre série, une différence significative de séroprévalence a été observé entre les deux groupes symptomatiques et asymptomatiques ($p < 0,01$), avec une évolution régulière pour les premiers et irrégulières pour les deuxièmes. Pour le groupe I, la prévalence la plus élevée (41,2 %) a été retrouvée chez la tranche d'âge située entre 6 et 11 ans alors qu'elle a été de 56,6% chez les enfants qui ont l'âge entre 2 et 6 ans pour le groupe 2. Dans les pays en voie de développement, des prévalences élevées sont observées dans l'enfance au cours des 10 premières années de la vie pour atteindre 80% à l'adolescence et rester ensuite stable chez l'adulte, ceci a été confirmé par plusieurs études telles que les études effectuées au niveau les pays du Maghreb et du moyen orient et certains pays d'Afrique (171,145, 175).

2.2. Sexe :

Nous n'avons pas observé de différence significative pour le sexe chez les deux groupes étudiés, le sexe ratio était de 1,1. Cette répartition est diversement estimée par les auteurs, la prédominance masculine a été rapportée dans plusieurs études publiées dans la littérature sans qu'aucune justification n'a été avancée (33).

2.3. Niveau socio-économique et conditions de vie :

Nombreux travaux ont confirmés l'association de l'infection à *H.pylori* avec les conditions socioéconomiques et les conditions de vie : les mauvaises conditions d'hygiène, la promiscuité et la vie en collectivité sont autant de facteurs de risque favorisant l'infection à *H. pylori* (171, 169, 176). Les résultats de notre étude concordent parfaitement avec ces données, le revenu et l'habitat ont été les facteurs de risque les plus importants dans notre étude, l'infection a été fréquente chez les enfants issus de familles à niveau socioéconomique faible, une différence significative a été observée ($p=0,001$). La prévalence de l'infection à *H. pylori* était de 35 % chez les enfants issus d'un milieu défavorisé contre 21 % chez ceux issus d'un milieu aisé ($p < 0,05$). Le revenu familial a constitué un des critères les plus importants. D'autres facteurs de risque (en relation avec le niveau socio-économique) pour le développement de l'infection à *H. pylori* ont été étudiés par certains auteurs, mais ils n'ont pas été notés dans notre série, tels que le lieu de naissance, l'absence de toilettes à l'intérieur de l'habitat, l'absence de réfrigérateur, de salle de bain ainsi que le fait de partager le même lit (169,171).

2.4. Antécédents familiaux :

Les antécédents familiaux de la maladie peptique (gastrite, ulcère duodéal, cancer) sont intéressants à étudier. Dans notre étude la présence d'antécédents familiaux de maladies peptiques était plus fréquente chez les enfants *H. pylori* séropositifs (62,5%) vs (27,8%) chez les enfants *H. pylori* séronégatifs. Cette observation a été rapportée par de nombreux auteurs (177,178), ces données témoignent d'une propagation intrafamiliale de l'infection à *H. pylori* par le mode de transmission interhumain. Plusieurs auteurs rapportent un risque élevé quand les parents sont infectés. Des études publiées ont démontré que l'infection de la mère en contraste avec celle du père joue un rôle dans la transmission de l'infection chez les enfants, cette forte association entre les mères et leurs enfants infectés a été expliqué par de nombreux facteurs notamment par le contact personnel qui est plus fort et plus fréquent chez l'enfant en bas âge (179, 171, 146).

3. *H.pylori* et maladies gastroduodénales :

Chez l'enfant, la pathologie ulcéreuse gastrique et duodénale est rare, la gastrite induite par l'infection est peu intense est souvent asymptomatique et la relation cause à effet dominée par les douleurs abdominales reste discutée. Autres symptômes ont été décrits parfois au cours de cette infection à *H.pylori*, tel que des vomissements, des nausées, une dyspepsie, des éructation, une mauvaise haleine, un retard de croissance ou un amaigrissement, une anémie ferriprive ,des hématomèse ou méléna(180).

3.1. Douleurs abdominales :

Chez l'enfant, les manifestations sont souvent modestes, elles sont dominées par les douleurs abdominales récurrentes (174), mais la corrélation entre l'infection à *H. pylori* et la douleur récurrente reste discutée pour certains auteurs, aucune corrélation n'a été notée (180, 181). Cependant, d'autres auteurs ont rapporté une association significative entre l'infection à *H. pylori* et la douleur abdominale (182, 183). Cette discordance des résultats entre les études pourrait être expliquée par les méthodes d'étude utilisées pour définir l'infection à *H. pylori*. L'étude sérologique par exemple ne peut distinguer entre une infection aigüe active ou ancienne contrairement à d'autres méthodes (culture ou test respiratoire à l'urée). Dans notre série, la présence des douleurs abdominales a été retrouvée à 80,3% chez les enfants *H. pylori* séropositifs vs 53,3% chez les *H. pylori* séronégatifs avec une différence significative ($p < 0,006$). Par contre, une méta analyse incluant 45 études pédiatriques, montre chez des enfants qui ont eu une endoscopie digestive pour des douleurs abdominales récurrentes, que la prévalence de l'infection à *H. pylori* est en moyenne de 22 % (variant de 0 à 81 %), et qu'elle n'est pas corrélée avec la présence de douleurs abdominales récurrentes (seuls 6 % des enfants avaient une infection à *H. pylori*) (184). On peut donc penser que la gastrite est responsable des douleurs abdominales et que l'infection à *H pylori* n'en est que l'une des causes. Si non, les liens entre l'infection à *H pylori* et la douleur abdominale chez l'enfant existent, mais difficiles à démontrer.

Le diagnostic clinique de l'infection à *H. pylori* reste discuté en absence de consensus pédiatrique. Les douleurs ne sont pas systématiquement liées à l'infection à *H. pylori* chez les enfants. Il serait judicieux d'étudier l'association des douleurs abdominales avec d'autres facteurs de risques et de prendre en considération ces facteurs de risque notamment dans les pays où la prévalence de cette infection est élevée. Il est donc souhaitable d'entreprendre des études et valider le score des douleurs abdominales en pédiatrie afin de préciser dans quelles

situations particulières faut-il indiquer une endoscopie avec biopsies devant des douleurs abdominales récurrentes.

3.2. Les vomissements :

Les vomissements sont fréquents bien qu'inconstants. Dans notre série, 10% des enfants infectés présentaient des vomissements souvent chroniques, ce taux reste inférieur aux résultats trouvés dans la série de Rabat étudiée par Erreimi et al (20%) (173).

3.3. Anémie :

Une association entre l'anémie ferriprive et l'infection a été démontrée dans quelques études (185,51), ce qui ne concorde pas avec nos résultats, puisque seulement 9% des enfants séropositifs ont présenté une anémie alors que 33% étaient séronégatifs.

4. Évaluation du test sérologique (ELISA) par rapport aux résultats anatomopathologiques :

L'anatomopathologie occupe une place importante dans le diagnostic de l'infection active à *H.pylori* mais l'inconvénient réside dans la réalisation d'une endoscopie pour obtenir des biopsies gastriques. Dans notre série la sérologie avait une sensibilité de 76,3% et une spécificité de 73% par rapport à l'anatomopathologie. Une étude récente évaluant de nombreuses trousse sérologiques d'ELISA a trouvé une bonne sensibilité et spécificité de nombreux tests sérologiques (186).

Dans les pays en voie de développement où les infrastructures sanitaires sont souvent inadéquates et ne permettent pas toujours ce geste, quand le recours aux autres moyens de diagnostic invasif et non invasif, le test immunologique (sérologie) reste un examen de diagnostic fiable et peu coûteux surtout quand il est associé à des facteurs de risques socioéconomiques, aux antécédents familiaux de maladie dyspeptiques et la présence de douleurs abdominales récurrentes, il peut être un élément de diagnostic d'infection à *H.pylori* chez les enfants.

La prise en charge thérapeutique précoce de ces enfants pourrait diminuer le risque de maladie associées principalement l'ulcère gastroduodéal et ultérieurement l'adénocarcinome gastrique.

Conclusion

Conclusion

Pendant longtemps, l'ulcère gastroduodéal fut considéré par les médecins comme résultant d'un stress ou d'un régime alimentaire inadéquat. Seuls les traitements symptomatiques permettaient alors un soulagement temporaire des douleurs gastriques. Puis le rôle pathogène d'*Helicobacter pylori* a été révélé dans de nombreuses pathologies gastroduodénales tels que: la gastrite chronique, les ulcères gastroduodénaux et les deux néoplasies gastriques (l'adénocarcinome et le lymphome du mucoosa associated lymphoid tissu (MALT)) ainsi que dans certaines affections extra-digestives.

À fin d'endiguer cette maladie infectieuse des stratégies d'éradication basée sur la trithérapie associant IPP et antibiotiques ont été préconisées dès les années 90. Malheureusement, progressivement cette thérapie a connu une perte d'efficacité qui s'est accentuée cette dernière décennie en raison d'un accroissement des résistances aux antibiotiques particulièrement la clarithromycine qui est l'un des antibiotiques les plus efficaces dans le traitement d'*H. pylori*. La résistance à cette molécule apparaît comme une des principaux facteurs de l'échec du traitement d'éradication d'*H. pylori*.

