

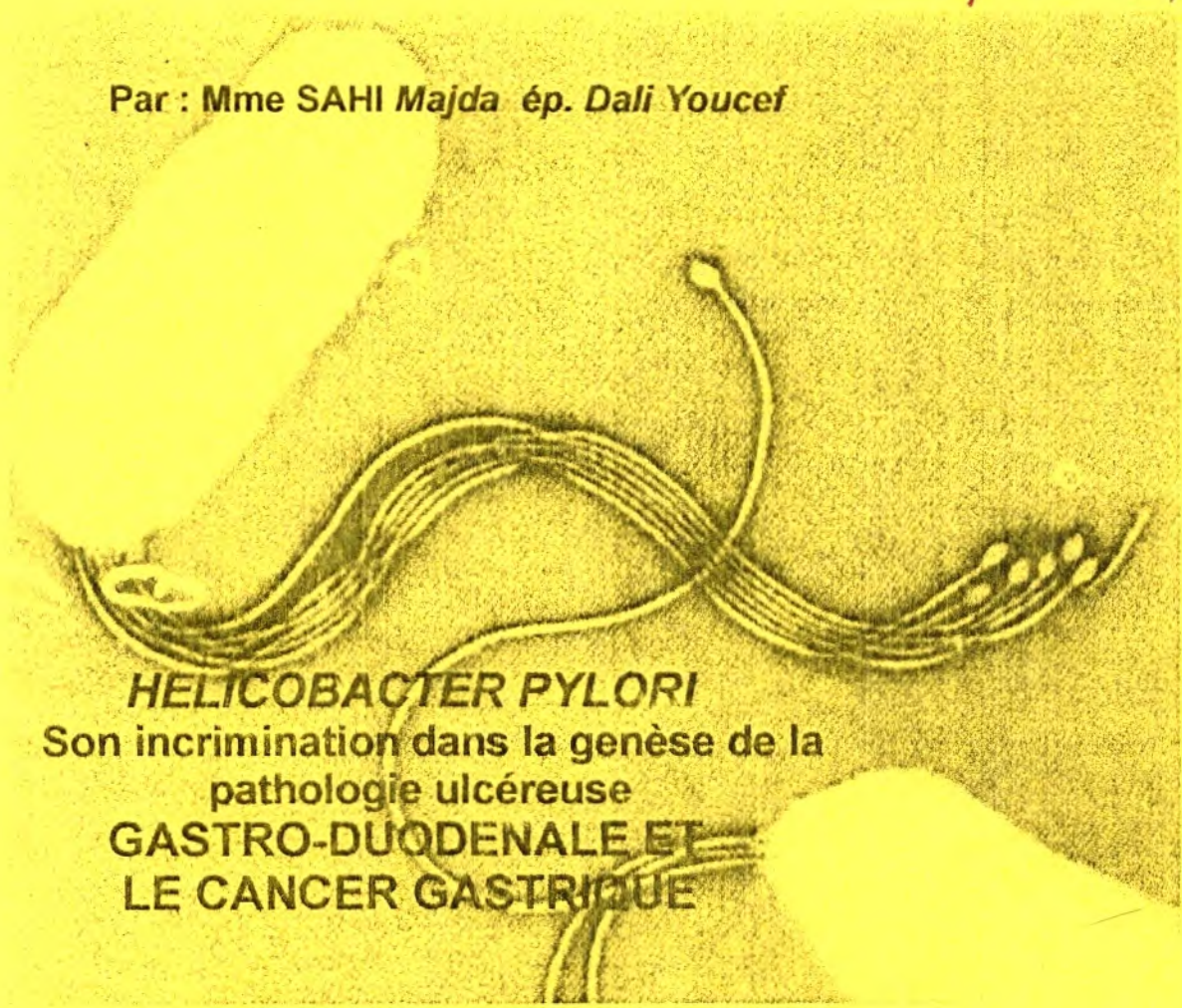
UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID  
-TLEMCEN-  
INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE

Notes de N°: 195  
2007 *ou 17*

THESE  
pour l'obtention du diplôme de magister  
en Biologie Moléculaire et Cellulaire  
Option : Microbiologie

*M. Sahi*  
*M 22/02*

Par : Mme SAHI Majda ép. Dali Youcef



**HELICOBACTER PYLORI**  
Son incrimination dans la genèse de la  
pathologie ulcéreuse  
**GASTRO-DUODENALE ET**  
**LE CANCER GASTRIQUE**

**JURY:**

Mr. M. BENYOUCEF  
Mr. B. BENABADJI  
Mr. N. KARAM  
Mr. D. ABDELWAHID  
Mr. N. NAIM

Président  
Promoteur  
Co-promoteur  
Examineur  
Examineur

## Remerciements

Avant de présenter ce travail, je tiens à remercier le Docteur Benabadji Bakir, docteur en pharmacie d'avoir accepté d'être mon promoteur.

Qu'il me soit permis de remercier monsieur et madame Karam qui m'ont chaperonnés, qu'il me soit permis de remercier particulièrement le docteur Karam, Maître de conférences à l'institut de biologie d'Es-Senia (Oran) qui ma prodigué sans cesse ses encouragements, et ses conseils, sa grande bienveillance. Sa compréhension ma permis de surmonter les difficultés rencontrées. Puisse cet exposé exprimer l'expression de mon profond respect et toute ma reconnaissance.

J'exprime ma profonde gratitude au Docteur Benyoucef Docent AU CHU de Tlemcen qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Mes remerciements iront également au Docteur Naim M de L'Hôpital centrale de l'armée d'Alger, à monsieur Abdelwahed chargé de cours à l'institut des sciences de la nature de Tlemcen qui ont l'obligeance de juger ce travail.

Je ne pourrait oublier mes collaborateurs directs et tout particulièrement le professeur Bakri L. chef de service de gastro-entérologie de l'hôpital central de l'armée et à sa précieuse équipe, le docteur Naim et son équipe, le docteur Bekhti, le docteur Belkheroubi et au docteur Baba-Ahmed.

Mes vifs remerciements iront au docteur Pascal Vincent de l'hôpital Claude Huriez de Lille sans qui ce travail n'aurait jamais pu aboutir.

J'adresse une pensée particulière au docteur Mirali Lamia de l'université de Lyon, à madame Odile Capilliez du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Claude Huriez de Lille et à monsieur Sakti chargé de cours à l'institut de biologie d'Es-Senia.

Enfin qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde gratitude et ma reconnaissance à tous ceux qui m'ont apporté leur soutien et que je ne peux citer individuellement.

# SOMMAIRE

## INTRODUCTION

### PREMIERE PARTIE: INTRODUCTION

1.1. Historique.....	2
1.2. Présentation du germe.....	5
1.2.1. Caractères morphologiques.....	5
1.2.2. Exigences du germe.....	5
1.2.3. Caractères génétiques.....	5
1.2.4. Caractères biochimiques.....	7
1.3. Epidémiologie.....	7
1.3.1. Transmission orale-orale.....	9
1.3.2. Transmission fécale-orale.....	9
1.4. Fréquence et incidence de la maladie.....	9
1.5. Virulence et pathogénéicité.....	11
1.5.1. Facteurs de colonisation.....	11
1.5.2. Facteurs de persistance et de pathogénéicité.....	11
1.6. Pathologie humaine à <i>Helicobacter pylori</i> .....	14
1.6.1. Les ulcères.....	14
1.6.2. Les gastrites.....	14
1.6.3. Tumeurs malignes gastriques.....	14
1.6.4. Autres pathologies.....	15
1.7. Conséquence de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> .....	16
1.7.1. La muqueuse gastrique.....	16
1.7.2. La sécrétion acide.....	16
1.7.3. La sécrétion de gastrine.....	16
1.7.4. La sécrétion peptique.....	17
1.8. Méthodes de diagnostics.....	17
1.8.1. Méthode directe.....	17
1.8.2. Méthodes indirectes.....	20
1.8.2.1. Tests sérologiques.....	20
1.8.2.2. Test respiratoire à l'urée marquée (breath test).....	20
1.8.2.3. Dosage du liquide gastrique.....	20
1.9. Traitement et sensibilité aux antibiotiques.....	21
1.10. Réponse immunitaire et immunisation.....	22

1.11. Conclusion.....	24
-----------------------	----

## DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel biologique.....	25
2.1.1. Prélèvements.....	25
2.1.2. Biopsies.....	25
2.1.3. Souches bactériennes.....	25
2.2. Milieux et conditions de culture.....	26
2.2.1. Milieux de transport.....	26
2.2.2. Milieux de croissance.....	27
2.2.3. Milieu d'isolement.....	28
2.2.4. Milieu d'identification de <i>Helicobacter pylori</i> .....	28
2.2.5. Milieu de conservation des souches.....	29
2.2.6. Conditions de culture.....	29
2.3. Méthodes.....	30
2.3.1. Prélèvement.....	30
2.3.1.1. Test à l'urée.....	30
2.3.1.2. Frottis coloré.....	30
2.3.1.3. Culture et conservation des biopsies.....	30
2.3.2. Isolement et conservation des souches bactériennes.....	31
2.3.2.1. Isolement.....	31
2.3.2.2. Conservation.....	31
2.3.2.3. Utilisation des souches congelées.....	31
2.3.3. Caractérisation de <i>Helicobacter pylori</i> .....	32
2.3.3.1. Vérification de la pureté des souches.....	32
2.3.3.2. Caractéristiques biochimiques.....	32
2.3.4. Extraction de l'ADN chromosomique de <i>Helicobacter pylori</i> .....	33
2.3.4.1. A partir des biopsies gastriques.....	33
2.3.4.2. A partir des isolats.....	34
2.3.4.2.1. Méthode de Béji (1987).....	34
2.3.4.2.2. Méthode simplifiée (Clayton, 1993).....	34
2.3.4.3. PCR-RFLP.....	35
2.3.4.4. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.....	36

## TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Pathologies liées à <i>Helicobacter pylori</i> .....	37
3.1.1. Fréquence et incidence.....	37
3.1.2. Les pathologies gastroduodénales.....	38
3.1.2.1. Les gastrites.....	38
3.1.2.2. L'ulcère gastrique.....	39
3.1.2.3. L'ulcère duodéal.....	39
3.1.2.4. L'inflammation de la muqueuse bulbaire.....	39
3.1.3. Discussion.....	40
3.2. Mise en évidence de la présence de <i>Helicobacter pylori</i> .....	42
3.2.1. Frottis coloré.....	42
3.2.2. L'uréase test.....	44
3.2.3. La culture.....	46
3.2.4. PCR à partir de broyât des biopsies.....	47
3.2.5. Conclusion.....	49
3.3. Isolement et identification des bactéries.....	49
3.3.1. Identification des bactéries.....	49
3.3.2. Bactéries autres que <i>Helicobacter pylori</i> .....	55
3.4. Etude moléculaire sur quelques souches de <i>Helicobacter pylori</i> .....	57
3.4.1. Conclusion.....	62
<b>QUATRIEME PARTIE</b>	
Conclusion et perspectives.....	63
Références bibliographiques.....	65

# PREMIÈRE PARTIE

## INTRODUCTION

*Helicobacter pylori* est une bactérie Gram négatif microaérophile. Il a fallu attendre les travaux de l'Australien Barry Marshall dans les années quatre vingt pour qu'enfin le rôle central de *Helicobacter pylori* dans l'ulcère du duodénum et de l'estomac soit reconnu (Marshall, 1994).

Actuellement ce germe préoccupe les gastro-entérologues et les bactériologistes à travers divers pays. Il est prouvé que la plupart des pathologies gastroduodénales ont une étiologie microbienne (Lamouliatte *et al.*, 1992). S'il est admis que cette bactérie est responsable de bon nombre de pathologie ulcéreuse gastrique et duodénale (gastrite, ulcère et cancer), elle reste néanmoins méconnue dans notre pays, où la population est connue comme étant prédisposée aux ulcères.

Nous essaierons de montrer à travers ce travail les points suivants:

- 1- les particularités morphologiques et caractéristiques biochimiques de *Helicobacter pylori* ;
- 2- la corrélation qui existe entre *Helicobacter pylori* et des pathologies gastroduodénales;
- 3- le polymorphisme des gènes *HTRA* et *Ure B*;
- 4- le polymorphisme du chromosome total;
- 5- la comparaison des isolats entre eux et avec des isolats provenant d'autres régions.

## 1.1. Historique.

Les premières descriptions d'un micro-organisme ressemblant au genre *Campylobacter* aujourd'hui appelé *Helicobacter pylori* sont probablement celles réalisées au microscope optique à la fin du siècle dernier. *Helicobacter pylori* est l'espèce type d'un nouveau genre, ce micro-organisme est successivement dénommé *Campylobacter pyloridis* puis *Campylobacter pylori* (Megraud, 1994).

*Helicobacter pylori* peut être considéré comme le chef de file d'un nouveau groupe de bactéries jusqu'alors peu structuré et jugé marginal, regroupé dans la super-famille VI de bacilles Gram négatif. Il est différencié des autres groupes par la structure de son ARN ribosomal (Megraud, 1994).

Ce groupe individualisé en 1991 comprend 4 genres: *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Arcobacter* et *Wolinella* (Labigne, 1994a).

Le genre *Campylobacter* est connu depuis longtemps, mais sa propriété d'infecter la muqueuse intestinale ne l'est que depuis 1972. C'est de ce groupe que *Helicobacter pylori* s'est individualisé. Jusque en 1989, il était connu sous le nom de *Campylobacter pylori* (Fauchère, 1994).

Des micro-organismes similaires auraient été observés dans la muqueuse gastrique de certains animaux. En 1906 en ce qui concerne l'homme (Bigard et Colin, 1996).

Dès 1915, un lien possible entre une telle bactérie et l'ulcère duodéal a été suggéré, ainsi que la survenue de tumeurs malignes gastriques humaines.

Dès 1940, on signale le soulagement de douleurs de type ulcéreux par le bismuth (Marshall, 1994).

Une étude réalisée en 1950 chez l'homme souligne l'association entre l'activité uréasique et la pathologie ulcéreuse (Deltener cité par Sobhani, 1991).

En 1954 Palmer recherche des bactéries spiralées sur 1180 biopsies mais la négativité des résultats entraîne un arrêt de cette voie de recherche pendant 20 ans (Bigard et Colin, 1996).



Steer et Colin Jones (1975) découvrent chez l'homme une association entre l'ulcère gastrique et la présence à la surface de la muqueuse gastrique d'un micro-organisme visible au microscope optique et de coloration Gram négatif (Bigard et Colin, 1996).

Warren et Marshall (1981) scrutent les pièces histologiques de 87 patients atteints d'ulcères gastro-duodénaux ou de gastrites. Ils y avaient décelé une curieuse bactérie ressemblant fort à un *Campylobacter* et qui n'apparaissait pas chez les sujets sains (Marshall, 1994).

Marshall (1982) décide d'étudier au microscope optique une biopsie d'estomac et tente sa mise en culture. A l'issue du week-end de pâques de cette année (week-end de 72 heures), en inspectant les boîtes de Petri qu'il avait laissé trois jours dans l'incubateur il a la joie d'apercevoir des colonies blancs gris ayant poussé sur un des milieux de culture utilisé. En juin 1982 Marshall et Warren réussissent à établir chez 100 patients un lien entre la présence de *Helicobacter pylori* et celle d'un ulcère. Cette même année, Marshall place un disque de bismuth en bordure de la culture et constate que 24 heures après, les abords du disque sont vierges de toute colonie. Le bismuth a joué son rôle de purificateur mais ce dernier reste sans efficacité *in vivo*.

La réponse vient indirectement, un des patients ne montre aucune récurrence. Souffrant d'une infection de gencives, son état a nécessité la prise de métronidazole. Marshall en déduit la théorie suivante: "une fois le sujet infecté par la bactérie, celle-ci va se nicher au plus profond de la muqueuse gastrique, et il faut pour l'éradiquer un mélange médicamenteux plus puissant que le bismuth seul" (Marshall, 1994).

Marshall (1983), voit un des malades guérir grâce à son traitement mais ses travaux ne sont pas reconnus par la communauté scientifique. En 1984 Marshall boit une mixture contenant *Helicobacter pylori* et prouve que ce dernier cause la gastrite. La même année, Marshall repère une épidémie de gastrite survenue dans un hôpital au Texas, il convainc par lettre le docteur Peterson éminent gastro-entérologue,

d'analyser les biopsies de ses patients gastritiques et effectivement ce dernier trouve au sein de celles-ci *Helicobacter pylori* (Marshall, 1994).

Une enquête pratiquée en 1985 sur tout sujet dont l'ulcère à été soigné par des antibiotiques et du bismuth est entamée, elle va s'étaler sur deux ans. Cette enquête montre que 70% des sujets ayant pris le mélange antibiotique-bismuth sont débarrassés de la bactérie (Marshall, 1994).

En 1986 plus de 20 équipes ont déjà isolé *Helicobacter pylori* dans les biopsies d'estomacs de malades gastritiques (Marshall, 1994). D'autres études montrent ensuite qu'ajouter le bismuth et un antibiotique aux anti-ulcèreux traditionnels permet la rémission de l'ulcère dans 75% des cas (Marshall, 1994).

Puis deux travaux portant sur 135000 patients établissent l'existence d'un lien entre le germe et le cancer de l'estomac.

Graham (1992) publie les résultats d'une enquête de deux ans sur 109 sujets ulcéreux prouvant qu'un traitement par la ranitidine, le bismuth et un antibiotique guérit 95% des patients atteints d'ulcère gastrique et 74 % de malades atteints d'ulcères duodénaux (Graham, 1993).

Marshall n'aura mis qu'un peu plus de dix ans avant de voir son mérite reconnu. Cette découverte révolutionne l'approche de l'ulcère, et l'axiome classique «pas d'acide, pas d'ulcère» s'est complété par «pas de *Helicobacter pylori* pas d'ulcère» (Marshall, 1994).

L'année 1994 peut être considérée comme une étape importante dans l'histoire de *Helicobacter pylori*. Elle a vu la reconnaissance du concept: maladies gastroduodénales = maladies infectieuses, par des organismes officiels majeurs dans le domaine de la santé. Cette même année connaîtra les premières études de protection non seulement dans le domaine thérapeutique mais également prophylactique.

Les années qui suivront seront témoins de l'avènement d'un vaccin anti *Helicobacter pylori* empêchant les conséquences pathologiques et la contamination par ce germe. Le vaccin permettrait d'espérer la disparition de cette infection puisque le réservoir est exclusivement humain.

## **1.2. Présentation du germe.**

### **1.2.1. Caractères morphologiques.**

*Helicobacter pylori* se présente sous forme hélicoïdale spiralée ou en S (Sobhani, 1991). Ces bacilles mesurent 3.5 µm de longueur et 0.5 µm de largeur. Ils présentent à l'une de leurs extrémités 4 à 6 flagelles. Certains auteurs rapportent que *Helicobacter pylori* est flagellé à ses deux extrémités (Fléjou, 1989).

Le microscope électronique nous permet de distinguer un bulbe ou un disque, que l'on ne retrouve dans aucune autre espèce de *Campylobacter*. Le reste de la surface de *Helicobacter pylori* est lisse (Sobhani, 1991).

*Helicobacter pylori* est capable de se déplacer rapidement par des frétilllements et par des mouvements de rotation (Megraud et Matysiak, 1997).

### **1.2.2. Exigences du germe.**

*Helicobacter pylori* croît seulement en atmosphère réduite en oxygène (5%) et enrichie en oxyde de carbone (7%) (Sobhani, 1991). Ces conditions sont obtenues au laboratoire en utilisant des sachets gas-pack pour microaérophilie ou dans une étuve à CO<sub>2</sub> (Lamouliatte *et al.*, 1992). La température optimale pour la croissance de ces bactéries est de 37°C.

### **1.2.3. Caractères génétiques.**

La teneur en GC (%) de l'ADN de *Helicobacter pylori* isolé de biopsies gastriques a été déterminé par la méthode TM (thermal melting point). Le contenu en guanine cytosine est généralement située entre 34.1 % et 37.5 % (moyenne 35.2 %) (Beji *et al.*, 1987).

Pour séparer les bactéries au niveau du genre on utilise actuellement la comparaison des ARN ribosomiaux et l'individualisation de l'espèce peut se faire sur la base d'une hybridation ADN - ADN (Lamouliatte *et al.*, 1992).

Pour savoir si plusieurs isolats appartiennent à la même souche on confronte leurs empreintes génomiques. Les méthodes utilisées sont les suivantes :

- la digestion par *Hind* III et *Bst* EII donne un très grand nombre de fragments (peut être plusieurs centaines). Cette technique dont les résultats sont difficiles à interpréter permet la comparaison d'un nombre réduit d'isolats (Vincent, 1996).

Afin de simplifier l'interprétation des profils de restriction d'ADN total, on peut poursuivre l'électrophorèse par un marquage sélectif de certaines séquences. On procède à l'hybridation d'une sonde oligonucléotique (ADN codant pour les ARN ribosomiaux). Cette sonde marquée est ensuite visualisée. On obtient alors un nombre réduit de bandes (environ une dizaine). Cette méthode permet de confronter un grand nombre d'isolats. La différence de ribotype indique qu'il s'agit de souches différentes. Par contre, en cas d'identité il faut revenir au profil de restriction de l'ADN total pour confirmer (Vincent, 1996).

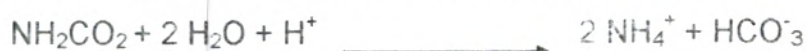
L'électrophorèse en champ pulsé permet de séparer des fragments d'ADN de grandes tailles ( $\geq 100$  kb). Le choix judicieux d'enzymes de restriction à rares sites de coupure permet de scinder l'ADN total en une dizaine de fragments dont l'interprétation est tout à fait comparable à celle du ribotypage (Vincent, 1996).

Ces approches moléculaires ont toutes révélées que chez *Helicobacter pylori* nous sommes en présence d'une situation unique dans le monde bactérien. Un très grand polymorphisme au niveau de la séquence linéaire de l'ADN semble correspondre à des mutations ponctuelles généralement silencieuses car sans aucune influence sur le déterminisme de l'acide aminé codé (Labigne, 1994a).

### 1.2.4. Caractères biochimiques.

L'équipement enzymatique de *Helicobacter pylori* est faible par rapport à d'autres micro-organismes. *Helicobacter pylori* ne dégrade pas les hydrates de carbone ni par fermentation ni par oxydation. *Helicobacter pylori* tire son énergie d'autres sources tels que les acides aminés et les acides organiques. Toutefois, de récents travaux ont montré que *Helicobacter pylori* serait capable d'utiliser le glucose par la voie des pentoses (Mergaud, 1994).

L'une des propriétés de *Helicobacter pylori* consiste en la production d'une uréase. L'activité uréasique a pour conséquence la production d'ammonium et de bicarbonate à partir de l'urée selon le schéma de réaction suivante :



En utilisant l'urée normalement présente dans l'estomac on admet que la bactérie tamponne son environnement proche et se protège de l'acidité gastrique (Mergaud, 1991).

*Helicobacter pylori* possède de plus des activités : catalase, phosphatase alcaline, cytochrome oxydase et super-oxyde dismutase. DNase,  $\gamma$ -glutamyl transférase, leucine, aminopeptidase et lipase estérase.

### 1.3. Epidémiologie.

*Helicobacter pylori* est trouvé spécifiquement chez l'homme au niveau du tube digestif (bouche, estomac et duodénum). D'autres membres du genre *Helicobacter* peuvent être les hôtes d'animaux tel que le chat (Weeb, 1997) et le chien (Tableau 1).

Compte tenu des connaissances actuelles on peut proposer deux méthodes de transmission.

**Tableau 1**  
**Les principales espèces de *Helicobacter* (Marshall, 1995).**

Nom	Hôte	Caractéristiques	Pathologies
<i>Helicobacter pylori</i>	Homme	Flagelles à l'extrémité distale	Cause les gastrites; parfois rencontré chez les animaux domestique ex: porc, chat
<i>Helicobacter mustelae</i>	Furet	Plusieurs flagelles placés au hasard	Gastrite et érosion communément développé chez le furet
<i>Helicobacter helmanii</i> (précédemment <i>Gastospirillum hominis</i> )	Chat, Chien Homme rarement	Apparence de tire bouchon de nombreux flagelles ne possèdent pas de filament axial	1% des gastrites humaines sont causées par cette bactérie transmise probablement par le chat et le chien
<i>Helicobacter felis</i>	Chat, Chien	Les mêmes que <i>Helicobacter helmanii</i> sauf qu'il possède un filament axial.	Isolée a partir du chat; utilisée pour les études de vaccination.

### 1.3.1. Transmission orale-orale.

*Helicobacter pylori* a été recherché dans la bouche. Ces travaux sont encore peu nombreux et leurs résultats ne sont pas tous concordants; il semble néanmoins que *Helicobacter pylori* puisse être présent dans la cavité buccale, dans la salive et la plaque dentaire. On a pu mettre en évidence ce l'ADN de *Helicobacter pylori* par PCR chez 75% de patients *Helicobacter pylori* positifs. Ces résultats indiquent donc que la cavité buccale est peut être une source d'infection et de transmission (Lic et al ., 1995).

### 1.3.2. Transmission fécale-orale.

*Helicobacter pylori* a été isolé à partir de selles d'enfants africains contaminés et plusieurs auteurs utilisant les techniques de biologie moléculaire ont mis en évidence la présence d'ADN de *Helicobacter pylori* dans les selles (Delchier, 1994). Une étude menée à Lima a montré que les enfants buvant de l'eau des réseaux de distribution avaient des taux d'infection significativement plus élevé que les autres (Newell et al, 1989), sûrement due aux communications de ces réseaux avec les eaux usées. L'eau semble être un important vecteur d'infection.

## 1.4. Fréquences et incidences de la maladie.

En Occident *Helicobacter pylori* affecte 20% des individus au dessous de 40 ans et 50% au dessus de 60 ans. La présence de *Helicobacter pylori* est rare chez les enfants et sa prévalence augmente avec l'âge (Figure 1) (Newell, 1989).

Cependant dans les pays sous développés, l'infection à *Helicobacter pylori* atteint 10% des enfants entre 2 et 8 ans (Marshall, 1995) qui seraient ensuite porteurs toute leur vie (Figure 2).

Le risque de contamination est le même pour les deux sexes (Tsai, 1995).

Les études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence deux données importantes: la prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* augmente avec l'âge et diminue quand le statut socio-économique augmente ( Lamouliatte et al., 1992).