Notre travail a permis de déterminer la prévalence de l'infection à *H. pylori* chez l'adulte, étudier la sensibilité des souches isolée aux antibiotiques ainsi que la contribution moléculaire dans la détection de l'ADN bactérien et les mutations impliquées dans cette résistance. ainsi, 69,4% patients ont été infectés, la prévalence des résistances primaires de *H. pylori* à la clarithromycine était de 28,6%, 40,1% au métronidazole, 0% à l'amoxicilline, la tétracycline et la rifampicine, et 10,7% à la lévofloxacine . La mutation A2142G était fortement retrouvée (61,6%) contre (35.6%) pour la mutation A2143G. L'étude nous a permis aussi d'évaluer la séroprévalence de l'infection à *H.pylori* chez l'enfant, la présence d'anticorps de type IgG anti-*H. pylori* a été mise en évidence chez 53% des enfants étudiés. Le revenu des parents, l'habitat et La présence d'antécédents familiaux ont été les facteurs de risque les plus importants dans notre étude. Le diagnostic clinique basé sur la symptomatologie rapportée par les enfants était dominée par les douleurs abdominales (80%).

Les recommandations actuelles présentées dans le consensus Maastricht IV indiquent que la stratégie thérapeutique doit tenir compte de la prévalence nationale de la résistance aux antibiotiques. Au-dessus du seuil de 20% de résistance, un antibiotique ne peut être utilisé dans le traitement d'éradication sans tester la sensibilité de la souche aux antibiotiques. Ce travail avait comme objectif d'étudier la sensibilité d'*H.pylori* aux antibiotiques. Les résultats obtenus ont démontré un niveau élevé de résistance notamment à la clarithromycine et au métronidazole. Au terme de ces résultats, il est temps de dire qu'il faut élaborer une stratégie thérapeutique guidée par les résultats de l'étude de la sensibilité d'*H.pylori* aux antibiotiques. La détermination de la sensibilité à la clarithromycine est maintenant bien validée pour la méthode du disque d'érythromycine ou du E-test. Des méthodes moléculaires permettent aussi la détection rapide et fiable directement sur les biopsies gastro-duodénales.

À l'avenir, La mise au point de la détection de la bactérie et sa résistance ainsi que les mutations responsables de cette résistance à partir des selles des patients par biologie moléculaire pourrait proposer un diagnostic non invasif qui permettrait l'adaptation du traitement antibiotique de première intention. L'administration d'un traitement adapté permet non seulement de diminuer le taux des échecs d'éradication, mais aussi de diminuer la pression de sélection favorisant l'émergence des résistances.

Perspectives :

Suite aux résultats de cette étude prospective, plusieurs propositions peuvent être envisagées :

- Étudier la prévalence de la résistance d'*H. pylori* chez les enfants à fin d'évaluer l'état des lieux au Maroc et avoir nos propres chiffres, pour mettre en place des stratégies nationales adéquates pour la lutte contre cette infection.
- Étudier la résistance aux antibiotiques par une approche génomique qui nécessite la mise en place de technique de séquençage du génome suivi par une analyse bioinformatique approfondie des données générées. En effet, le génome bactérien est exposé à plusieurs événements génétiques, incluant les mutations, les duplications, les inversions, les transpositions, les délétions, les recombinaisons et les insertions qui peuvent conférer une nouvelle capacité métabolique à l'organisme qui a subi ces modifications. Pour repérer ces modifications impliquées dans la résistance, l'analyse comparative de souches résistantes et sensibles aux antibiotiques se présente comme une méthode de choix pour étudier les mécanismes impliqués dans la résistance et pour élucider le mode d'action des antibiotiques. L'étude comparative des génomes par hybridation sur puce a été initialement utilisée pour déterminer les mutations contenues dans des souches résistantes aux antibiotiques. De nos jours, la caractérisation génomique repose principalement sur des techniques de séquençage de nouvelles générations (NGS) qui ont révolutionné le séquençage des génomes. Pour réaliser cet objectif nous avons commencé une étude qui a consisté à la caractérisation génomique de la résistance de bactéries infectieuses aux antibiotiques à l'aide d'outils NGS à fin de séquencer les gènes des souches résistantes isolées et déterminer les différences génomiques observées entre nos souches isolées et les souches provenant des zones géographiques différentes.
- Valider la détection d'*H.pylori* et sa résistance à partir des selles des patients par biologie moléculaire à fin de proposer un test de diagnostic non invasif.
- Identifier un profil de la flore gastrique bactérienne et fongique caractéristique des lésions cancéreuses gastriques comme biomarqueurs.
- Envisager l'intérêt de greffe de microflore gastrique comme outil de prévention de cancer gastrique.

Annexe

Annexe 1

Fiche d'exploitation

Identité

Nom:

Sexe:

Adresse:

Prénom:

Age:

Date:

Antécédents personnels :

Ulcère gastrique: Ulcère duodéal: Hémorragie digestive:

Traitement antérieur par IPP: Oui

Non

Traitement d'éradication : Oui

Non

Facteurs de risque :

Revenu mensuel (des parents): ≤2000 dhrs: 2000 -5000 dhrs: ≥5000 dhrs

Niveau d'habitat : mauvais

moyen

bon

Antécédents Familial : Oui

Non

Symptomatologie :

Syndrome ulcéreux: Epigastralgie: RGO: Syndrome anémique: vomissement : Autres:

Fibroskopie digestive

Aspect endoscopique:

Prélèvements

Biopsie: sang :

Examens :

- Histologie:

-Test à l'uréase:

-Culture bactérienne:

-Antibiogramme :

▪ ATB sensible:

▪ ATB résistant:

-Biologie moléculaire (PCR) :Positif

négatif

-Sérologie : Positif

négatif

Annexe 2

Procédure d'extraction

Étape 1 : Préparation d'échantillon :

Les biopsies doivent être broyées avec un scalpel stérile avant de commencer l'extraction.

Étape 2 : Préparation de lysat :

- Placer l'échantillon préparé (biopsie) dans un microtube stérile
- Ajouter 180 µl de de tampon ATL (tampon de Lyse).
- Ajouter 20 µl de Protéinase K

Remarque : S'assurer que le tissu est complètement immergé dans le tampon.

- Fermer le tube et vortexer.
- Incuber à 56°C
- mélanger au vortex de temps en temps jusqu'à lyse complète (1 à 4h).
- Ajouter 200 µl de tampon AL à l'échantillon, mélanger au vortex pendant 15 s
- Incuber à 70 ° C pendant 10 min.
- Ajouter 200 µl d'éthanol (100%), fermer le tube et vortexer pendant 5 s.
- Procéder immédiatement à l'étape de purification.

Étape 3 : Purification de l'ADN

- Placer la colonne (QIAamp Column) dans un tube collecteur.
- Mettre soigneusement tous le lysat dans la colonne.
- Fermer le bouchon et centrifuger à 6 000 xg pendant 1 min.
- Placer la colonne dans un tube collecteur propre, et jeter le tube contenant le filtrat.
- Ouvrir délicatement la colonne et ajouter 500 µl de Wash 1.
- fermer le bouchon et centrifuger à 6 000 x g pendant 1 min.

- Placer la colonne dans un autre tubecollecteur propre et jeter le tube contenant le filtrat.
- ajouter 500 µl de Wash buffer 2; fermer le bouchon et centrifuger à vitesse maximale pendant 3 min.

Étape 4 : L'élution

- Placer la colonne dans un tube de 1,5 ml à centrifuger propre et jeter le tube collecteur.
- Ouvrir avec précaution le couvercle de la colonne et ajouter 100 µl de tampon AE ou d'eau distillée
- Fermer le couvercle et incuber à température ambiante pendant 1 min.
- Centrifuger à 6 000 x g pendant 1 min.
- Garder le tube 1,5ml et jeter la colonne.
- Conserver l'ADN purifié à -20°C jusqu'à utilisation.

Résumé

Résumé :

Nom et Prénom : BOUIHAT Najat

Titre : Épidémiologie et résistance d'*Helicobacter pylori* aux antibiotiques dans une population marocaine: étude phénotypique et génotypique

Objectif: La connaissance de la résistance aux antibiotiques locale est cruciale pour l'adaptation du choix d'un traitement efficace de l'infection à *Helicobacter pylori*.

Le but de cette étude était d'évaluer, la prévalence de l'infection chez l'adulte et l'enfant et déterminer la résistance primaire de *H. pylori* aux principaux antibiotiques utilisés dans le traitement de l'infection à *H.pylori*.

Matériels et méthodes: Nous avons mené une étude prospective de 5 ans (2011-2016), qui a compris 367 patients adultes adressés pour endoscopie digestive et non traités auparavant pour l'infection à *H. pylori*. Trois biopsies gastriques antrales ont été recueillies: une pour l'histologie, une pour la culture et la troisième pour la détection moléculaire de *H. pylori* et les mutations dans les gènes 23S qui confèrent la résistance à la clarithromycine avec une PCR en temps réel utilisant des amorces de scorpion. Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés sur la souche isolée par Etest et la méthode de diffusion de disque en milieux gélosés. L'étude a intégré aussi 270 enfants âgés de 2 ans à 17 ans repartis en deux groupes. Le premier groupe a inclus 164 enfants consultant pour autres symptômes non digestives (asymptomatiques), le deuxième groupe a inclus 106 enfants présentant une symptomatologie digestive et ayant une indication pour une endoscopie gastroduodénale avec biopsie à la recherche de l'infection à *H.pylori* par méthode anatomopathologique. Tous ces enfants ont été soumis à un prélèvement de sang total (3 à 4 ml) en vue d'une étude sérologique par la méthode immuno-enzymatique « Elisa *H. pylori* IgG » portant sur l'infection à *H. pylori*. Le consentement des parents était obtenu au préalable pour tous les enfants inclus dans cette étude.

Résultats: chez l'adulte, 255 patients ont été infectés par *H.pylori* (69,5%). La prévalence des résistances primaires de *H. pylori* à la clarithromycine était de 28,6%, 40,1% au métronidazole, 0% à l'amoxicilline, la tétracycline et la rifamycine, et 10,7% à la lévofloxacine. Seuls 4 isolats (2%) étaient résistants à la fois la clarithromycine et le métronidazole. La mutation A2142G a été fortement retrouvée (61,6%) contre (35,6%) pour la mutation A2143G et (8,2%) pour la mutation A2142C. Chez l'enfant, la présence d'anticorps de type IgG anti-*H. pylori* a été mise en évidence chez 144 des 270 enfants étudiés, soit 53% des cas. Chez les enfants asymptomatiques, ce taux a été de 41,5% vs 72% chez les enfants symptomatiques. La séroprévalence à *H.pylori* a augmenté régulièrement avec l'âge d'une manière globale, pour les 2 groupes étudiés, le revenu des parents, l'habitat et la présence d'antécédents familiaux ont été les facteurs de risque les plus importants dans notre étude. La symptomatologie la plus corrélée avec la présence à d'*H.pylori* était les douleurs abdominales à (80%).

Conclusions: La prévalence de l'infection à *H. pylori* chez la population étudiée reste élevée aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte. Le niveau élevé de la résistance à la principale molécule active sur *H.pylori* (clarithromycine) implique la recherche systématique de cette résistance avant toute instauration d'une antibiothérapie. La sérologie pourrait être une alternative pour détecter les infections gastriques à *H.Pylori* surtout dans les cas où les tests invasifs ne sont pas indiqués à fin d'assurer la prise en charge thérapeutique précoce des enfants et diminuer le risque de maladie associées principalement l'ulcère gastroduodénal et ultérieurement l'adénocarcinome gastrique

Mots clefs: *Helicobacter pylori*, prévalence, résistance, antibiotique, sérodiagnostic

Abstract

Author name: BOUIHAT Najat

Title: Epidemiology and resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics in a Moroccan population: phenotypic and genotypic study

Objective: Knowledge of local antibiotic resistance is crucial to adaption of the choice of effective treatment for *Helicobacter pylori* infection. The aim of this study was evaluate the prevalence of infection in the adult and the child and to determine the primary resistance of *H. pylori* to the main antibiotics used in the treatment of *H. pylori* infection.

Material and methods: We conducted a 5-year prospective study (2011-2016), which included 367 adulterated patients referred for digestive endoscopy and never previously treated for *H. pylori* infection. Three gastric biopsies were collected: one for histology, one for culture and one for the molecular detection of *H. pylori* and the mutations in 23S rRNA genes that confer resistance to clarithromycin with real-time PCR using of the scorpion primers. Antimicrobial susceptibility testing was performed on the isolated strain by Etest and disk diffusion method. The study also included 270 children aged 2 to 17 years divided into two groups. The first group included 164 asymptomatic children, the second group included 106 children with digestive symptoms and indication for gastroduodenal endoscopy with biopsy for detecting *H. pylori* infection with Anatomopathological method. All of these children were subjected to total blood sample for serological study using the enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) *H. pylori* IgG". Parental consent was obtained in advance for all children included in this study.

Results: 255 patients adults were infected with *H. pylori* (69,5%). The prevalence of primary resistances of *H. pylori* to clarithromycin was 28.6%, 40% to metronidazole, 0% to amoxicillin, tetracycline and rifamycin, and 10.7% to levofloxacin. Only 4 isolates (2%) were resistant to both clarithromycin and metronidazole. The A2142G mutation was strongly found (61.6%) versus (35.6%) for the A2143G mutation and (8.2%) for the A2142C mutation. The presence of antibodies of IgG anti-*H. Pylori* was detected in 144 of the 270 children studied (53%). In asymptomatic children, this rate was 41.5% vs. 72% in symptomatic children. *H. pylori* seroprevalence increased steadily with age overall, for the 2 groups studied, Parents, habitat and presence of family history were the most important risk factors in our study. The symptomatology most correlated with the presence of *H. pylori* was abdominal pain at (80%).

Conclusion: The prevalence of *H. pylori* infection in the population remains high in both children and adults. The high level of resistance to the main active molecule on *H. pylori* (clarithromycin) implies a systematic search for this resistance before any initiated antibiotic therapy. Serology could be an alternative for detecting gastric infections of *H. Pylori*, especially in cases where invasive tests are not indicated to ensure early therapeutic management of children and reduce the risk of illness, Peptic ulcer and subsequently gastric adenocarcinoma.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Prevalence, resistance, antibiotic, serodiagnosis

ملخص

اسم الكاتب: بويهات نجاة

العنوان: التهابات المعدة و مقاومة الملوية البوابية (جرثومة المعدة) للمضادات الحيوية عند عينة من المجتمع المغربي: دراسة مظهرية ووراثية.

الهدف: تعتبر معرفة المقاومة المحلية للمضادات الحيوية أمرا حاسما لاختيار العلاج الفعال ضد التهابات المعدة بجرثومة المعدة (الملوية البوابية). يهدف هذا البحث إلى تقييم مدى انتشار هذه الالتهابات عند الكبار والأطفال و تحديد المقاومة الرئيسية ضد المضادات الحيوية المستخدمة في علاج الإصابة بجرثومة المعدة.

المواد والطرق: إنها دراسة استطلاعية لمدة 5 سنوات (2011-2016) و قد شملت 367 مريضا لم يخضعوا سابقا لاي علاج ضد التهابات المعدة بالملوية البوابية. أخذت ثلاث خزعات معدية لكل مريض, من أجل القيام بالدراسة النسيجية, البكتيرية و الوراثة ثم الكشف عن طفرات في الجينات (23s rNAr) التي تمنح الملوية البوابية مقاومة ضد الكلاريترومييسين.

دمجت الدراسة أيضا 270 طفل تتراوح أعمارهم بين 2 و 17 سنة, قسموا إلى مجموعتين. تتكون المجموعة الأولى من 164 طفل جاؤوا للاستشارة لأعراض غير هضمية و تتكون المجموعة الثانية من 106 طفل يعانون من أعراض في الجهاز الهضمي. تم اخذ عينة من الدم لكل الأطفال قصد إجراء دراسة مصلية للكشف عن عدوى البكتريا.

النتائج: 255 مريض من الكبار يعانون من التهابات المعدة بالملوية البوابية بمعدل (69,5%). وقد كانت نسبة انتشار مقاومة الملوية البوابية ضد الكلاريترومييسين تناهز (28,6%) و (40,1%) ضد الميترونيدازول و (0%) ضد كل من الاموكسيسيلين, تتراسكلين و ريفاميسين ثم (10,7%) ضد الليفوفلوكساسين. (2%) فقط من الحالات شكلوا نسبة مقاومة الملوية البوابية ضد كل من الكلاريترومييسين و الميترونيدازول في نفس الوقت. ثم العثور على طفرة (A2142G) بنسبة (61,6%) مقابل (35,6%) لطفرة (A2143G) و (8,2%) عن طفرة (A2142C).

بالنسبة للأطفال فقد كانت نسبة نتائج وجود أجسام مضادة ضد الملوية البوابية كالتالي: 53% بالنسبة لجميع الأطفال, (41,5%) بالنسبة للأطفال اللذين ليس لديهم أعراض مقابل (72%) عند الأطفال اللذين يعانون من أعراض في الجهاز الهضمي, و قد ارتبطت الإصابة بالتهاب جرثومة المعدة عند الأطفال بالعوامل التالية: دخل الوالدين, ووجود إصابة عائلية و كذلك وجود آلام في البطن بنسبة (80%).

استنتاجات: تبقى نسبة انتشار الإصابة بجرثومة المعدة في دراستنا مرتفعة عند الكبار والصغار, نلاحظ كذلك ارتفاعا في مستوى مقاومة هذه البكتيريا للمضادات الحيوية مما يتطلب ضرورة القيام بالبحث عن هذه المقاومة قبل الخضوع للعلاج بالمضادات الحيوية. كما يمكن اعتبار البحث عن الأمصال بديلا للكشف عن التهاب المعدة بالملوية البوابية عند الأطفال للتقليل من خطر الإصابة بالأمراض الأخرى المرتبطة بهذا الالتهاب.