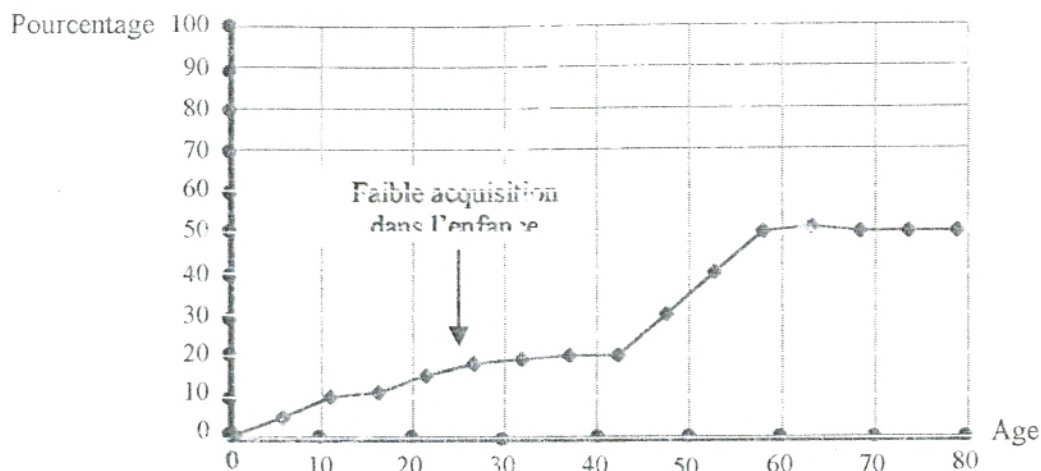


Figure 1 : Prévalance de l'infection à *Helicobacter pylori* en Occident.

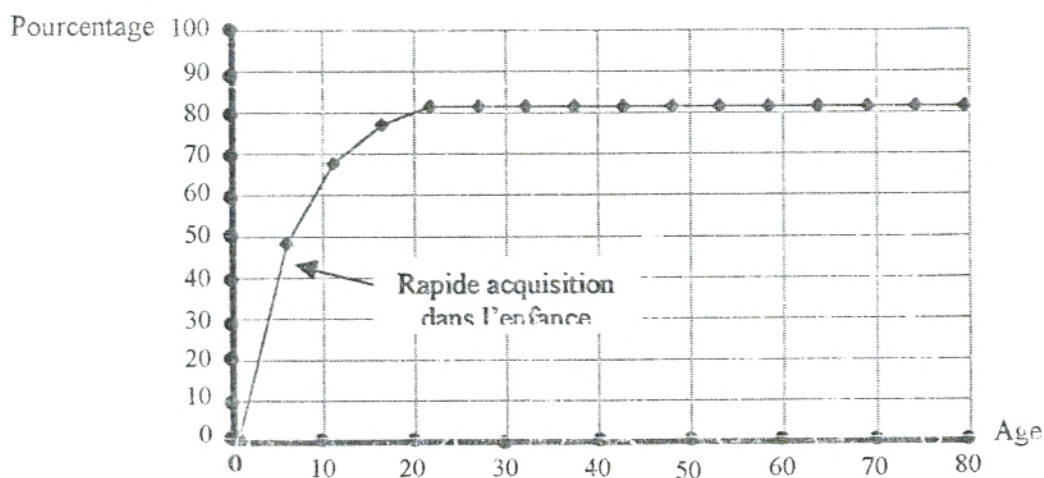


Figure 2 : Prévalance de l'infection à *Helicobacter pylori* dans les pays sous développés.



Pour des raisons d'hygiène et de promiscuité, on peut expliquer que les classes socio-économiques les plus nanties soient moins infectées. Dans les pays en développement, en général très pauvres, la prévalence peut atteindre 80 - 90% de la population (Marshall, 1995).

## **1.5. Virulence et pathogénécité.**

### **1.5.1. Facteurs de colonisation.**

Trois facteurs rendent possible la colonisation de la muqueuse gastrique par *Helicobacter pylori*. La mobilité importante de cette bactérie due à sa forme spiralée, et à ses six flagelles unipolaires, un mécanisme de résistance à l'acidité gastrique grâce à la production d'une uréase (Fitzgerld, 1995) et la capacité des bactéries d'adhérer aux cellules cibles, les cellules épithéliales gastriques (Matysiak et Mégraud, 1996).

### **1.5.2. Facteurs de persistance et de pathogénécité.**

Plusieurs mécanismes de persistance ont été évoqués. Il a été montré que *Helicobacter pylori* peut échapper à la défense humorale de la muqueuse en résistant à la phagocytose. L'activité uréasique a pour conséquence la production d'ammoniaque, selon la quantité produite, il peut entraîner une vacuolisation au niveau des cellules, les tuer ou inhiber la synthèse de l'ADN.

Une cytotoxine, protéine vacuolisante (Vac A), ayant les mêmes propriétés que l'ammoniac est retrouvée chez 50 % des souches de *Helicobacter pylori* (de Korwin, 1994). Elle stimulerait spécifiquement la réponse inflammatoire en induisant la sécrétion de l'interleukine 8 (Labigne, 1995).

Le lipopolysaccharide (LPS) est un facteur majeur responsable des altérations de la muqueuse gastrique. Ces altérations sont dues aux réactions de type auto-immune, car le LPS possède une structure identique à celle des antigènes des groupes sanguins Lewis (Bbuckley et O'Morain, 1996).

Les protéines de stress (hpsB) induisent, comme les LPS, des désordres auto-immunes. Ils stimuleraient aussi les lymphocytes T capables de reconnaître des épitopes homologues des protéines cellulaires synthétisées en réponse au stress imposé à la cellule (Labigne, 1994b).

Parmi les enzymes qui permettent la survie de la bactérie ont été décrites des enzymes antioxydants (catalase et super oxyde dismutase) qui protègent les bactéries des radicaux libres: c'est le cas de la pyruvate-flavodoxine oxidoréductase qui est nécessaire pour le métabolisme de *Helicobacter pylori* (Mori et al. 1995).

D'autres facteurs pathogènes et marqueurs de virulence identifiés chez *Helicobacter pylori* sont résumés dans le tableau 2.

**Tableau 2**  
**Facteurs pathogènes identifiés chez *Helicobacter pylori*.**

Facteur et/ou marqueur	Action	Gène	Protéine	Références
protéine à action chimiotactique	activation des phagocytes libération d'IL-8	?	?	(Mori, 1995)
protéine soluble	Stimulation de sécrétion gastrique	?	?	(Bliss <i>et al</i> , 1995)
acide gras-cis9,10-méthylèneoctadécanoïque	Stimulation de la sécrétion d'ions H <sup>+</sup>	?	?	(Hatz <i>et al</i> , 1995)
Porine de 31kDa	Fonction non déterminée	?	?	(Karita <i>et al</i> , 1995)
Protéine AIF1	Inhibition de la sécrétion acide	?	?	(Akopyants <i>et al</i> , 1995)
Vac A	Cytotoxique	<i>vac A</i>	87-95kDa	
Région Cag I Cag A		<i>cagA</i>	31kpb 120-128kDa	
<i>pic A</i> <i>pic B</i>	Stimulation d'IL8- stimulation d'IL-8	<i>cag B</i> <i>cag C</i>	36kDa 101kDa	
Région Cag II		<i>cag II</i>	21 kpb	

## 1.6. Pathologie humaine à *Helicobacter pylori*.

Les maladies gastroduodénales associées à l'infection à *Helicobacter pylori* sont : l'ulcère duodénal, l'ulcère gastrique, les gastrites et les tumeurs malignes gastriques (Vallot, 1994).

### 1.6.1. Les ulcères.

*Helicobacter pylori* est retrouvé dans plus de 90% des cas d'ulcères duodénaux (Dorval, 1996) et 70 % des cas d'ulcères gastriques (Huidzick, 1996).

Les maladies ulcéreuses sont responsables d'une mortalité et d'une morbidité importante. Les principales complications sont l'hémorragie et la perforation. Il existe actuellement des preuves en faveur de la guérison définitive de ces complications après l'éradication de *Helicobacter pylori* (Labnez et al cité par Buckley et O'Morain, 1996).

### 1.6.2. Les gastrites.

Au total environ 90% des patients ayant une gastrite ont une infection à *Helicobacter pylori* (Fléjou, 1996).

### 1.6.3. Tumeurs malignes gastriques.

La plupart des cancers de l'estomac sont des adénocarcinomes. Parmi les autres tumeurs malignes gastriques, les lymphomes malins sont les moins rares. Des données épidémiologiques ont montré que l'infection à *Helicobacter pylori* augmenterait le risque de survenue de ces deux types de tumeur (Fléjou, 1994)

Une relation de cause à effet existe entre *Helicobacter pylori* et cancer gastrique. La bactérie est classée comme un carcinogène de grade I (certain) par l'Agence Internationale de recherche sur le Cancer (Dixon cité par Buckley et O'Morain, 1995). L'atrophie gastrique est l'élément central dans le processus carcinogène. La présence de l'atrophie augmente significativement le risque de développer un cancer et plus de 90% de tous ces cancers gastriques se développent sur une muqueuse atrophique (Kuipers, 1995).

Les facteurs qui peuvent jouer un rôle dans cette évolution sont:

- la prolifération cellulaire augmentée de la muqueuse inflammée et atrophique;
- les modifications du mucus, secondaires à la présence de *Helicobacter pylori* pourraient de plus favoriser l'accès de carcinogènes présent dans la lumière gastrique vers les cellules épithéliales;
- l'augmentation du taux de nitrites et de radicaux libres oxygénés et la diminution du taux d'acide ascorbique dans le liquide gastrique.

Par analogie avec les mécanismes de la carcinogenèse virale, l'ADN de *Helicobacter pylori* pourrait être intégré et causer la transformation de la cellule hôte; mais aucune donnée ne permet à l'heure actuelle d'évoquer un tel phénomène (Fléjou, 1994).

L'infection est également associée au lymphome gastrique de type MALT (muqueuse associant tissu lymphoïde). L'estomac normal ne contient pas de tissu lymphoïde associé aux muqueuses.

L'infection chronique entraîne la formation d'agrégats lymphoïdes et de follicules lymphoïdes. L'infection par ce germe est présente chez 92 à 100 % des patients avec un lymphome de bas grade de type MALT à cellules  $\beta$ .

Plusieurs cas de régression complète et de rémission de plus de 2 ans de lymphome du type MALT de bas grade ont été rapportés après éradication de *Helicobacter pylori* (Watherspoon et al. cité par Buckley et O'Morain, 1996).

#### 1.6.4. Autres pathologies.

Les conséquences de l'éradication de *Helicobacter pylori* sur le traitement et la prévention des ulcères secondaires aux AINS (anti-inflammatoire non stéroïdien) n'ont pas été étudiées à ce jour. Quant aux données de la littérature encore fragmentaires et parfois contradictoires. Elles ne permettent pas de tirer de conclusions formelles concernant les liens entre les lésions gastro-duodénales observées sous AINS et *Helicobacter pylori* (Bretagne, 1994).

Cependant il apparaît que des patients ayant une dyspepsie non ulcéreuse avec des symptômes de type ulcère sont probablement un sous groupe de maladie

ulcéreuse et que ce sous groupe pourrait bénéficier de l'éradication de *Helicobacter pylori* (Zerbib, 1994 ; Galamiche et al, 1994).

## **1.7. Conséquence de l'infection à *Helicobacter pylori*.**

### **1.7.1. La muqueuse gastrique.**

La colonisation de la muqueuse gastrique provoque une réaction inflammatoire locale et humorale caractérisée par une infiltration de la muqueuse par des lymphocytes, des plasmocytes et des macrophages (Blaser cité par Lamarque, 1995). Les principales lésions sont de type érosif ou desquamatif (Foliquet, 1989).

### **1.7.2. La sécrétion acide.**

La primo infection par *Helicobacter pylori* peut s'accompagner d'une diminution momentanée de la sécrétion gastrique acide. Cette diminution pourrait être due à l'effet direct d'une protéine bactérienne (Cave et al. cité par Chamourad, 1996), ou à l'activité de l'histidine décarboxylase, enzyme qui permet la synthèse de l'histamine (Courillon et Mallet cité par Chamourad, 1996).

Elle pourrait être également secondaire à la réaction inflammatoire locale (Blaser cité par Chamourad, 1996) ou plus probablement à une homologie partielle de la séquence entre l'ATPase gastrique  $H^+K^+$  et la cytotoxine libérée par *Helicobacter pylori*. Cette inhibition sécrétoire serait liée à l'acide tétradécanoïque, acide présent dans la toxine (Ruszniewski, 1994).

En cas d'infection par *Helicobacter pylori* prédominant dans l'antrum, les cytokines et les autres médiateurs de l'inflammation réduisent la sécrétion de somatostatine par les cellules «D», ce qui entraîne une hypergastrinémie (Cala et al. cité par Buckley et al., 1996).

### **1.7.3. La sécrétion de gastrine.**

L'inflammation provoquée par *Helicobacter pylori* interviendrait en augmentant le taux de gastrine. Mais le mécanisme de cette hypergastrinémie reste à nos jours imprécis (Mignon et Pospais, 1996).

### 1.7.4. La sécrétion peptique.

L'hypersécrétion gastrique acide est associée à une augmentation de la sécrétion de pepsine (Baron, *et al* cité par Mignon et Pospai, 1996), conduisant à une activité lytique sur le mucus gastrique et duodénaï

## 1.8.Méthodes de diagnostics.

### 1.8.1. Méthode directe.

C'est une méthode invasive nécessitant une endoscopie: Il faut rechercher la présence de *Helicobacter pylori* dans les biopsies réalisées au niveau de l'antra (2 à 3 cm en amont du pylore). Cependant certains auteurs recommandent la réalisation de plusieurs biopsies à des sites différents de la muqueuse gastrique améliorant ainsi le rendement de la culture dans le diagnostic de l'infection (Hazelle: *et al.* cité par Yousfi, 1997).

Le prélèvement doit être transporté à +4°C dans du Sérum physiologique et ensemencé dans les 2 à 4 heures qui suivent l'endoscopie. Il est cependant préférable d'utiliser des milieux de transport qui permettent une conservation jusqu'à 24 heures à +4°C, de tels milieux «portagerm *pylori*» sont actuellement commercialisés par Bio Mérieux (Lamouliatte *et al.*, 1992).