الكلمات المحورية: الملوية البوابية, انتشار, مقاومة, مضادات حيوية, أمصال

Publications

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Marshall, B. J. and J. R. Warren. "Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration." *Lancet*1(8390). **1984**: 1311-1315.
2. Parkin, D. M., F. Bray, et al. "Global cancer statistics, 2002." *CA Cancer J Clin.* **2005**.55(2): 74-108.
3. Suerbaum, S., and Michetti, P.**2002**.*Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* . **2005**.347: 1175-86.
4. Malfertheiner, P., Mégraud, F., O'Morain, C., Atherton, J., Axon, A.T., Bazzoli, F., Gensini, G.F., Gisbert, J.P., Graham, D.Y., Rokkas, T., El-Omar, E.M., and Kuipers, E.J. Management of *Helicobacter pylori* infection - The Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut* . **2012**.61: 646-64.
5. Haesebrouck, F., et al., *Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health.* *Clin Microbiol Rev*, **2009**. 22(2): p. 202-23, Table of Contents.
6. Megraud, F., [*When and how does Helicobacter pylori infection occur?*].*Gastroenterol Clin Biol*, **2003**. 27(3 Pt 2): p. 374-9.
7. Tomb, J.F., et al., *The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori.**Nature*, **1997**. 388(6642): p. 539-47.
8. Alm, R.A. and T.J. Trust, *Analysis of the genetic diversity of Helicobacter pylori: the tale of two genomes.**J Mol Med (Berl)*, **1999**. 77(12): p. 834-46.
9. Alm, R.A., et al., *Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen Helicobacter pylori.**Nature*, **1999**.397(6715): p. 176-80.
10. Axon, A.T., *Are all helicobacters equal? Mechanisms of gastroduodenal pathology and their clinical implications.**Gut*, **1999**. 45 Suppl 1: p. I1-4.
11. Nitharwal, R.G., et al., *Helicobacter pylori chromosomal DNA replication: current status and future perspectives.* *FEBS Lett*, **2011**. 585(1): p. 7-17.

12. Logan, R.P. and D.E. Berg, *Genetic diversity of Helicobacter pylori*. *Lancet*, **1996**. 348(9040): p. 1462-3.
13. De Korwin JD. *Helicobacter pylori* 30 years after: What's new?. *Rev Med Interne*. **2014** Sep;35(9):561-4.
14. Tan, S., L. S. Tompkins, et al. "Helicobacter pylori usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche." *PLoS Pathog* . **2009**.5 (5): e1000407.
15. Broutet N, Mégraud F. Epidémiologie de l'infection à *helicobacter pylori*. In *Helicobacter Pylori*, vol 1 (ed ; F. Mégraud et H. Lamouliatte). **1996**. Elsevier, Paris : 79-100.
16. Conroy M.C, Antoine C, Weber M. Apport de la culture dans le cadre du diagnostic d'infection gastroduodénale à *Helicobacter pylori*. Expérience nancéenne de 1985 à 1992. *Annales médicales de Nancy et de l'Est* ; **1994**. 33, 95-96.
17. De Korwin JD. [New recommendations for the diagnosis and the treatment of *Helicobacter pylori* infection]. *Presse Med*. **2013**.42(3):309-17. doi: 10.1016/j.lpm.2012.07.014.
18. CA-SFM **2014**. Recommendations 2014 [http://www.sfu-microbiologie.Org/UserFiles/files/casfm/CASFM_EUCAST_V1_0_2014\(1\).pdf](http://www.sfu-microbiologie.Org/UserFiles/files/casfm/CASFM_EUCAST_V1_0_2014(1).pdf)
19. Krajden S, Fuksa M, Anderson J, Kempston J, Boccia A, Petrea C, Babida C, Karmali M, Penner J.L. Examination of human stomach biopsies, saliva and dental plaque for *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* ; **1989**.27, 1397.
20. Mapstone N.P, Lynch D.A.F, Lewis F.A, Axon A.T.R, Tompkins D.S, Dixon M.F, Quirke P. PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. *Lancet* ; **1993**.341, 447.
21. Vincent P. 1996. Acquisition et transmission de l'infection à *helicobacter pylori*. In *Helicobacter pylori*, vol ;1 (ed. F. Mégraud et H. Lamouliatte), Elsevier, Paris : 101-117.
22. Granstrom, M., Y. Tindberg, and M. Blennow, *Seroepidemiology of Helicobacter pylori infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age*. *J Clin Microbiol*, **1997**. 35(2): p. 468-70.
23. Bardhan P.K. Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Clin. Infect. Dis*. **1997**.25: 973-978.

24. Shi R., Xu S., Zhang H., Ding Y., Sun G., Huang X. Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Chinese populations. *Helicobacter*. **2008**. 13: 157-165.
25. Lu, Y., et al., *Isolation and genotyping of Helicobacter pylori from untreated municipal wastewater*. *Appl Environ Microbiol*, **2002**. **68**(3): p. 1436-9.
26. Secka, O., Berg, D.E., Antonio, M., Corrah, T., Tapgun, M., Walton, R., Thomas, V., Galano, J.J., Sancho, J., Adegbola, R.A., and Thomas, J.E. Antimicrobial susceptibility and resistance patterns among *Helicobacter pylori* strains from The Gambia, West Africa. *Antimicrobial Agents Chem*. **2013**. **57**: 1231-7.
27. Oyediji, K.S., Smith, S.I., Coker, A.O., and Arigbabu, A.O. Antibiotic susceptibility patterns in *Helicobacter pylori* strains from patients with upper gastrointestinal pathology in western Nigeria. *Br J Biomed Sci*. **2009**. **66**: 10-3.
28. Asrat, D., Kassa, E., Mengistu, Y., Nilsson, I., and Wadstrom, T. Antimicrobial susceptibility pattern of *Helicobacter pylori* strains isolated from adult dyspeptic patients in Tikur Anbassa University Hospital, Addis Ababa, Ethiopia. *Ethiop Med*. **2004**. **42**: 79-85.
29. Mégraud, *FH pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*. **2004**. **53**: 1374-84.
30. Sherif, M., Mohran, Z., Fathy, H., Rockabrand, D.M., Rozmajzi, P.J., and Frenck, R.W. Universal high-level primary metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* isolated from children in Egypt. *J Clin Microbiol*. **2004**. **42**: 4832-4.
31. Krejs, G. J. "Gastric cancer: epidemiology and risk factors." *Dig Dis*. **2010**. **28**(4-5): 600-603.
32. Lahbabi, M., Alaoui, S., El Rhazi, K., El Abkari, M., Nejjari, C., Amarii, A., Bennani, B., Mahmoud, M., Ibrahim, A., and Benajah, D.A. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication: result of the HPFEZ randomized study. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. **2013**. **37**: 416-21.
33. Attaf N., Cherkaoui N., Choulli M.K., Ghazali L., Mokhtari A., Soulaymani A. Profil épidémiologique de l'infection à *Helicobacter pylori* dans la région de Gharb-chrarda – Béni Hssen. *Biologie et santé*. **2004**; **4** (1): 25-34.

34. Azevedo NF, Huntington J, Goodman KJ. The epidemiology of *Helicobacter pylori* and public health implications. *Helicobacter*. **2009** .Sep;14 Suppl 1:1-7.
35. Graham, D. Y., A. R. Opekun, et al. "Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers." *Gut*. **2004**.53(9): 1235-1243.
36. Kusters, J. G., A. H. van Vliet, et al. "Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection." *Clin Microbiol Rev*. **2006**.19(3): 449-490.
37. Seddik, H., Ahid, S., El Adioui, T., El Hamdi, F.Z., Hassar, M., Abouqal, R., Cherrah, Y., and Benkirane, A. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a prospective randomized study. *Eur J Clin Pharmacol*. **2013**.69: 1709-15.
38. Ben Ammar A, Cheikh I, Ouerghi H, Chaabouni H, Kchaou M, Ben Mami N. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in duodenal ulcer. Data of a prospective study apropos of 78 NSAID-negative patients with duodenal ulcer. *Tunis Med*. **2002** Oct;80(10):599-604.
39. Kuipers, E. J., A. M. Uytterlinde, et al. "Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis." *Lancet*. **1995**. 345(8964): 1525-1528.
40. Kuipers, E. J., L. Lundell, et al. "Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis treated with omeprazole or fundoplication." *N Engl J Med*. **1996**.334(16): 1018-1022.
41. Wroblewski, L. E., R. M. Peek, Jr., et al. "*Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk." *Clin Microbiol Rev*. **2010**.23(4): 713-739.
42. Sipponen, P. and B. J. Marshall. "Gastritis and gastric cancer. Western countries." *Gastroenterol Clin North Am*. **2000**. 29(3): 579-592, v-vi.
43. Baik, S. C., H. S. Youn, et al. "Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa." *Cancer Res*. **1996**.56(6): 1279-1282.
44. Farinati, F., R. Cardin, et al. "Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis." *Gut*. **1998**.42(3): 351-356.
45. Lwai-Lume, L., Ogutu, E.O., Amayo, E.O., and Kariuki, S. Drug susceptibility pattern of *Helicobacter pylori* in patients with dyspepsia at the Kenyatta National Hospital, Nairobi. *East Afr Med J*. **2005**.82: 603-8.
46. Ding, S. Z., Y. Minohara, et al. "*Helicobacter pylori* infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells." *Infect Immun*. **2007**.75(8): 4030-4039.

47. Capelle, L. G., A. C. de Vries, et al. "Gastric MALT lymphoma: epidemiology and high adenocarcinoma risk in a nation-wide study." *Eur J Cancer*. **2008**.44(16): 2470-2476.
48. Mégraud, F., Coenen, S., Versporten, A., Kist, M., Lopez-Brea, M., Hirschl, A.M., Andersen, L.P., Goossens, H., and Glupczynski, Y. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*. **2013**.62: 34-42.
49. DuBois, S. and D.J. Kearney, *Iron-deficiency anemia and Helicobacter pylori infection: a review of the evidence*. *Am J Gastroenterol*, **2005**. 100(2): p. 453-9.
50. Choe, Y.H., et al., *Randomized placebo-controlled trial of Helicobacter pylori eradication for iron-deficiency anemia in preadolescent children and adolescents*. *Helicobacter*, **1999**. 4(2): p. 135-9.
51. Chaabane, N.B., et al., *[Role of Helicobacter pylori infection in iron deficiency anemia]*. *Presse Med*, **2011**. 40(3): p. 239-47.
52. Annibale, B., et al., *Concomitant alterations in intragastric pH and ascorbic acid concentration in patients with Helicobacter pylori gastritis and associated iron deficiency anaemia*. *Gut*, 2003. 52(4): p. 496-501.
53. Ciacci, C., et al., *Helicobacter pylori impairs iron absorption in infected individuals*. *Dig Liver Dis*, **2004**. 36(7): p. 455-60.
54. Gasbarrini, A., et al., *Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of Helicobacter pylori*. *Lancet*, **1998**. 352(9131): p. 878.
55. Franchini, M. and D. Veneri, *Helicobacter pylori-associated immune thrombocytopenia*. *Platelets*, **2006**. 17(2): p. 71-7.
56. Emilia, G., et al., *Helicobacter pylori infection and chronic immune thrombocytopenic purpura: long-term results of bacterium eradication and association with bacterium virulence profiles*. *Blood*, **2007**. 110(12): p. 3833-41.
57. de Korwin, J.D., *[Does Helicobacter pylori infection play a role in extragastric diseases?]*. *Presse Med*, **2008**. 37(3 Pt 2): p. 525-34.

58. Marino, M.C., et al., *Long-term effect of Helicobacter pylori eradication on plasma homocysteine in elderly patients with cobalamin deficiency.* Gut, **2007**. 56(4): p. 469-74.
59. Gaig, P., et al., *Efficacy of the eradication of Helicobacter pylori infection in patients with chronic urticaria. A placebo-controlled double blind study.* Allergol Immunopathol (Madr), **2002**. 30(5): p. 255-8.
60. Moreira, A., et al., *Is Helicobacter pylori infection associated with chronic idiopathic urticaria?* Allergol Immunopathol (Madr), **2003**. 31(4): p. 209-14.
61. Wedi, B. and A. Kapp, *Helicobacter pylori infection in skin diseases: a critical appraisal.* Am J Clin Dermatol, **2002**. 3(4): p. 273-82.
62. Kanbay, M., A. Kanbay, and S. Boyacioglu, *Helicobacter pylori infection as a possible risk factor for respiratory system disease: a review of the literature.* Respir Med, **2007**. 101(2): p. 203-9.
63. Covacci, A., S. Censini, et al. "Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of Helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer." Proc Natl. **1993**.
64. Censini, S., C. Lange, et al. "cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors." Proc Natl Acad Sci U S A. **1996**.93(25): 14648-14653.
65. Akopyants, N. S., S. W. Clifton, et al. "Analyses of the cag pathogenicity island of Helicobacter pylori." Mol Microbiol. **1998**. 28(1): 37-53.
66. Kuipers, E. J., G. I. Perez-Perez, et al. "Helicobacter pylori and atrophic gastritis: importance of the cagA status." J Natl Cancer Inst. **1995**.87(23): 1777-1780.
67. Parsonnet, J., G. D. Friedman, et al. "Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection." Gut. **1997**.40(3): 297-301.
68. Odenbreit, S., J. Puls, et al. "Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion." Science. **2000**.287(5457): 1497-1500.

69. Stein, M., F. Bagnoli, et al. "c-Src/Lyn kinases activate Helicobacter pylori CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs." *Mol Microbiol.* **2002.**43(4): 971-980.
70. Higashi, H., R. Tsutsumi, et al. "SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein." *Science.* **2002.** 0295(5555): 683-686.
71. Tsutsumi, R., H. Higashi, et al. "Attenuation of Helicobacter pylori CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase." *J Biol Chem.* **2003.**278(6): 3664-3670.
72. Naumann, M., S. Wessler, et al. "Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by Helicobacter pylori encoding the cag pathogenicity island." *J Biol Chem.* **1999.**274(44): 31655-31662.
73. Suzuki, M., H. Mimuro, et al. "Interaction of CagA with Crk plays an important role in Helicobacter pylori-induced loss of gastric epithelial cell adhesion." *J Exp Med.* **2005.**202(9): 1235-1247.
74. Viala, J., C. Chaput, et al. "Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island." *Nat Immunol.* **2004.**5(11): 1166-1174.
75. Boughan, P. K., R. H. Argent, et al. "Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during Helicobacter pylori infection." *J Biol Chem.* **2006.**281(17): 11637-11648.
76. Hotchin, N. A., T. L. Cover, et al. "Cell vacuolation induced by the VacA cytotoxin of Helicobacter pylori is regulated by the Rac1 GTPase." *J Biol Chem.* **2000.**275(19): 14009-14012.
77. Boncristiano, M., S. R. Paccani, et al. "The Helicobacter pylori vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms." *J Exp Med.* **2003.**198(12): 1887-1897.
78. Cover, T. L. and M. J. Blaser. "Purification and characterization of the vacuolating toxin from Helicobacter pylori." *J Biol Chem.* **1992.** 267(15): 10570-10575.

79. Peek, R. M., Jr., M. J. Blaser, et al. **1999.**"Helicobacter pylori strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle." *Cancer Res.***1992.** 59(24): 6124-6131.
80. Manente, L., A. Perna, et al. "The Helicobacter pylori's protein VacA has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells." *J Cell Physio.* **2008.**1214(3): 582-587.
81. Dossumbekova, A., C. Prinz, et al. "Helicobacter pylori outer membrane proteins and gastric inflammation." *Gut.* **2006.**55(9): 1360-1361; author reply 1361.
82. Boren, T., P. Falk, et al. "Attachment of Helicobacter pylori to human gastric epithelium mediated by blood group antigens." *Science.* **1993.** 262(5141): 1892-1895.
83. Ilver, D., A. Arnqvist, et al. "Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging." *Science.* **1998.** 279(5349): 373-377.
84. Gerhard, M., N. Lehn, et al. "Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999.**96(22): 12778-12783.
85. Yamaoka, Y., O. Ojo, et al. "Helicobacter pylori outer membrane proteins and gastroduodenal disease." *Gut.* **2006.**55(6): 775-781.
86. Mahdavi, J., B. Sonden, et al. "Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation." *Science.* **2002.**297(5581): 573-578.
87. Yamaoka, Y., D. H. Kwon, et al. "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.
88. Franco, A. T., E. Johnston, et al. "Regulation of gastric carcinogenesis by Helicobacter pylori virulence factors." *Cancer Res.* **2008.**68(2): 379-387.
89. Yamaoka, Y., T. Kudo, et al. "Role of interferon-stimulated responsive element-like element in interleukin-8 promoter in Helicobacter pylori infection." *Gastroenterology.* **2004.**126(4): 1030-1043.
90. Sugimoto, M., T. Ohno, et al. "Gastric mucosal interleukin-17 and -18 mRNA expression in Helicobacter pylori-induced Mongolian gerbils." *Cancer Sci.***2009.**100(11): 2152-2159.

91. Lu, H., P. I. Hsu, et al. "Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*." *Gastroenterology*. **2005**.128(4): 833-848.
92. Leying, H., S. Suerbaum, et al. "Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene." *Mol Microbio*. **1992**.16(19): 2863-2874.
93. Eaton, K. A., S. Suerbaum, et al. "Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes." *Infect Immun*. **1996**.64(7): 2445-2448.
94. Lee, S. K., A. Stack, et al. "*Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5." *Microbes Infect*. **2003**.5(15): 1345-1356.
95. Gewirtz, A. T., Y. Yu, et al. "*Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity." *J Infect Dis*. **2004**.189(10): 1914-1920.
96. Tee, W., J. R. Lambert, et al. "Cytotoxin production by *Helicobacter pylori* from patients with upper gastrointestinal tract diseases." *J Clin Microbio*. **1995**. 133(5): 1203-1205.
97. Noach, L. A., N. B. Bosma, et al. "Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection." *Scand J Gastroentero*. **1994**.129(5): 425-429.
98. El-Omar, E. M., M. Carrington, et al. "Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer." *Nature*. **2000**.404(6776): 398-402.
99. Takashima, M., T. Furuta, et al. "Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils." *Gut*. **2001**.48(6): 765-773.
100. Hwang, I. R., T. Kodama, et al. "Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1beta production in *Helicobacter pylori* infection." *Gastroenterology*. **2002**. 123(6): 1793-1803.
101. Oguma, K., H. Oshima, et al. "Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells." *EMBO J*.**2008**.27(12): 1671-1681.
102. Gupta, R. A. and R. N. Dubois. "Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2." *Nat Rev Cancer*. **2001**.1(1): 11-21.
103. Williams, C. S., W. Smalley, et al. "Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention." *J Clin Invest*. **1997**.100(6): 1325-1329.