Il existe en outre un autre mode de conservation qui consiste à placer les biopsies dans 1 ml d'un milieu de transport contenant un mélange de cystéine-albimi et de 20% de glycérol et de conserver le tout à -70°C jusqu'à la culture (Yousfi, 1997).

Ces biopsies sont réalisées dans un premier temps pour des tests rapides et simples qui permettent la détection de *Helicobacter pylori*, à savoir le test à l'urée et le frottis coloré.

- Le test rapide à l'urée est basé sur l'existence d'une uréase très intense chez *Helicobacter pylori*. C'est un test présomptif: Si la bactérie est présente dans la biopsie, le milieu riche en urée va subir une alcalinisation qui fait virer l'indicateur de pH.

- Le frottis coloré est préparé par écrasement de la biopsie côté mucus, fixation et coloration par la méthode de Gram. L'observation au fort grossissement

permet de reconnaître des bacilles Gram négatif incurvé ou en S se nichant au niveau des cryptes ou aux abords de l'épithélium de surface.

Quant à la culture, elle peut se réaliser sur différents milieux de bases: cœur cerveau (BHIA), Brucella, Mueller-Hinton, Columbia, Trypticase Soy Agar (TSA) et Egg Yolk Agar (EYA) (Hachem *et al*, 1995). Ces milieux doivent être enrichis de sang de cheval frais (5 à 10%), d'extrait polyvitaminique et d'un mélange d'agents sélectifs Vancomycine (10mg/l), cefsulodine (5mg/l) et cycloheximide (100mg/l) ou bien acide nalidixique, vancomycine, triméthoprim et amphotéricineB (Yousf, 1997), car le prélèvement est souvent contaminé par la flore orale. Il existe en outre une gélose *pylori* contenant du plasma de cheval et un mélange d'antibiotiques dont la formule est adaptée à la recherche de ce germe (Megraud, 1994).

Ces milieux doivent être conservés à +4°C durant quelques jours pour avoir un maximum d'efficacité.

Une culture en milieu liquide peut être obtenue dans un bouillon *Brucella* supplémenté avec 2% de foetal calf Sérum et de 2% de mélange de Skirrow. Ce bouillon doit être agité dans un bain marie sous atmosphère contrôlée.

Les colonies ainsi obtenues après 3 à 7 jours d'incubation en atmosphère microaérophile et à +37°C, doivent être soumises à une vérification de la pureté des souches.

L'identification consistera en une vérification des caractères suivants:

- caractères morphologiques;
- caractères biochimiques;
  - recherche de l'uréase;
  - recherche de la catalase et de l'oxydase;
  - recherche de la  $\gamma$  glutamyl-transférase;
  - recherche de la nitrate réductase;
  - recherche de la DNase.



Une galerie d'identification rapide proposée par Bio Merieux (rapidec *pylori*) permet un diagnostic de certitude pour tous les caractères biochimiques (Megraud, 1992 a).

Vu la fragilité du germe et son évolution vers des formes coccoïdes non cultivables; les cellules peuvent être conservées à court terme (une semaine) sur une boîte de Petri à +4°C, à condition qu'elle soit en atmosphère microaérophile (Megraud, 1992 b).

Quant à la conservation à long terme, elle n'est pas possible à -20°C. Elle est difficile sous forme lyophilisée; par contre elle est possible à -80°C dans les milieux suivants: *Brucella* glycérolé à 25 %, Sérum de cheval à 17 % de glycérol, eau peptonée contenant 17% de glycérol ou bien même dans du lait écrémé à 17% de glycérol (Souquet, 1995).

L'amplification génique est un test réalisé *in vitro* permettant d'amplifier sélectivement un fragment d'ADN présent dans un échantillon, jusqu'à un million de fois (Labigne 1994c). Elle est réalisée avec des amorces du gène de l'uréase. Elle est utilisable sur des biopsies, le suc gastrique ou des échantillons de selles, de salive et de plaque dentaire (Souquet, 1995).

D'autres examens complémentaires peuvent contribuer à l'identification de ce germe à savoir l'examen histologique et l'observation au microscope électronique.

En ce qui concerne l'examen histologique aucune coloration n'est spécifique pour *Helicobacter pylori*, c'est la connaissance de la morphologie caractéristique qui permet son diagnostic (de Mascarelle, 1989). Quant au microscope électronique à balayage, il permet une observation exacte de la colonisation de *Helicobacter pylori* sur la muqueuse et confirme sa localisation sous le mucus (Foliquet, 1989).

## 1.8.2. Méthodes indirectes.

### 1.8.2.1. Tests sérologiques.

La spécificité de la sérologie est très satisfaisante, car les réactions croisées avec d'autres micro-organismes ne sont pas significatives. De ce fait les antigènes non purifiés tels que les sonicats ou «glycine extract» ont été utilisés (Lozniesewskie, 1995). Toutefois on s'oriente maintenant vers des extraits antigéniques (antigènes dits de deuxième génération) contenant notamment l'uréase ou d'autres protéines spécifiques (Lamouliatte *et al.*, 1992).

### 1.8.2.2. Test respiratoire à l'urée marquée (breath test).

Dans un tel test, l'urée marquée au carbone 13 est ingérée par le patient. Si de l'uréase (et donc *Helicobacter pylori*) est présent au niveau de l'estomac, l'urée sera hydrolysée en ammoniac et gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) (Logan, 1994). Ce CO<sub>2</sub> marqué sera absorbé et éliminé par les poumons dans l'air expiré. La proportion de carbone radioactif est ensuite analysée en comparant la quantité de CO<sub>2</sub> marqué d'un échantillon d'air expiré 30 mn après, il est possible de prouver si le sujet est infecté ou non par *Helicobacter pylori* (Megraud *et al.*, 1997).

### 1.8.2.3. Dosage du liquide gastrique.

Plusieurs auteurs ont proposé de doser l'urée ou l'ammoniac du liquide gastrique soit directement, soit après lavage de l'estomac et en introduisant une solution d'urée. Si *Helicobacter pylori* est présent, la concentration d'urée est diminuée et celle de NH<sub>3</sub> augmentée. Ces méthodes sont actuellement peu utilisées (Lamouliatte *et al.*, 1992).

Le tableau 3 résume les méthodes de diagnostics utilisées pour la mise en évidence de *Helicobacter pylori*.

**Tableau 3**  
**Méthodes de diagnostics (Marshall, 1995).**

Sensibilités	Méthodes	Prélèvement	Spécificité
95%	sérologie	Sérum	85%
95%	ELISA	Sérum	85%
95 à 98%	Test respiratoire	air expiré	95 à 98%
98%	Histologie (Giemsa)	2 biopsies	98%
90 à 95%	Culture	biopsie	100%
30 à 50%	Culture	selles	100%
95%	PCR	selles, biopsie suc gastrique	95%

### 1.9. Traitement et sensibilité aux antibiotiques.

Parmi les antibiotiques disponibles, les  $\beta$ -lactamines, les tétracyclines, les nitroimidazolés, les fluoquinolones, les rifamycines et les macrolides peuvent avoir une activité *in vivo* sur l'éradication de *Helicobacter pylori* (Lamouliatte, 1989). Cependant il persiste des difficultés dans l'éradication de ce germe. La plupart des antibiotiques ont leur activité maximum à pH neutre, seuls les nitroimidazolés, les tétracyclines et les sels de bismuth ne sont pas affectés par l'acide gastrique.

Megraud (1991) note que l'activité bactéricide de l'amoxicilline est significativement diminuée sur les bactéries sessiles (adhérentes) par rapport aux bactéries planctoniques (en suspension).

La diffusion des antibiotiques dans la muqueuse gastrique dépend de la taille de la molécule et de son hydrophobicité. D'autres critères peuvent limiter l'activité des antibiotiques notamment les bactéries poussant au contact d'un support moins accessible à l'action des antibiotiques (Megraud, 1995).

En 1994, la réunion américaine de Consensus du National Institut of Health a recommandé de traiter tous les patients porteurs d'un ulcère gastrique ou duodénal par une thérapeutique visant à éradiquer *Helicobacter pylori* de la muqueuse gastrique, différents schémas sont proposés.

- Les monothérapies antibiotiques (amoxicilline, nitroimidazolé et macrolides) obtiennent des taux d'éradication de 20% à 40% (Bouché, 1995).

- Les bithérapies associant un antiseécrétoire et un antibiotique donnent des taux d'éradication maximum de 60% (Bouché, 1995).

- Les trithérapies associant un antiseécrétoire et deux antibiotiques donnent des taux d'éradication compris entre 71 et 96% (Cayla, 1995; Hentchel, 1993).

- Le schéma thérapeutique de la quadrithérapie consiste en une association d'un antiseécrétoire (oméprazole), de bismuth, de tétracycline et de métronidazole. La quadrithérapie offre un taux moyen d'éradication de 90% et devrait être retenue en seconde intention en cas d'échecs thérapeutiques et en cas de résistance au métronidazole (Vanderhulst, 1997).

## 1.10. Réponse immunitaire et immunisation.

L'infection muqueuse provoquée par *Helicobacter pylori* induit une réponse immunitaire systématique locale d'expression variable, humorale, cellulaire et inflammatoire (Fauchère, 1994).

La réponse humorale est caractérisée par une augmentation des populations plasmocytaires productrices d'IgA, d'IgM et d'IgG.

La réponse cellulaire se distingue par un infiltrat de lymphocyte T de type suppresseur cytotoxique (CD8) au niveau de l'épithélium, et de type auxiliaire inductrices CD4<sup>+</sup> au niveau du chorion ( de Korwin, 1994).

La muqueuse infectée par *Helicobacter pylori* est en effet le siège d'une intense réaction immunitaire croisée entre des antigènes bactériens et des antigènes de l'hôte. Ces antigènes pourraient être les protéines de stress (HPS heat shock protein). Cette chronicité peut s'accompagner de l'expression par les cellules

épithéliales gastriques des antigènes d'histocompatibilité de classe II (HLA-D) (Fléjou, 1989).

En plus des thérapies curatives nous devons penser à des thérapies prophylactiques à savoir la vaccination. Pour cela le vaccin en projet doit être capable de stimuler le système immunitaire muqueux (Labigne, 1994). Il doit comprendre un antigène et un adjuvant, l'antigène peut être l'uréase (holoenzyme) ou l'un de ses composants (*UreA*, *UreB*); une protéine de choc thermique (*HspA*, *HspB*) ou la cytotoxine *VacA* (Ferrero, 1995).

Les substances d'origine bactérienne connues pour leur pouvoir adjuvant sont les lecithines, le LPS et son constituant le lipide A, ou les lipoprotéines. On peut aussi utiliser des produits synthétiques tels que les microsphères pour microencapsulation ou les lipophilic immune-stimulating complexes (ISCOMS) (Ferrero, 1994).

## 1.11. Conclusion.

La revue bibliographique nous a permis de présenter l'état actuel des connaissances accumulées ces dix dernières années. Le concept de traiter l'ulcère comme maladie infectieuse est maintenant non seulement admis, mais considéré de par le monde comme l'option à retenir. Le cancer gastrique est justement le sujet d'un nouveau développement des travaux sur l'infection à d'antiscréttoire;

- enfin la réalisation d'un vaccin, médecine préventive particulièrement efficace et parfaitement adaptée, devrait être réalisable. *Helicobacter pylori*.

Actuellement *Helicobacter pylori* peut être aisément diagnostiqué par les tests de bactério-l'amélioration, de sérologie ou les techniques de diagnostic par PCR. Mais il reste beaucoup à faire sur le plan taxonomique car il n'existe pas encore de règle stricte pour séparer les bactéries au niveau du genre.

Une collaboration intense et multidisciplinaire permettra:

- l'amélioration du diagnostic sérologique par l'utilisation d'anticorps monoclonaux;
- l'amélioration du traitement antibiotique et de l'association antiscréttoires ;
- enfin la réalisation d'un vaccin , médecine préventive particulièrement efficace et parfaitement adapté, devrait être réalisable.

DEUXIÈME PARTIE

MATÉRIEL

ET

MÉTHODES

## **2.1. Matériel biologique.**

### **2.1.1. Prélèvements.**

Les différents prélèvements utilisés dans cette étude ont été effectués à Tlemcen dans différents cabinets de gastro-entérologues, au C.H.U d'Oran et à l'Hôpital Central de l'armée d'Alger.

La recherche de *Helicobacter pylori* a été entamée chez 223 patients présentant une symptomatologie gastroduodénale évocatrice.

Les malades inclus dans cette étude ont été choisis en dehors de tout contexte récent d'hémorragie digestive, de présence de reflux bilieux important ou de prise d'antibiotiques (<15 jours).

La fibroscopie est pratiquée chez 121 sujets se plaignant de douleurs épigastriques (61 hommes et 60 femmes), 44 présentant un ulcère gastrique (37 hommes et 7 femmes), 30 présentant un ulcère duodénale (26 hommes et 4 femmes), 16 présentant une gastrite (7 hommes et 9 femmes) et 12 présentant une bulbite (7 hommes et 5 femmes).

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

### **2.1.2. Biopsies.**

Au cours de l'examen endoscopique, trois fragments de l'antra sont prélevés.

### **2.1.3. Souches bactériennes.**

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de biopsies gastriques au laboratoire de Microbiologie de l'Institut de Biologie de Tlemcen, au C.H.U d'Oran, à l'Hôpital Central de l'armée et au Laboratoire de Bactériologie Virologie du C.H.U Claude Huriez de Lille (France).



## 2.2. Milieux et conditions de culture.

Les milieux de culture utilisés lors de notre travail étaient soit liquides, soit solidifiés par addition d'agar à différentes concentrations.

Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 15 mn et sont conservés à + 4°C.

La composition par litre des différents milieux est donnée ci-dessous.

### 2.2.1. Milieux de transport.

#### - Sérum physiologique (Diagnostics Pasteur, 1987).

Le prélèvement est transporté à +4°C dans du Sérum physiologique pour un temps n'excédant pas 4 heures.

Chlorure de sodium	9g
Eau distillée qsp	1000 ml

#### - Solution de Ringer-Cystéine au ¼ (Han *et al.*, 1995).

La solution de Ringer cystéine au ¼ peut être utilisée pour un temps de transport excédant les 4 heures mais ne dépassant pas la demi-journée. C'est une solution à fort pouvoir réducteur permettant de protéger les bactéries sensibles à l'oxygène.

Chlorure de sodium	0,25 g
Chlorure de potassium	0,105 g
Chlorure de calcium	0,12 g
Bicarbonate de sodium	0,005 g
Chlorhydrate de cystéine	0,3 g
Eau distillée qsp	1000 ml

#### - Portagerm pylori (Référence 42 041, BioMérieux).

Il s'agit d'une gélose semi-molle commercialisée par BioMérieux associant une base peptonée, des éléments favorisant la conservation de *Helicobacter pylori* et un mélange d'antibiotiques empêchant la prolifération des germes de la flore oropharyngée. Les biopsies ainsi effectuées sont enfoncées dans la gélose du Portagerm *pylori* aussitôt le prélèvement effectué. Elles sont conservées à + 4°C. L'ensemencement doit être réalisé dans les 24 à 48 heures.

- BHIB glycérol à 20%( cerveau-cœur) (Diagnostics Pasteur, 1987).

Protéase peptone	10 g
Infusion de cervelle de veau	12,5 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate disodique	2,5 g
Glucose	2 g
Glycérol	20 ml

La solution est répartie dans des tubes à congeler de 1ml et les biopsies sont conservées à - 80°C pour un temps indéterminé.

**2.2.2. Milieux de croissance.**

Les milieux utilisés pour la croissance sont additionnés de sang de cheval (5 à 10%) et d'antibiotiques à des concentrations variables selon les milieux.

- Gélose Columbia (Diagnostics Pasteur, 1987).

Sang stérile	7%
Amidon	1 g
Mélange spécial de peptones	23 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	10 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Le pH obtenu est de 7,3.

Solution d'antibiotiques

Vancomycine	10 mg
Amphotéricine B	5 mg
Cefsulodine	5 mg

- Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941).

Sang stérile	5%
Infusion de viande de bœuf	30 g
Hydrolysât acide de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar	10 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Le pH obtenu est de 7.3

Solution d'antibiotiques

Vancomycine	10 mg
Colimycine	5 mg
Fungizone	5 mg

- Bouillon nutritif nitraté à 1% (Diagnostics Pasteur, 1987).

Peptone	5 g
Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2 g
Nitrate de sodium	10 g
Eau distillée qsp	1000 ml

**2.2.3. Milieu d'isolement.**- Milieu Viande - levure (Diagnostics Pasteur, 1987).

Sang stérile	5%
Peptone	10 g
Extrait de viande	3 g
Extrait de levure	6 g
Chlorure de sodium	5 g
Chlorhydrate de sodium	0.3 g
Glucose	2 g
Agar	18 g
Eau distillée qsp	1000 ml

- Solution d'antibiotiques

Vancomycine	10 mg
Amphotéricine B	5 mg
Cefsulodin	5 mg

**2.2.4. Milieu d'identification de *Helicobacter pylori*.**- Milieu urée- indole (Diagnostics Pasteur, 1987).

Ce milieu est utilisé pour l'identification de l'activité uréasique

Tryptophane	3 g
phosphate monopotassique	1 g
phosphate dipotassique	1 g
chlorure de sodium	5 g
Urée	20 g
Alcool à 45%	10 ml
Rouge de phénol	2,5 ml
Eau distillée qsp	1000 ml

Ce milieu est commercialisé par l'institut Pasteur d'Alger.

- Milieu pour la recherche de l'activité phosphatase alcaline (Diagnostics Pasteur, 1987).

Réactif I: Phénylphosphate disodique et 4-aminoantipyrine. Ce réactif est présenté sous forme lyophilisé, il doit être conservé à +4°C.

Réactif II: Solution tamponnée de ferricyanure de potassium. Ce réactif se conserve très bien à +4°C.

- Milieu pour la recherche de la  $\gamma$  glutamyl transférase (Leminor, 1990)

Des disques de papier sont imprégnés du substrat suivant:

Acide $\gamma$ -L glutamique-paranitroaniline	0,028 g
Eau distillée qsp	5 ml
Acétone	5 ml

Solution tampon

Phosphate monopotassique	3,6 g
Phosphate disodique	14,3 g
Toluène	4 ml
Eau distillée qsp	1000 ml

### 2.2.5. Milieu de conservation des souches.

Néopeptone	1 g
Chlorure de sodium	0,5 g
Eau distillée qsp	75 ml
Glycérol	25 %

### 2.2.6. Conditions de culture.

Les bactéries sont cultivées en boîtes de Petri. L'incubation de *Helicobacter pylori* se fait à +37°C pendant 3 à 7 jours en microaérophilie.

## 2.3. Méthodes.

### 2.3.1. Prélèvement.

En pratique l'endoscopiste doit biopsier obligatoirement au niveau de l'antra, à environ 2 cm du pylore. Trois biopsies sont effectuées aussi proche que possible les unes des autres. Les biopsies ainsi effectuées subissent trois traitements, la recherche de l'activité uréasique, la coloration de Gram et la culture.

#### 2.3.1.1. Test à l'urée.

Il est réalisé en déposant une biopsie dans le réactif urée-indole. Ce réactif contient un indicateur coloré qui est le rouge de phénol. La présence de *Helicobacter pylori* dans l'échantillon test se manifeste par le virage de l'indicateur au rouge violacé.

#### 2.3.1.2. Frottis coloré.

Le frottis est préparé par écrasement de la biopsie entre deux lames, ou bien en utilisant une lame de bistouri, on prendra soin de bien étaler le fragment biopsique auquel on appliquera la coloration de Gram.

#### 2.3.1.3. Culture et conservation des biopsies.

Avant la mise en culture, le fragment biopsique doit être broyé pour permettre la dispersion des germes. Le broyage des biopsies se fait de deux manières.

- **Broyage manuel des biopsies:** il est réalisé soit entre deux lames stériles, en déposant un fragment biopsique, on appuie fortement puis on récupère le broyat à l'aide d'une öse et on met en culture; soit à l'aide d'une lame bistouri, le fragment biopsique est déposé sur une lame stérile et on écrase la biopsie à l'aide d'une lame bistouri. le broyat est récupéré à l'aide d'une öse pour la mise en culture; soit à l'aide de sable fin, dans un tube à hémolyse stérile on dépose un fragment biopsique on ajoute du sable (une pincée), on immerge dans une solution de Ringer (3 à 4 gouttes) on écrase la biopsie sur le bord du tube avec une tige de verre( pipette préalablement fermée en arrondi). On étale la suspension sur une boîte.

**-Broyage mécanique:** on dépose la biopsie dans 0,5 ml de solution de Ringer, on procède au broyage à l'aide d'un broyeur mécanique ultraturax. On ensemence la totalité du broyat dans deux boîtes à l'aide d'un râteau. On prendra soin de rincer la tige du broyeur après chaque Broyât, respectivement dans de l'alcool et dans de l'eau distillée stérile.

Après broyage, la culture en milieu liquide est faite sur milieu non sélectif tel que le bouillon nutritif nitraté ou le BHIB qui donnent des formes coccoïdes non viables après le troisième jour. Ces formes conservent néanmoins leurs caractères enzymatiques à savoir l'uréase, la catalase et l'oxydase.

Quand le délai de mise en culture dépasse la demi-journée, on utilise le milieu Ringer-Cystéine au ¼. Si il est encore plus long, il est préférable d'utiliser le portagerm *pylori* qui permet une conservation jusqu'à 24 heures à + 4°C. Pour un délai excédant les 24 heures il est possible de conserver les biopsies dans du BHIB glycérolé à 20% et les stocker à -70°C jusqu'à la culture.

### **2.3.2. Isolement et conservation des souches bactériennes.**

#### **2.3.2.1. Isolement.**

L'isolement de *Helicobacter pylori* est réalisé sur milieu Columbia supplémenté de sang et d'antibiotiques. Un réisolement pour enrichissement est nécessaire mais il doit être réalisé sur milieu viande-levure à 5% de sang stérile et d'antibiotiques (vancomycine 10 mg, amphotéricine B 5 mg et cefsulodine 5mg).

#### **2.3.2.2. Conservation.**

La conservation à court terme (une semaine environ) est possible sur boîte si cette dernière est maintenue à + 4°C en atmosphère microaérophile. Tandis qu'à long terme, on racle le tapis bactérien à l'aide d'une öse en plastique stérile que l'on met dans un tube de 3ml de la solution de conservation glycérolé à 25% , puis on fractionne dans 3 tubes et on congèle à - 80°C.

#### **2.3.2.3. Utilisation des souches congelées**

Pour une éventuelle utilisation on décongèle à température ambiante et on ensemence la totalité du tube sur deux boîtes de milieu viande-levure à 5% de

sang. L'incubation est de 72 heures à 37°C. La totalité des cultures ainsi obtenue est raclée et suspendue dans du BHIB et réensemencée sur 2 boîtes de milieu viande-levure enrichi de sang (5%) et d'antibiotiques. L'une des boîtes servira pour une recongélation, la deuxième boîte servira pour l'extraction de l'ADN.

### **2.3.3. Caractérisation de *Helicobacter pylori*.**

La première étape de cette étude consiste à vérifier la pureté des souches ainsi que leurs caractéristiques biochimiques.

#### **2.3.3.1. Vérification de la pureté des souches.**

La morphologie particulière de *Helicobacter pylori* observée après coloration de Gram nous permet de vérifier la pureté des isolats.

#### **2.3.3.2. Caractéristiques biochimiques.**

L'identification de *Helicobacter pylori* par les tests biochimique consiste en une recherche de la  $\gamma$ -glutamyl transférase, de la phosphatase alcaline, de la nitrate réductase, de l'uréase, de la catalase et de l'oxydase.

**Recherche de la  $\gamma$ -glutamyl transférase:** une suspension laiteuse est faite dans 0.5 ml de tampon et on y dépose un disque imprégné de  $\gamma$ -glutamyl transférase. L'incubation est réalisée à 37° en atmosphère microaérophile pendant 24 heures. En présence de l'enzyme, nous obtenons une coloration jaune.

**Recherche de la phosphatase alcaline:** On fait une suspension microbienne très épaisse dans 0.5 ml d'eau distillée stérile. On ajoute 1ml du réactif I, on agite et on incube à 37°C au bain-marie pendant 30 minutes puis on ajoute 1ml du réactif II. Après agitation, une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration grenat franche, on peut également observer une teinte légèrement rosée témoin d'une activité phosphatasique faible. La lecture doit être faite dans les dix minutes qui suit l'addition du réactif II, car la coloration rouge s'atténue progressivement.

**Recherche de la nitrate réductase:** La recherche de la nitrate réductase s'effectue en ensemençant un tube de bouillon nutritif enrichi de 1 %, de nitrate de sodium. On pratique sur ce tube la diasoréaction de Griess en ajoutant dix gouttes d'acide sulfanilique et dix gouttes d'alpha-naphtyl-amine. Une réaction positive se manifeste par l'apparition d'une coloration rouge.

**Recherche de l'activité uréasique:** la recherche de l'activité uréasique s'effectue en prélevant une colonie bactérienne que l'on dépose dans 3 à 4 gouttes de milieu urée indole. Une réaction positive se traduit par le virage de la solution vers le rose.

### **2.3.4. Extraction de l'ADN chromosomique de *Helicobacter pylori*.**

L'extraction de l'ADN chromosomique de *Helicobacter pylori* a été faite soit à partir des biopsies gastriques, soit à partir des isolats.

#### **2.3.4.1. A partir des biopsies gastriques.**

On écrase une biopsie entre deux lames, on récupère le broyat dans un tube épendorff auquel on ajoute 250µl d'une solution Tris-Hcl 50 mM et EDTA 1 mM. On ajoute aussi 250 µl de SDS 1% et 2,5 µl de protéine K (1 mg/ ml).

L'incubation est faite dans un bain-marie à + 55°C pendant deux heures. Après refroidissement on ajoute du Nacl 5M à raison de 1/10 V.

**Extraction Phénolique:** la solution obtenue est déprotéinisée par addition de phéno! saturé en eau ultra-pur dans un volume double du volume initial. Après agitation pendant quelques minutes, les deux phases sont séparées par centrifugation (4000 trs/min, 10 mn ). Les protéines se concentrent dans la phase phénolique (phase inférieure), cette étape est renouvelée tant que l'interface contient des débris cellulaires. La phase aqueuse est prélevée et mélangée à 1ml de chloroforme puis centrifugée (5000 trs/mn, 5 mn ). Cette dernière est ainsi récupérée.

**Précipitation alcoolique:** à la phase aqueuse est ajouté de l'éthanol absolu froid (V/V). On centrifuge (10000trs/mn, 15 mn ). A l'ADN précipité, on ajoute de l'alcool à 70° (V/V). On centrifuge (10000 trs/mn, 15 mn ) puis on élimine l'alcool



et on laisse sécher à l'étuve à +37°C pendant une heure environ. L'ADN est resuspendu dans 50µl de tampon d'extraction (TE).

#### **2.3.4.2 A partir des isolats.**

Deux méthodes ont été utilisées: la méthode de Béji (1987) et la méthode simplifiée de Clayton (Clayton, 1993).