104. Juttner, S., T. Cramer, et al. "Helicobacter pylori stimulates host cyclooxygenase-2 gene transcription: critical importance of MEK/ERK-dependent activation of USF1/-2 and CREB transcription factors." *Cell Microbio.* **2003**.15(11): 821-834.
105. Ogiwara, H., M. Sugimoto, et al. "Role of deletion located between the intermediate and middle regions of the Helicobacter pylori vacA gene in cases of gastroduodenal diseases." *J Clin Microbio.* **2009**.147(11): 3493-3500.
106. Schubert, M. L. and D. A. Peura. "Control of gastric acid secretion in health and disease." *Gastroenterology.* **2008**.134(7): 1842-1860.
107. Wang, F., P. Xia, et al. "Helicobacter pylori VacA disrupts apical membrane-cytoskeletal interactions in gastric parietal cells." *J Biol Chem.* **2008**.283(39): 26714-26725.
108. Gamboa-Dominguez, A., T. Ubbelohde, et al. "Salt and stress synergize H. pylori-induced gastric lesions, cell proliferation, and p21 expression in Mongolian gerbils." *Dig Dis Sci.* **2007**. 52(6): 1517-1526.
109. Gancz, H., K. R. Jones, et al. "Sodium chloride affects Helicobacter pylori growth and gene expression." *J Bacterio.* **2008**.1190(11): 4100-4105.
110. Fléjou JF. 1996. Diagnostic anatomopathologique de l'infection à *Helicobacter pylori*. In : (ed. F Mégraud, H Lamouliatte), Elsevier, Paris : 235-247.
111. Cutler A. F., Harstad S, Ma C. K., Blaser M. J., Perez-Perez G. I., Schubert I. T. Accuracy of invasive and non invasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*; **1995**.109, 136-141.
112. Burucoa, C., Garnier, M., Silvain, C., and Fauchere , J.L. Quadruplex real-time PCR assay using allele-specific scorpion primers for detection of mutations conferring clarithromycin resistance to *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* **2008**.46: 2320-6.
113. Delchier J.C, Megraud F. Méthodes de diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori*. « Point de vue du biologiste ». *Lettre de l'infectiologue* ; Tome XI. **1996**.(suppl. au n°5), 17-22.
114. Fauchère J.L. Présent et avenir de la sérologie anti-*Helicobacter pylori*. *Lettre del'infectiologue* ; **1996**.11 (suppl. au n°5), 4-12.

115. Kosunen T.U., Seppälä K., Sarna S., Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancett*. **1992**.339, 893-895.
116. Logan R. P. H., Walker M. M., Misiewicz J. I., Gunimett P. A., Baron J. H. Changes in the intra-gastric distribution of *Helicobacter pylori* during treatment with omeprazole. *Gut* . **1995**.36; 12-16.
117. Megraud, F., S. Hazell, and Y. Glupczynski, *Antibiotic Susceptibility and Resistance*.*Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001. Chapter 42.
118. Megraud, F. and P. Lehours, *Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing*.*Clin Microbiol Rev*, **2007**. 20(2): p. 280-322.
119. Kalach, N., et al., *Helicobacter pylori primary resistant strains over 11 years in French children*.*Diagn Microbiol Infect Dis*, **2007**. 59(2): p. 217-22.
120. De Francesco, V., et al., *Worldwide H. pylori antibiotic resistance: a systematic review*.*J Gastrointestin Liver Dis*, **2010**.19(4): p. 409-14.
121. Oleastro, M., et al., *Primary antibiotic resistance of Helicobacter pylori strains isolated from Portuguese children: a prospective multicentre study over a 10 year period*.*J Antimicrob Chemother*, **2011**.Oct;66(10):2308-11.
122. Courillon-Mallet A.[*Helicobacter pylori and gastric cancer: eradication to prevent cancer?*].*Gastroenterol Clin Biol*. **2009** Apr;33(4):301-5.
123. Raymond, J., et al., [*Prevalence of resistance to antimicrobial agents of H. pylori*]. *Arch Pediatr*, **2010**. 17(6): p. 816-7.
124. Lamarque D , Burucoa, C., Courillon-Mallet ,A. De Korwin JD, Delchier J.C, Fauchere Kalach,J.L,Labigne A , LehoursP., Megraud, F.N, Raymond, J.Révision des recommandations sur la prise en charge de l'infection par *Helicobacter pylori*. *Hepato Gastro* .**2012**. 19 :475-502.
125. Versalovic, J., et al., *Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, **1996**. 40(2): p. 477-

126. Burucoa, C., Landron, C., Garnier, M., and Fauchere, J.L. T2182C mutation is not associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**. 49: 868.
127. Giorgio F, Principi M, De Francesco V, Zullo A, Losurdo G, Di Leo A, Ierardi E. Primary clarithromycin resistance to *Helicobacter pylori*: Is this the main reason for triple therapy failure?. *World J Gastrointest Pathophysiol.* **2013** Aug 15;4(3):43-6.
128. Cambau, E., Allerheiligen, V., Coulon, C., Corbel, C., Lascols, C., Deforges, L., Soussy, C.J., Delchier, J.C., and Megraud, F. Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* **2009**. 47: 3600-7.
129. Ben Mansour, K., Burucoa, C., Zribi, M., Masmoudi, A., Karoui, S., Kallel, L., Chouaib, S., Matri, S., Fekih, M., Zarrouk, S., Labbene, M., Boubaker, J., Cheikh, I., Hriz, M.B., Siala, N., Ayadi, A., Filali, A., Mami, N.B., Najjar, T., Maherzi, A., Sfar, M.T., and Fendri, C. Primary resistance to clarithromycin, metronidazole and amoxicillin of *Helicobacter pylori* isolated from Tunisian patients with peptic ulcers and gastritis: a prospective multicentre study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* **2010**. 9:22. doi: 10.1186/1476-0711-9-22.
130. Tankovic J, Lascols C, Sculo Q, Petit JC, Soussy CJ. Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low- and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003** Dec;47(12):3942-4.
131. Giannini EG, Bilardi C, Dulbecco P, Mamone M, Santi ML, Testa R, Mansi C, Savarino V. A study of 4- and 7-day triple therapy with rabeprazole, high-dose levofloxacin and tinidazole rescue treatment for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther.* **2006** Jan 15;23(2):281-7.
132. Megraud, F. *Helicobacter pylori* in developing countries. *World Gastroenterology Organisation Global Guideline. J Gastrointest Liver Dis* **2011**;20:299-304.
133. Megraud, F., et al., *Antimicrobial susceptibility testing of Helicobacter pylori in a large multicenter trial: the MACH 2 study.* *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**. 43(11): p. 2747-52.

134. O'Connor, A., et al., *Treatment of Helicobacter pylori infection 2010*. *Helicobacter*, **2010**. 15 Suppl 1: p. 46-52.
135. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of Helicobacter pylori infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* **2017** ; 66 : 6-30..
136. Dominique Lamarque, Christophe Burucoa, Anne Courillon-Mallet, Jean-Dominique de Korwin, Jean-Charles Delchier, Fred eric Heluwaer, Philippe, Lehours, Francis Megraud , Driffa Moussata, Aurelien Amiot, Sebastien Breurec, Josette Raymond.Recommendations for treatment of Helicobacter pylori infection in adults .HEPATO-GASTRO et Oncologie digestive 157 vol. 24 n8 2, f evrier **2017** doi: 10.1684/hpg..1418
137. Goodwin, C.S., *Helicobacter pylori gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer: clinical and molecular aspects*. *Clin Infect Dis*, **1997**. 25(5): p. 1017-9.
138. Malfertheiner, P., et al., *Helicobacter pylori eradication with a capsule containing bismuth subcitrate potassium, metronidazole, and tetracycline given with omeprazole versus clarithromycin-based triple therapy: a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial*. *Lancet*, **2011**. 377(9769): p. 905-13.
139. afssaps, *Mise au point, prise en charge thérapeutique de l'éradication de Helicobacter pylori chez l'adulte et l'enfant*.**2005**.
140. Jafri, N.S., C.A. Hornung, and C.W. Howden, *Meta-analysis: sequential therapy appears superior to standard therapy for Helicobacter pylori infection in patients naive to treatment*. *Ann Intern Med*, **2008**. 148(12): p. 923-31.
141. Zou, J., J. Dong, and X. Yu, *Meta-analysis: Lactobacillus containing quadruple therapy versus standard triple first-line therapy for Helicobacter pylori eradication*.*Helicobacter*, **2009**. 14(5): p. 97-107
142. Attia KA1, N'dri Yoman T, Diomandé MI, Mahassadi A, Sogodogo I, Bathaix YF, Kissi H, Sermé K, Sawadogo A, Kassi LM. [Clinical, endoscopic and histologic aspects of chronic Helicobacter pylori gastritis in Côte d'Ivoire: study of 102 patients]. *Bull Soc Pathol Exot*. **2001** Mar;94(1):5-7.