##### **2.3.4.2.1. Méthode de Béji (1987).**

**Mise en culture:** on réalise un repiquage sur milieu viande levure à 5% de sang de cheval frais à partir d'une culture jeune de *Helicobacter pylori*. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 72 heures.

**Lyse alcaline des cellules:** la lyse se fait par adjonction de 200µl de NaOH (0,03M) et 20µl de SDS à 25%, suivi d'une neutralisation de la soude par une solution saline d'EDTA à pH 7.

**Déprotéinisation:** la déprotéinisation se fait par action de la protéinase K à 0,2% pendant 30 mn à 37°C.

**Précipitation de l'ADN chromosomique:** la séparation des deux phases se fait en solution de chloroforme-alcool isoamylique (v/v) par centrifugation à 10 000 trs/min pendant 20mn, puis précipitation de la phase aqueuse (acide nucléiques) par l'éthanol à 95% à -20°C. La lyse de l'ARN se réalise avec la ribonucléase A à 0,2%, 15mn à 60°C, ensuite cette RNase est éliminée par la protéinase K à 2% pendant 30 mn à 37°C.

**Conservation:** les acides nucléiques ainsi précipités sont récoltés dans 50 µl de TE par centrifugation à +4°C (13000 trs/mn, 60 mn). Le culot d'ADN est repris dans 50 µl de TE et conservé à -20°C.

##### **2.3.4.2.2. Méthode simplifiée (Clayton, 1993).**

Les colonies sont mises en suspension dans 200 µl d'eau ultra-pure, on chauffe pendant 5 mn à 100°C puis on centrifuge pendant 10 mn à 11000 tours. Le surnageant est récupéré dans 50 µl de TE et stocké à -20°C.

### 2.3.4.3. PCR-RFLP.

La méthode de Clayton (1993) est utilisée pour l'étude du polymorphisme des gènes *UreB* et *HTRA*, elle ne donne pas un bon culot d'ADN mais elle a l'avantage d'être simple et rapide. Elle est de ce fait bien adaptée pour l'amplification qui ne nécessite pas de grandes quantités d'ADN.

Quant au culot d'ADN obtenu après extraction selon la méthode de Béji (1987), il est utilisé pour l'étude du polymorphisme du chromosome total car cette extraction donne un bon culot d'ADN.

Le culot d'ADN obtenu après extraction simplifiée est suspendu dans 50µl de tampon d'extraction TE. 10µl de cette suspension sont repris dans 90µl de mélange réactionnel contenant:

Tampon Taq(tris à pH 8,3)	100 µl
Amorces nucléotidiques	0.5x2 µl(10 <sup>-4</sup> )
NTP (20 nmol)	0.5 µl
Taq (5 u/µl)	0,5 µl
Chlorure de magnésium (50mM)	3 µl
Eau ultra-pure	75 µl

Le tout est recouvert de 100 µl d'huile minérale pour éviter l'évaporation.

La réaction de polymérisation en chaîne est faite dans un thermocycleur (Perkin-Elmer) selon le programme suivant:

La dénaturation initiale est faite une fois à +95°C pendant cinq minutes, puis une deuxième fois à +94°C pendant une minute. L'hybridation est réalisée à 45°C; pour l'extension une température de 72°C est requise pendant une minute, cette opération est répétée 35 fois; une dernière extension est réalisée à 72°C pendant 5 minutes.

Les amorces utilisées sont: HPU50 (5' GAACATGACTACACCAT 3') et HPU25 (5' TGGTTTGAGGGCGAATC 3') pour le gène *Ure B* et HP48-1 (5' AATTTTATAAGTGGCGGTG 3') et HP48-2 (5' TGTTTAAAATCCGCAACGC 3') pour le gène *HTRA*.

#### 2.3.4.4. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.

Cette technique a été utilisée pour l'étude du polymorphisme des gènes *Ure B* et *HTRA* après digestion par les enzymes de restriction *Afu I* et *Hae III* à 37°C pendant 2 heures, ainsi que pour l'étude du polymorphisme du chromosome total après digestion par les enzymes de restriction *Hind III* et *Bst EI* à 37°C pendant 3 heures. L'analyse des fragments obtenus se fait sur gel d'agarose à 2% pour les produits amplifiés et 2,5% pour les fragments de digestion du chromosome total contenant 1µg de bromure d'éthidium par ml.

Le tampon de migration est le TBE (Tris Borate 1 mM, EDTA 1mM) le culot d'ADN est suspendu dans 10µl de TE.

La migration s'effectue pendant une nuit à 40 volts pour les deux échantillons. La taille des bandes visibles sous lumière UV est estimée en comparaison avec celle du marqueur de poids moléculaires Ladder (1kpb).

Les gels sont photographiés par Polaroid négatif-positif.

DISCUSSION

ET

RÉSULTATS

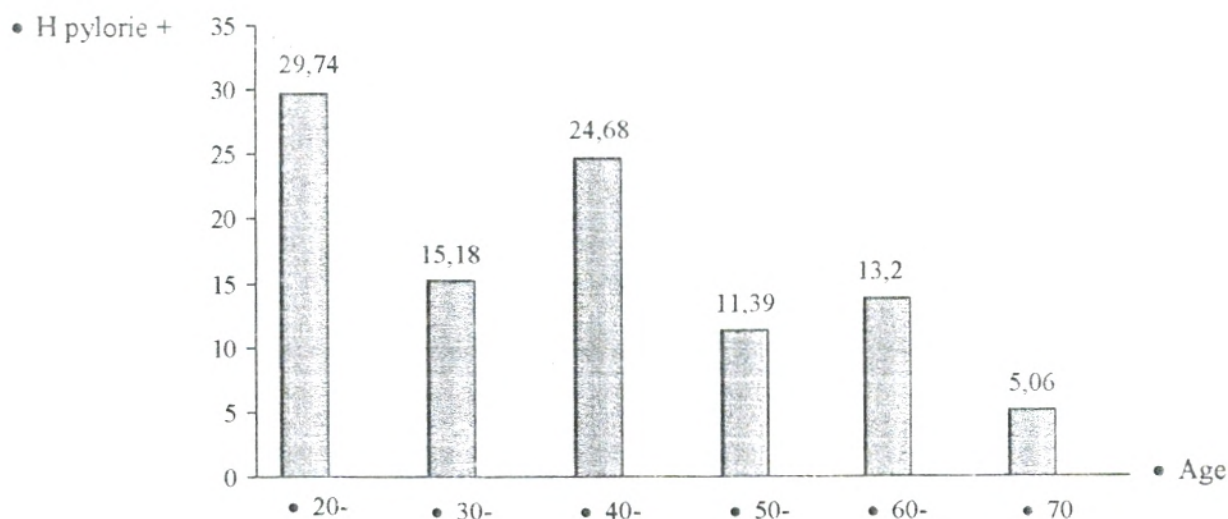
TROISIÈME PARTIE

### 3.1. Pathologies liées à *Helicobacter pylori*.

#### 3.1.1. Fréquence et incidence.

Dans cette étude, l'infection à *Helicobacter pylori* est significativement plus fréquente chez les hommes. Le rapport d'incidence hommes/femmes (sexe ratio) est de 2,43.

Si l'on divise la population par groupe d'âge 20-29 ans, 30-39 ans, 40-49 ans, 50-59 ans, 60-69 ans et plus de 70 ans, chaque groupe d'âge constituant une cohorte. On remarque que l'infection à *Helicobacter pylori* est plus fréquente dans la cohorte des 20-29 ans (29,74%) diminue d'environ la moitié dans la tranche d'âge des 30-39 ans (15,11%) s'élève entre 40 et 49 ans(24,68%). Pour les deux groupes de 50 et 60 ans la fréquence est sensiblement la même et est respectivement de(13,22%) et (11,39%); cette fréquence tend à régresser au-delà des 70 ans(3,16%)(figure 3); constatation courante, du fait de la survenue avec l'âge de symptômes provoqués par d'autres pathologies que l'infection à *Helicobacter pylori*.



**Figure 3 :** Taux d'infection à *Helicobacter pylori* par groupe d'âge chez des patients présentant des pathologies gastroduodénales

### 3.1.2. Les pathologies gastroduodénales.

L'étude que nous avons réalisé est en accord avec les données rapportées par de nombreux auteurs, quant à la relation entre *Helicobacter pylori* et pathologies gastroduodénales (Matysiak et Magraud, 1997; Sobhani, 1995).

La recherche de ce germe est réalisée en première intention lors d'une endoscopie montrant des lésions gastroduodénales discrètes telles que l'érythème, l'aspect micronodulaire et les érosions de la muqueuse; ou plus sévère tel que l'ulcération gastrique ou duodénale.

En ce qui concerne les symptômes pris individuellement, aucun ne semble régulièrement associé à la présence ou à l'absence de *Helicobacter pylori*. La plupart (<56%) consultent pour des brûlures épigastriques, 19% sont des récurrences d'ulcère gastrique, 15% des récurrences d'ulcère bulbaire et 10% des récurrences de gastrites.

Les définitions étaient souvent imprécises ou absentes des fiches des malades ce qui ne nous permet pas d'établir de corrélation entre symptômes et présence de *Helicobacter pylori*.

#### 3.1.2.1. Les gastrites.

La plupart des sujets ayant une gastrite à *Helicobacter pylori* sont asymptomatiques et consulte pour des douleurs dyspeptique.

La définition ou plutôt l'appréciation de la présence d'une gastrite est faite par l'endoscopiste; aucune étude anatomopathologie n'a été réalisée pour définir avec exactitude le type de la gastrite. Il s'agit fréquemment de gastrite avec différents aspects: érythème, aspect bigarré, mamelonné ou bien de congestions des muqueuses avec aspect en rayons de roues. Ces lésions sont observées au niveau de l'antrum rarement étendues au fundus.

L'infection à *Helicobacter pylori* est retrouvée dans notre étude présente chez plus de 75% des patients présentant une gastrite avec sexe ratio femmes/hommes de 1,17. L'antrum est atteint dans 81% des cas et le fundus dans 13% des cas; on observe rarement des gastrites antro-fundique(6%).

### 3.1.2.2. L'ulcère gastrique.

L'endoscopiste révèle à l'observation une perte de substance arrondie et plus au moins profonde et de localisation antrale, nous n'avons pas rencontré d'ulcération au niveau du corps. La plupart des patients sont des ulcéreux connus (80%). Le taux d'infection dans notre série d'étude est de 75 %. On remarque qu'il est trois fois plus fréquents chez l'homme que chez la femme.

Les ulcères gastriques apparaissent dans une population différente de celle retrouvée dans la plupart des études (Buckley et O'morain, 1996; Megraud et Matysiak, 1997), l'ulcère gastrique apparaît dans une population âgée alors que nos résultats montre que cette pathologie apparaît plutôt dans une population plus jeune; 44% pour les sujets entre 20 et 30 ans, 41% pour les sujets entre 40 et 50 ans et 15% pour les sujets de plus de 50 ans (entre 50 et 70 ans).

### 3.1.2.3. L'ulcère duodénal.

L'association *Helicobacter pylori* et l'ulcère duodénal est de plus de 82% dans notre série d'étude. On remarque que ce dernier est très souvent associée à une gastrite antrale (90 % des cas). Cette association vient renforcer l'hypothèse selon laquelle la gastrite à *Helicobacter pylori* est le facteur de risque d'ulcère duodénal et que cette gastrite précède de plusieurs années l'apparition d'un ulcère duodénal (Mégraud et Matysiak, 1997).

Les ulcérations rencontrées sont souvent des ulcérations rondes ou linéaires (ulcère salami). Elles sont fréquentes chez une population jeune: 45% pour les 20 à 30 ans, 45% pour les 40 à 50 ans et 10% seulement pour les sujets de plus de 60 ans.

### 3.1.2.4. L'inflammation de la muqueuse bulbaire.

L'inflammation de la muqueuse duodénal (ou duodénite) est moins bien documentée que les autres pathologies liés à *Helicobacter pylori*. Chez les patients étudiés nous retrouvons un pourcentage assez faible de ces pathologies par rapport aux autres pathologies rencontrées (8,5%).

L'endoscopiste révèle souvent des érosions, des plis congestifs, et des aspects d'érythème.

Les duodénites apparaissent liées à *Helicobacter pylori* à raison de 73,68% avec une prédominance chez les adultes de 40 à 49 ans dans 90% et 10% seulement pour les sujets entre 20 et 30 ans, avec absence de cette pathologie chez les sujets âgés du fait d'une moins grande fréquence de cette pathologie dans notre échantillon d'études.

### 3.1.3. Discussion.

Grâce à ces méthodes bactériologiques nous avons pu établir que *Helicobacter pylori* était retrouvé lié aux pathologies gastroduodénales (ulcère gastrique et bulbaire et des lésions inflammatoires qui ont pour siège la muqueuse gastrique ou bulbaire) à 82 % (Tableau 4).

L'analyse récente des différentes publications concernant *Helicobacter pylori* montre que cette bactérie intervient dans 90 % des pathogénies gastroduodénales avec une répartition homogène que ce soit pour les gastrites antrales ou bien les ulcères gastriques (Colin, 1996) et bulbaire (Sobhani, 1995).

Les maladies ulcéreuses et les gastrites semblent toutes aussi importantes dans notre série d'étude car leur estimation respective est de l'ordre de 80% et 76% (Tableau 4).

Quant à la répartition des ulcères selon le siège elle est de l'ordre de 83,80% pour les ulcères gastriques. Pour les patients présentant un ulcère bulbaire le taux est d'environ 82% assez proche des résultats de la bibliographie (Vallot, 1994; Guerre, 1996) du fait d'une grande fréquence de cette pathologie dans notre série d'étude (Tableau 5).

Il semble que les patients atteints de gastrite présentent une gastrite limitée à l'antra et rarement étendu au fundus. Les patients présentant une gastrite sont estimés à un taux proche de 76%, alors que l'inflammation du bulbe (bulbite) a été diagnostiquée et évaluée à 73% seulement (Tableau 6).

Les données dont nous disposons permettent de conclure que les patients présentant un ulcère gastrique lié à *Helicobacter pylori* sont moins nombreux que ceux présentant un ulcère bulbaire il y a deux fois plus de patients présentant un ulcère bulbaire qu'un ulcère gastrique. Les cas d'inflammation de la muqueuse gastrique sont plus fréquentes que ceux au niveau de la muqueuse bulbaire (Tableau 6)



**Tableau 4**  
Répartition des lésions selon le type de la pathologie.

Lésions pathologiques	Nombre	HP+	%
Ulcération	105	84	80
Lésions inflammatoire	118	101	85,59
Total	223	185	82,95

**Légende:**

HP+: présence de *Helicobacter pylori*

**Tableau 5**  
Répartition selon le siège de l'ulcère.

Ulcère	Nombre	HP+	%
Gastrique	33	25	75,75
bulbaire	72	63	82,08
Total	105	88	83,80

**Légende:**

HP+: présence de *Helicobacter pylori*

**Tableau 6**  
Répartition selon le siège de l'inflammation.

Lésions inflammatoires	Nombre	HP+	%
Gastrite	99	75	75,75
Bulbite	19	14	73,68
Total	118	89	75,42

**Légende:**

HP+: présence de *Helicobacter pylori*

### 3.2. Mise en évidence de la présence de *Helicobacter pylori*.

Les méthodes de mise en évidence de *Helicobacter pylori* sont semblables aux autres méthodes utilisées pour l'identification des autres bactéries pathogènes.

La recherche de *Helicobacter pylori* peut se faire soit par des méthodes non invasives tels que la sérologie ou le test respiratoire à l'urée marquée (méthodes que nous n'avons pas utilisées dans notre travail) mais par contre, nous avons utilisé des méthodes invasives nécessitant une endoscopie et des biopsies systématiques afin de réaliser des frottis colorés, uréase test, culture et PCR.

#### 3.2.1. Frottis coloré.

La morphologie de *Helicobacter pylori* est caractéristique (Figure 3), ce sont de longs bacilles Gram négatif en courte spire ou incurvés et rend donc le diagnostic sur frottis spécifique et de sensibilité proche de celle de la culture.

La recherche du germe et de sa densité a été réalisée pour 223 lames. Nous avons pu observer 74 cas où il y avait absence totale de germe, 49 cas présentant de rares bacilles et 100 cas où la présence de *Helicobacter pylori* était sur tous les champs.

Cependant 15 cas sur les 74 où l'on n'observe pas de *Helicobacter pylori*, présentaient une culture positive.

La distribution irrégulière du germe au niveau de l'antra et la densité des bacilles sont les principales difficultés s'opposant à l'observation de ce germe. Dans d'autres cas inexploables, on remarque un test urée positive.

Les fragments qui avaient servi à la réalisation du test à l'urée étaient repris, lavés à l'eau physiologique, fixés sur lame et colorés au Gram. Après une observation minutieuse, on pouvait observer de rares bacilles.

La pratique de deux biopsies chez un même patient peut donc améliorer la sensibilité de cette méthode de diagnostic, le nombre de cas inexploables est réduit de 4%.

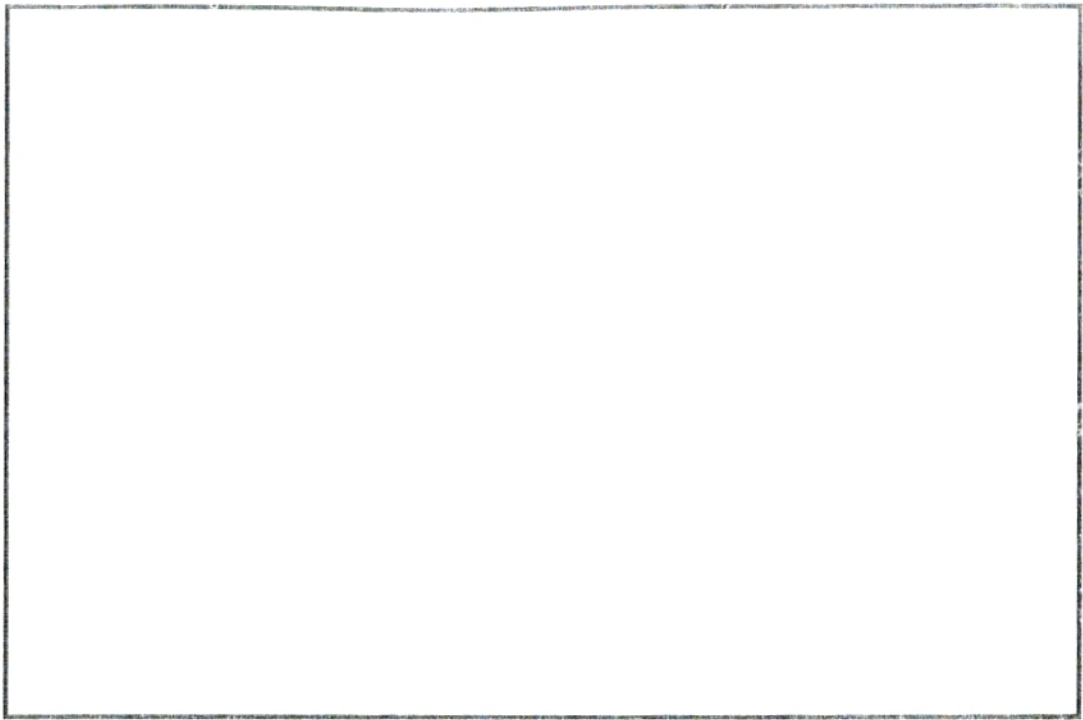


Figure 4  
*Helicobacter pylori* à partir de frottis de biopsies antrales (x 100).

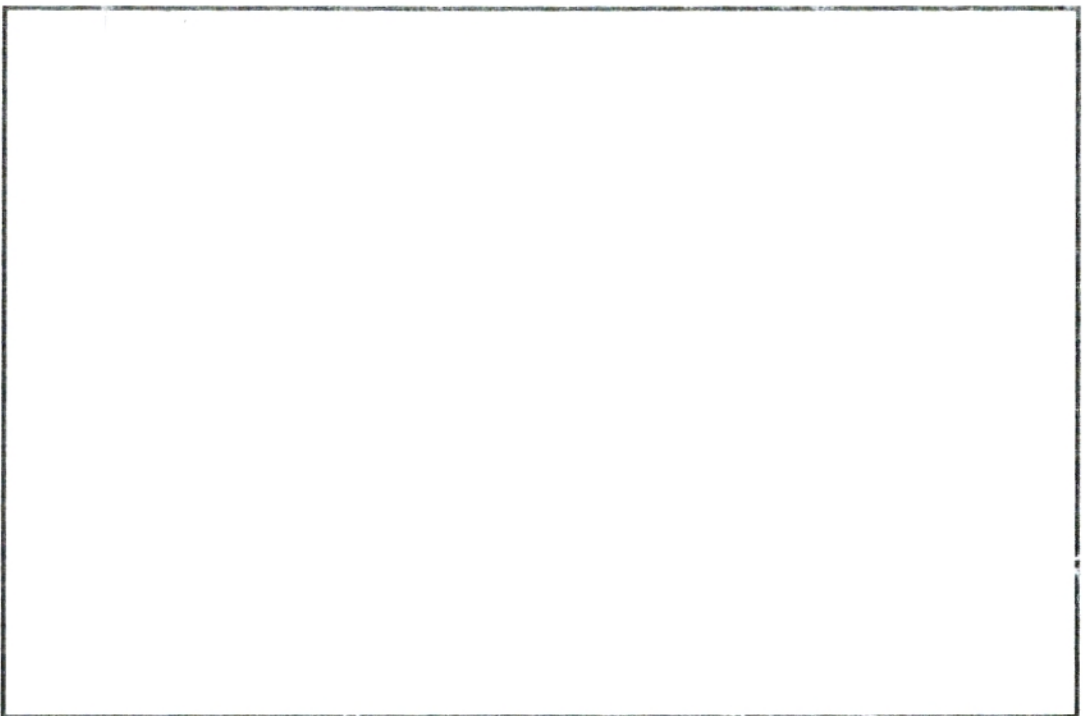


Figure 5  
*Helicobacter pylori* à partir de colonies (x 100).

Il apparaît néanmoins que l'étude du frottis coloré est une bonne méthode rapide de diagnostic puisqu'elle a une sensibilité supérieure à 85% en comparaison avec l'uréase test et la culture. Toutefois il ne peut être pratiqué seul pour pouvoir affirmer la présence ou l'absence de *Helicobacter pylori*, mais il possède de nombreux avantages, il est réalisable dans les deux heures qui suivent l'arrivée des biopsies au laboratoire, et permet une appréciation semi-quantitative de l'abondance des bactéries dans les différents sites de prédilection de ce dernier, à savoir cryptes et proximité du revêtement épithéliale.

Cette abondance de germe a été remarquée chez des patients présentant plutôt une gastrite qu'un ulcère bulbaire ou un ulcère gastrique.

### 3.2.2. L'uréase test.

Le virage coloré de la solution témoin de l'activité uréasique est recherché en salle d'endoscopie toutes les 10 minutes pendant 3 heures. La sensibilité du test à l'uréase est accrue par le temps d'incubation (75% entre 5 et 20 minutes contre 90% à 3 heures).

La rapidité de la réponse est également plus grande dans le cas où la densité des bacilles est très importante. Les fragments biopsiques qui présentent un virage rapide (environ 5 à 10 minutes) étaient repris, lavés à l'eau physiologique, fixés sur lame et colorés au Gram. L'observation microscopique révèle des bacilles dans la majorité des champs observés.

La figure 4 indique les valeurs de sensibilité et de spécificité de l'uréase test pratiqué en salle d'endoscopie en fonction du délai d'observation du virage coloré.

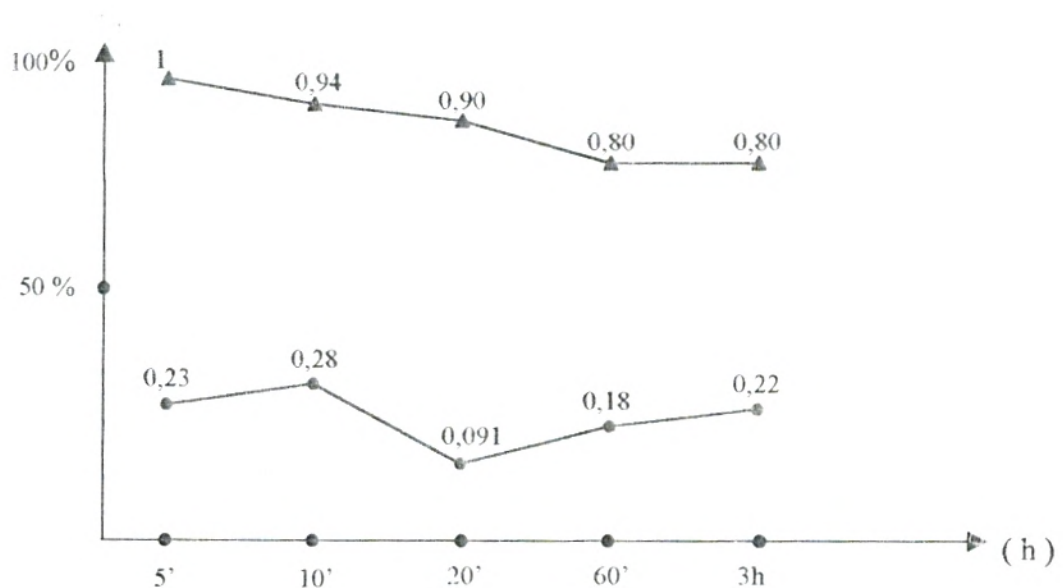
A 3 heures, il existait 17 faux positifs (8%) et 23 faux négatifs (10%). Parmi les 17 faux positifs, les prélèvements étaient stériles dans 5 cas, et comportaient d'autres germes dans les 12 autres cas (levures, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Proteus* et *Pseudomonas*).

Pour les 23 faux négatifs, une présence de *Helicobacter pylori* est confirmée par le Gram ou la culture. Le nombre de colonies observées est certes faible (2 à 4 colonies), par boîte mais ne peut être pris en considération pour expliquer la négativité de ce test.

L'uréase test pratiqué en salle d'endoscopie est donc une méthode de diagnostic simple, rapide et facile à interpréter puisqu'elle repose sur le virage du rouge de phénol. Ce virage est net dans tous les tests que nous avons effectués.

La valeur de l'uréase test dans cette étude était définie par les résultats de l'examen direct ou celui de la culture. D'autre part, la présence des bactéries autres que *Helicobacter pylori* n'interfèrent pas dans les résultats du test puisqu'on confronte ce dernier au Gram et à la culture.

Ainsi l'uréase test pratiquée en salle d'endoscopie avec la solution urée-indole possède une bonne valeur de diagnostic (80% de sensibilité avec un délai de 3 heures) (Figure 5).



**Figure 6:** Sensibilité (●) et spécificité (▲) (ordonnées) de l'uréase test pratiquée en salle d'endoscopie selon le délai d'observation du virage coloré, exprimé en heures (abscisse)

### 3.2.3. La culture.

La présence de *Helicobacter pylori* est affirmée lorsqu'on effectue une culture sur milieux sélectifs. Le nombre de colonies par milieu de culture variant de 0 à 100, parfois on obtenait des tapis de cellules bactériennes, les meilleurs résultats pour une primoculture sont obtenus avec la gélose au sang base Columbia et base Mueller-Hinton. On obtenait de moins bon résultat avec la gélose au sang base coeur-cervelle. La gélose *pylori* ne donne pas un grand nombre de colonies (entre 0 et 10).