143. Marie M.A. Seroprevalence of *H. pylori* infection in a large series of patients in an urban area of Saudi Arabia. *Korean J Gastroenterol.* **2008**; 52: 226-229.
144. Djennane-Hadibi, F., Bachtarzi, M., Layaida, K., Ali Arous, N., Nakmouche, M., Saadi, B., Tazir, M., Ramdani-Bouguessa, N., and Burucoa, C. High-Level Primary Clarithromycin Resistance of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria: A Prospective Multicenter Molecular Study. *Microb Drug Resist.* **2016**. 22:223-6.
145. Elmanama A, Mokhallalati M, Abu-Mugesieb R. Risk factors associated with *Helicobacter pylori* infection in Gaza, Palestine. *The Islamic University Journal*, **2008**, 16(2):97–110
146. Haruma K. Trend toward a reduced prevalence of *Helicobacter pylori* infection, chronic gastritis, and gastric cancer in Japan. *Gastroenterology Clinics of North America*, **2000**, 29(3):31–623.
147. Raymond, J., Lamarque, D., Kalach, N., Chaussade, S., and Burucoa, C. High level of antimicrobial resistance in French *Helicobacter pylori* isolates. *Helicobacter*. **2010**.15: 21-7.
148. Seck A, Burucoa C, Dia D, Mbengue M, Onambele M, Raymond J, Breurec S. Primary antibiotic resistance and associated mechanisms in *Helicobacter pylori* isolates from Senegalese patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* **2013**; 12: 3. doi: 10.1186/1476-0711-12-3.
149. Ontsira Ngoyi, E.N., Atipo Ibara, B.I., Moyen, R., Ahoui Apendi, P.C., Ibara, J.R., Obengui, O., Ossibi Ibara, R.B., Nguimbi, E., Niama, R.F., Ouamba, J.M., Yala, F., Abena, A.A., Vadivelu, J., Goh, K.L., Menard, A., Benejat, L., Sifre, E., Lehours, P., and Megraud, F. Molecular Detection of *Helicobacter pylori* and its Antimicrobial Resistance in Brazzaville, Congo. *Helicobacter*. **2015**.20:316-20.
150. Tanih, N.F., and Ndip, R.N. Molecular detection of antibiotic resistance in SouthAfrican isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Res Pract.* **2013**: 259457.
151. Cuadrado-Lavin, A., Salcines-Caviedes, J.R., Carrascosa, M.F., Mellado, P., Monteagudo, I, Llorca, J., Cobo, M., Campos, M.R., Ayestaran, B., Fernandez-Pousa, A., and Gonzalez-Colominas, E. Antimicrobial susceptibility of

- Helicobacter pylori* to six antibiotics currently used in Spain. J Antimicrobial Chem. **2012**. 67: 170-3.
- 152.** Marshall, B.J., et al., *Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of Campylobacter pylori*. Lancet, **1988**. 2(8626-8627): p. 1437-42.
- 153.** Romano, M., Marmo, R., Cuomo, A., De Simone, T., Mucherino, C., Iovene, M.R., Montella, F., Tufano, M.A., Del Vecchio Blanco, C., and Nardone, G. Pretreatment antimicrobial-susceptibility testing is cost saving in the eradication of *H. pylori*. Clin Gastroenterol Hepatol. **2003**. 4: 273-8.
- 154.** Koletzko S, Richy F, Bontems P, Crone J, Kalach N, Monteiro ML, Gottrand F, Celinska-Cedro D, Roma-Giannikou E, Orderda G, Olacek S, Urruzuno P, Martinez-Gomez MJ, Casswall T, Ashorn M, Bodanszky H, Mégraud F: Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. Gut **2006**, 55:1711-1716.
- 155.** Wang, G., et al., *Spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother, **2001**. 45(3): p. 727-33.
- 156.** Ducournau, A., Bénéjat, L., Sifré, E., Bessède, E., Lehours, P., and Mégraud, F. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in 2014 in France detected by phenotypic and genotypic methods. Clin Microbiol Infect. **2016**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.06.003>.
- 157.** Marzio, L., et al., *Helicobacter pylori* isolates from proximal and distal stomach of patients never treated and already treated show genetic variability and discordant antibiotic resistance. Eur J Gastroenterol Hepatol, **2011**. 23(6): p. 467-72.
- 158.** Lee, H. J., Kim, J.I., Cheung, D.Y., Kim, T.H., Jun, E.J., Oh, J.H., Chung, W.C., Kim, B.W., Kim, S.S., Park, S.H., and Kim, J.K. Eradication of *Helicobacter pylori* according to 23S ribosomal RNA point mutations associated with clarithromycin resistance. J Infect Dis. **2013**. 208: 1123-30.
- 159.** Ben Mansour, K., Fendri, C., Battikh, H., Garnier, M., Zribi, M., Jlizi, A., and Burucoa, C. Multiple and mixed *Helicobacter pylori* infections: Comparison of two epidemiological situations in Tunisia and France. Infect Genet Evol. **2016**. 37:43-8.

160. Silva D.G., Tinoco E.M., Rocha G.A., Rocha A.M., Guerra J.B., Saraiva I.E. Helicobacter pylori transiently in the mouth may participate in the transmission of infection. MemInst Oswaldo Cruz2010;105:657-760.
161. Raymond J , Bergeret M, Kalach N, Infection à Helicobacter pylori chez l'enfant. Presse Médicale **2008** : 37 ; 513-518
162. Salem OE, Youssri AH, Mohammad ON. The prevalence of H. pylori antibodies in asymptomatic young egyptian persons. J Egypt Public Health Assoc **1993**; 68: 333-352 [PMID: 17265652].
163. Eshraghian A. Epidemiology of Helicobacter pylori infection among the healthy population in Iran and countries of the Eastern Mediterranean Region: a systematic review of prevalence and risk factors. World J Gastroenterol. **2014** Dec 14;20(46):17618-25.
164. Bani-Hani KE, Shatnawi NJ, El Qaderi S, Khader YS, BaniHani BK. Prevalence and risk factors of Helicobacter pylori infection in healthy schoolchildren. Chin J Dig Dis **2006**; 7: 55-60.
165. Ghasemi-Kebria F, Ghaemi E, Azadfar S, Roshandel G. Epidemiology of Helicobacter pylori infection among Iranian children. Arab J Gastroenterol. **2013** Dec;14(4):169-72.
166. E. Yilmaz, Y. Dogan, M.K. Gurgoze, et al. Seroprevalence of Helicobacter pylori infection among children and their parents in eastern Turkey J Paediatr Child Health, **2002**,38 (2) pp. 183–186.
167. Naous A, Al-Tannir M, Naja Z, Ziade F, El-Rajab M. Fecoprevalence and determinants of Helicobacter pylori infection among asymptomatic children in Lebanon. J Med Liban **2007**; 55: 138-144.
168. Bode G, Brenner H, Adler G, Rothenbacher D.Recurrent abdominal pain in children Evidence from a population-based study that social and familial factors play a major role but not Helicobacter pylori infection.J PsychosomRes. **2003** May;54(5):417-21.
169. Maria P. Dore, Hoda M. Malaty, David Y. Graham, Giuseppe Fanciulli, Giuseppe Delitala, and Giuseppe Realdi. RiskFactors Associated with Helicobacter pyloriInfection amongChildren in a DefinedGeographic Area. Clin Infect Dis. **2002** Aug 1;35(3):240-5.

170. Wiktor Łaszewicz a, Franciszek Iwan' czak b, Barbara Iwan' czak b, Task Force of the Polish Society of Gastroenterology Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in Polish children and adults depending on socioeconomic status and living conditions *Advances in Medical Sciences* . **2014** .59: 147–150.
171. A. Maherzi ,A. Bouaziz Abed, C. Fendri, F. Oubich, C. Koubaa , J.L. Fauchere, S. Bousnina . Infection à *Helicobacter pylori* : étude prospective chez les enfants tunisiens asymptomatiques *Archives de pédiatrie*. **2003**. 10 :204–207.
172. Bouktir S, Aouididi F, et al. Les gastrites chroniques chez l'enfant.Tunisie médicale **2007** ;Vol 85,no 9 :756-760
173. Erreimi N; Mouane N; Hajarabi S; Alhamani Z; Bouchta F. Gastrite à *Helicobacter pylori* chez l'enfant : Expérience de l'hôpital d'enfants de Rabat à propos de 230 biopsies gastriques *Annales de pédiatrie*.**1999**, vol. 46, no7, pp. 445-451.
174. Kalach, P.H. Benhamou1, M. BergeretAcquisition d'une résistance secondaire après échec d'un premier traitement lors de l'infection à *Helicobacter pylori*.*Archive de pédiatrie* **2002** ;9 :130-5
175. Abdallah T.M., Mohammed H.B., Mohammed M.H., Ali A.A.A. Seroprevalence and factors associated with *Helicobacter pylori* infection in Eastern Sudan. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* **2014**, 4(2): 115-119.
176. Raymond J, Bargaoui K, Kalach N, Bergeret M, Dupont C. Isolation of *Helicobacter pylori* in a six-day-old newborn. *Eur J ClinMicrobiol Infect Dis* **1996**;14:727–8.
177. Rothenbacher D, Bode G, Berg G, Knayer U, Gonser T, Adler G et al. *Helicobacter pylori* among preschool children and their parents: evidence of parent-child transmission. *J Infect Dis* **1999**;179:398-402.
178. Miyaji H, Azuma T, Ito S, Abe Y, Gejyo F, Hashimoto N et al. *Helicobacter pylori* infection occurs via close contact with infected individuals in early childhood. *J Gastroenterol Hepatol* **2000**;15:267-72.
179. Malaty HM, Kumagai T, Tanaka E, Ota H, Kiyosawa K, Graham DY et al. Evidence from a nine-year birth cohort study in Japan of transmission pathways of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Microbiol* **2000**;38: 1971-3.
180. Bode G, Brenner H, Adler G, Rothenbacher D.Recurrent abdominal pain in children Evidence from a population-based study that social and familial factors

- play a major role but not Helicobacter pylori infection. *J Psychosom Res.* **2003** May;54(5):417-21.
- 181.** Stordal K, Nygaard EA, Bentsen B. Organic abnormalities in recurrent abdominal pain in children. *Acta Paediatr* **2001**;90:638-42.
- 182.** Maherzi A, Fendri C, Ben Jilani S, Bousnina S. [Symptomatic Helicobacter pylori infection: prospective study of epidemiological, diagnostic and therapeutic aspects in children in Tunisia]. *Arch Pediatr.* **1996** Apr;3(4):329-34. French
- 183.** Stordal K, Nygaard EA, Bentsen B. Organic abnormalities in recurrent abdominal pain in children. *Acta Paediatr* **2001**;90:638-42.
- 184.** Fujimoto Y., Furusyo N., Toyoda K., Takeoka H., Sawayama Y., Hayashi J. Intrafamilial transmission of Helicobacter pylori among the population of endemic areas in Japan. *Helicobacter* **2007**, 12: 170–176.
- 185.** Couturier M.R. The Evolving Challenges of Helicobacter pylori Disease, Diagnostics, and Treatment, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter* **2013**; 35(3):19-24.
- 186.** Buruoa C, Delchier JC, Courillon-Mallet A, de Korwin JD, Mégraud F, Zerbib F, Raymond J, Fauchère JL. Comparative evaluation of 29 commercial Helicobacter pylori serological kits. *Helicobacter.* **2013** Jun;18(3):169-79.
- 187.** H.Inouss, S.Ahid, A.Belaiche, Y.Cherrah. Evolution de la consommation des antibiotiques au Maroc (2003-2012). *Revue d'épidémiologie et de santé publique.* **2015** May; 63(2):S7

Épidémiologie et résistance d'*Helicobacter pylori* aux antibiotiques dans une population marocaine: étude phénotypique et génotypique

Abstract

Author name: BOUIHAT Najat

Title: Epidemiology and resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics in a Moroccan population: phenotypic and genotypic study

Objective: Knowledge of local antibiotic resistance is crucial to adaption of the choice of effective treatment for *Helicobacter pylori* infection. The aim of this study was evaluate the prevalence of infection in the adult and the child and to determine the primary resistance of *H. pylori* to the main antibiotics used in the treatment of *H. pylori* infection.

Material and methods: We conducted a 5-year prospective study (2011-2016), which included 367 adulterated patients referred for digestive endoscopy and never previously treated for *H. pylori* infection. Three gastric biopsies were collected: one for histology, one for culture and one for the molecular detection of *H. pylori* and the mutations in 23S rRNA genes that confer resistance to clarithromycin with real-time PCR using of the scorpion primers. Antimicrobial susceptibility testing was performed on the isolated strain by Etest and disk diffusion method. The study also included 270 children aged 2 to 17 years divided into two groups. The first group included 164 asymptomatic children; the second group included 106 children with digestive symptoms and indication for gastroduodenal endoscopy with biopsy for detecting *H. pylori* infection with Anatomopathological method. All of these children were subjected to total blood sample for serological study using the enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) *H. pylori* IgG". Parental consent was obtained in advance for all children included in this study.

Results: 255 patients adults were infected with *H. pylori* (69.5%). The prevalence of primary resistances of *H. pylori* to clarithromycin was 28.6%, 40.1% to metronidazole, 0% to amoxicillin, tetracycline and rifamycin, and 10.7% to levofloxacin. Only 4 isolates (2%) were resistant to both clarithromycin and metronidazole. The A2142G mutation was strongly found (61.6%) versus (35.6%) for the A2143G mutation and (8.2%) for the A2142C mutation. The presence of antibodies of IgG anti-*H. Pylori* was detected in 144 of the 270 children studied (53%). In asymptomatic children, this rate was 41.5% vs. 72% in symptomatic children. *H. pylori* seroprevalence increased steadily with age overall, for the 2 groups studied, Parents, habitat and presence of family history were the most important risk factors in our study. The symptomatology most correlated with the presence of *H. pylori* was abdominal pain at (80%).

Conclusion: The prevalence of *H. pylori* infection in the population remains high in both children and adults. The high level of resistance to the main active molecule on *H. pylori* (clarithromycin) implies a systematic search for this resistance before any initiated antibiotic therapy. Serology could be an alternative for detecting gastric infections of *H. Pylori*, especially in cases where invasive tests are not indicated to ensure early therapeutic management of children and reduce the risk of illness, Peptic ulcer and subsequently gastric adenocarcinoma.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Prevalence, resistance, antibiotic, serodiagnosis

Résumé :

Nom et Prénom : BOUIHAT Najat

Titre : Épidémiologie et résistance d'*Helicobacter pylori* aux antibiotiques dans une population marocaine: étude phénotypique et génotypique

Objectif : La connaissance de la résistance aux antibiotiques locale est cruciale pour l'adaptation du choix d'un traitement efficace de l'infection à *Helicobacter pylori*.

Le but de cette étude était d'évaluer, la prévalence de l'infection chez l'adulte et l'enfant et déterminer la résistance primaire de *H. pylori* aux principaux antibiotiques utilisés dans le traitement de l'infection à *H. pylori*.

Matériels et méthodes: Nous avons mené une étude prospective de 5 ans (2011-2016), qui a compris 367 patients adultes adressés pour endoscopie digestive et non traités auparavant pour l'infection à *H. pylori*. Trois biopsies gastriques antrales ont été recueillies: une pour l'histologie, une pour la culture et la troisième pour la détection moléculaire de *H. pylori* et les mutations dans les gènes 23S qui confèrent la résistance à la clarithromycine avec une PCR en temps réel utilisant des amorces de scorpion. Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés sur la souche isolée par Etest et la méthode de diffusion de disque en milieux gélosés. L'étude a intégré aussi 270 enfants âgés de 2 ans à 17 ans repartis en deux groupes. Le premier groupe a inclus 164 enfants consultant pour autres symptômes non digestives (asymptomatiques), le deuxième groupe a inclus 106 enfants présentant une symptomatologie digestive et ayant une indication pour une endoscopie gastroduodénale avec biopsie à la recherche de l'infection à *H. pylori* par méthode anatomopathologique. Tous ces enfants ont été soumis à un prélèvement de sang total (3 à 4 ml) en vue d'une étude sérologique par la méthode immuno-enzymatique « Elisa *H. pylori* IgG » portant sur l'infection à *H. pylori*. Le consentement des parents était obtenu au préalable pour tous les enfants inclus dans cette étude.

Résultats: chez l'adulte, 255 patients ont été infectés par *H. pylori* (69.5%). La prévalence des résistances primaires de *H. pylori* à la clarithromycine était de 28,6%, 40,1% au métronidazole, 0% à l'amoxicilline, la tétracycline et la rifamycine, et 10,7% à la lévofloxacine. Seuls 4 isolats (2%) étaient résistants à la fois la clarithromycine et le métronidazole. La mutation A2142G a été fortement retrouvée (61,6%) contre (35,6%) pour la mutation A2143G et (8,2%) pour la mutation A2142C. Chez l'enfant, la présence d'anticorps de type IgG anti-*H. pylori* a été mise en évidence chez 144 des 270 enfants étudiés, soit 53% des cas. Chez les enfants asymptomatiques, ce taux a été de 41,5% vs 72% chez les enfants symptomatiques. La séroprévalence à *H. pylori* a augmenté régulièrement avec l'âge d'une manière globale, pour les 2 groupes étudiés, le revenu des parents, l'habitat et la présence d'antécédents familiaux ont été les facteurs de risque les plus importants dans notre étude. La symptomatologie la plus corrélée avec la présence à *H. pylori* était les douleurs abdominales à (80%).

Conclusions: La prévalence de l'infection à *H. pylori* chez la population étudiée reste élevée aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte. Le niveau élevé de la résistance à la principale molécule active sur *H. pylori* (clarithromycine) implique la recherche systématique de cette résistance avant toute instauration d'une antibiothérapie. La sérologie pourrait être une alternative pour détecter les infections gastriques à *H. Pylori* surtout dans les cas où les tests invasifs ne sont pas indiqués à fin d'assurer la prise en charge thérapeutique précoce des enfants et diminuer le risque de maladie associées principalement l'ulcère gastroduodénal et ultérieurement l'adénocarcinome gastrique

Mots clefs: *Helicobacter pylori*, prévalence, résistance, antibiotique, sérodiagnostic