Pour le repiquage et l'isolement, le milieu Mueller-Hinton sans aucun supplément donne une assez bonne masse cellulaire mais le milieu viande levure supplémenté avec 5% de sang de cheval et du complexe antibiotique donne de bien meilleurs résultats.

La sensibilité globale de la culture dans la détection de *Helicobacter pylori* était proche de 79 % apparemment loin des résultats escomptés (95%) (Hachem, et al, 1995; Mégraud, 1992 a).

Il existe de nombreux facteurs contribuant à l'échec de la culture: coût élevé, prise en charge rapide des prélèvements et leur acheminement de la salle d'endoscopie à la salle de culture et la mise en culture dans les 2 à 4 heures qui suivent l'endoscopie.

La difficulté que nous avons rencontrée était le mode de broyage manuel à l'aide d'une lame bistouri. Les premiers essais donnaient un nombre de colonies variant de 0 à 30, cette méthode ne permet pas une bonne dispersion des germes emprisonnés dans la biopsie, alors qu'en utilisant le broyeur mécanique ultraturax, on obtenait une sensibilité de 100% avec un tapis bactérien.

Nous sommes parvenus à maintenir les germes sous leur formes cultivables en milieu liquide après un passage sur milieu solide pendant 15 jours en bouillon nutritif nitraté à 1%.

La viabilité est aussi limitée si on laisse la culture évoluer en atmosphère microaérophile à 37°C plus que 14 jours. *Helicobacter pylori* perd également sa viabilité à température et à l'air ambiant; au-delà de trois repiquages successifs les bactéries évoluent vers des formes (coccoïdes) non viables.

On a pu maintenir les bactéries viables à +4°C sur des boîtes pendant 8 jours en atmosphère microaérophile, au-delà de cette limite on les perd. La seule solution est de les conserver dans un milieu glycérolé à 25% et de les congeler à -80°C pour un temps indéfini. Plus tard les échantillons seront décongelés à température ambiante, ensemencés par inondation sur milieu viande levure pour réaliser les examens bactériologiques désirés.

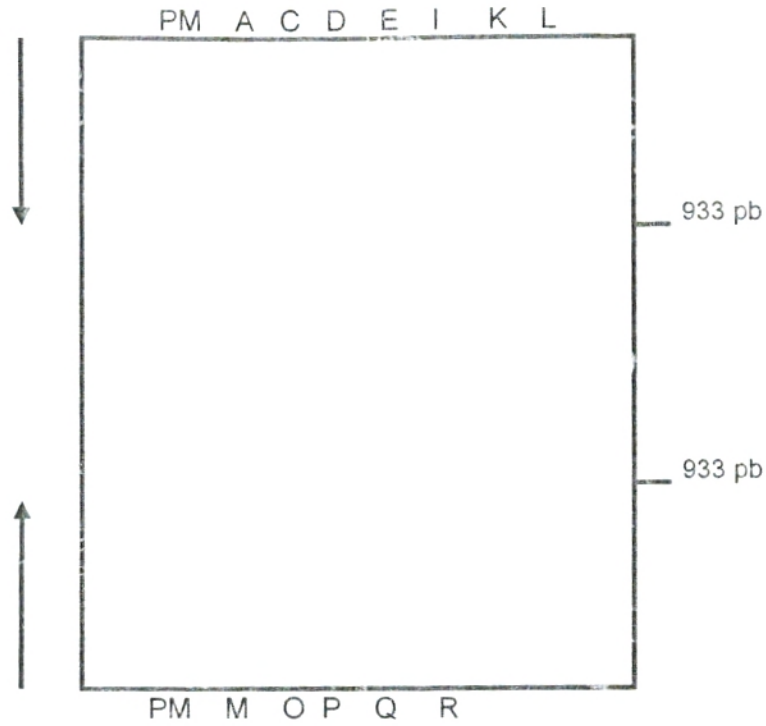
### 3.2.4. PCR à partir de broyat des biopsies.

La précipitation de l'ADN de *Helicobacter pylori* à partir d'un broyat de biopsie selon la méthode décrite par Vincent (1996) nous a permis de cibler deux séquences d'ADN spécifiques de *Helicobacter pylori* pour mettre en évidence la présence ou l'absence de ce dernier. Les séquences d'ADN sont la fraction *Ure B* du gène de l'uréase et le gène *HTRA*. A l'aide des amorces HPU 50 et HPU 25 pour *Ure B* et HP48-1 et HP48-2 pour le gène *HTRA*. Ce ciblage est obtenu en réalisant des coupures des séquences spécifiques par les enzymes de restriction *Alu I* et *Hae III*.

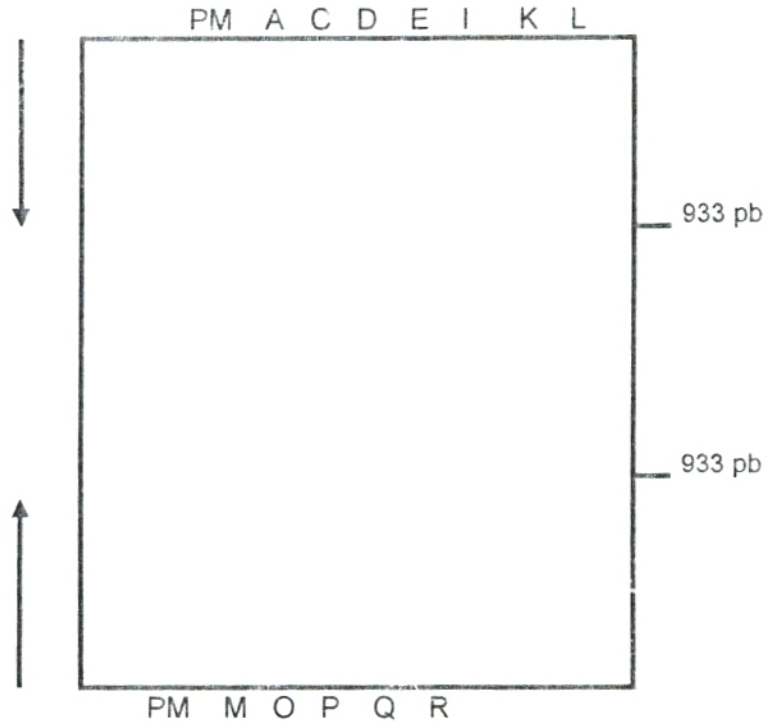
Dans cette série d'étude, nous avons prélevé chez 12 patients 2 biopsies du même site (proximité de l'antra), une biopsie était broyée et mise en culture dans la gélose Columbia supplémenté de 5% de sang et d'antibiotiques; pour la seconde biopsie on procède à l'extraction de l'ADN selon la méthode de Vincent (1996). Les résultats obtenus (Figures 6 et 7) révèlent une sensibilité et une spécificité de 100% pour la culture et pour la PCR.

Nous obtenons après mise en culture des 12 prélèvements et analyse des gels d'électrophorèse la présence de *Helicobacter pylori* chez onze patients (A, C, F, I, K, L, M, N, O, P et Q) et absence de germe chez le patient D.

La détection de *Helicobacter pylori* par PCR à partir de biopsie gastrique est certes rapide puisqu'elle peut se faire dans la demi-journée, mais elle reste onéreuse, elle nécessite un matériel de biologie moléculaire; et n'est pratiqué que dans quelques laboratoires de recherche spécialisés.



**Figure 7**  
**Profil électrophorétique après amplification du gène *Ure B*.**  
 (à partir de *Helicobacter pylori* extrait de biopsies antrales)



**Figure 8**  
**Profil électrophorétique après amplification du gène *HTRA*.**  
 (à partir d'ADNc de *Helicobacter pylori* extrait de biopsies antrales)

**Légendes:**

PM: marqueur de taille Ladder (1 kpb)

A,C,D,E,I,K,L,M,O,P,Q et R: produits d'amplification des différents patients.



### 3.2.5. Conclusion.

Dans cette étude nous avons utilisé des techniques microbiologiques simples qui ont pu détecter la présence de *Helicobacter pylori* à partir de biopsies antrales.

Ces résultats sont concordants avec ceux de la littérature (Cellini, *et al* 1995; Hachem, *et al* 1995; Marshall, 1995; Mégraud, 1992 b) utilisant les mêmes modes de transport, de stockage et de culture de *Helicobacter pylori*. On a cependant tenté la mise en culture de ce dernier sur milieu liquide (bouillon coeur-cerveille supplémenté de 5% sang frais et le bouillon nutritif nitraté à 1%) directement après le broyage de la biopsie, mais on note l'évolution des bacilles après trois jours vers des formes coccoïdes non cultivables, mais qui gardent néanmoins leurs activités enzymatiques (l'uréase, la catalase, l'oxydase et la phosphatase alcaline).

### 3.3. Isolement et identification des bactéries.

Nous avons isolé et identifié 177 souches à partir des différents prélèvements effectués.

#### 3.3.1. Identification des bactéries.

Elle est réalisée en plusieurs étapes. les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 7.

La morphologie de *Helicobacter pylori* est différente de celle observée sur frottis coloré (Figure 3). La coloration réalisée à partir d'une colonie montre des bacilles Gram négatif de tailles relativement importantes, droits, incurvés, en forme de S, de spire, de V et parfois en O (Figure 4).

L'identification est basée sur la détermination des caractères biochimiques:

- Oxydase et catalase positives
- Uréase très fortement positive

On peut également rechercher la présence de la  $\gamma$ -glutamyl transférase, de la phosphatase alcaline et l'absence de la nitrate réductase; qui s'est révélée positive dans 20% des cas. Cette particularité biochimique pourrait être en faveur d'une pathogénéicité plus grande de certaines de nos souches.

Tableau 7  
Caractéristiques biochimiques de *Helicobacter pylori*.

Souche	UTB	F.	C.	UTC	Cat.	Oxy.	γ-GT	P.A.	N.R.
Hp B <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp B <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp B <sub>3</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp B <sub>4</sub>	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Hp B <sub>5</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp B <sub>6</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp B <sub>7</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp B <sub>8</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp B <sub>9</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp B <sub>10</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp B <sub>12</sub>	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp B <sub>13</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp B <sub>14</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp G <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp G <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>3</sub>	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>4</sub>	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>5</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>6</sub>	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>7</sub>	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>8</sub>	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>9</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>10</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp G <sub>11</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>12</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>13</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>14</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>15</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp G <sub>16</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>17</sub>	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>18</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp G <sub>19</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>20</sub>	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>21</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>22</sub>	+	-	+	+	+	+	+	+	+

*Helicobacter pylori*  
isolé de patients  
présentants une bulbite

*Helicobacter pylori*  
isolé de patients  
présentants une gastrite

**Légendes:**

UTB: test à l'urée à partir de biopsies  
F.: frottis  
C.: culture  
UTC: test à l'urée à partir de colonies  
Cat.: catalase  
Oxy.: oxydase

γ-GT: γ-glutamyl-transférase  
P.A.: phosphatase alcaline  
N.R.: nitrate réductase  
nd: réaction indéterminée  
+: réaction positive  
-: réaction négative

Tableau 7 (suite)  
Caractéristiques biochimiques de *Helicobacter pylori*.

Souche	UTB	F.	C.	UTC	Cat.	Oxy.	$\gamma$ -GT	P.A.	N.R.
Hp G <sub>23</sub>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Hp G <sub>24</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>25</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>26</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp G <sub>27</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>28</sub>	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>29</sub>	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>30</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>31</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>32</sub>	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>33</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>34</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp G <sub>35</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp G <sub>36</sub>	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>37</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>38</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>39</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>40</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>41</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp G <sub>42</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>43</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>44</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>45</sub>	-	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>46</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>47</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp G <sub>48</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>49</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>50</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>51</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp G <sub>52</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>53</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>54</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp G <sub>55</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp G <sub>56</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp G <sub>57</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd

*Helicobacter pylori*  
isolé de patients  
présentants une gastrite

**Légendes:**

UTB: test à l'urée à partir de biopsies  
F.: frottis  
C.: culture  
UTC: test à l'urée à partir de colonies  
Cat.: catalase  
Oxy.: oxydase

$\gamma$ -GT:  $\gamma$ -glutamyl-transférase  
P.A.: phosphatase alcaline  
N.R.: nitrate réductase  
nd: réaction indéterminée  
+: réaction positive  
-: réaction négative

Tableau 7 (suite)  
Caractéristiques biochimiques de *Helicobacter pylori*.

	Souche	TUB	F.	C.	UTC	Cat.	Oxy.	$\gamma$ -GT	P.A.	N.R.
<i>Helicobacter pylori</i> isolé de patients présentants une gastrite	Hp G <sub>58</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Hp G <sub>59</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Hp G <sub>60</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Hp G <sub>61</sub>	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	Hp G <sub>62</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Hp G <sub>63</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Hp G <sub>64</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Hp G <sub>65</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Hp G <sub>66</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Hp G <sub>67</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Hp G <sub>68</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Hp G <sub>69</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Hp G <sub>70</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Hp G <sub>71</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Hp G <sub>72</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp G <sub>73</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Hp G <sub>74</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Hp G <sub>75</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Helicobacter pylori</i> isolé de patients présentant un ulcère bulbaire	Hp u B <sub>1</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	Hp u B <sub>2</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Hp u B <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Hp u B <sub>4</sub>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	Hp u B <sub>5</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	Hp u B <sub>6</sub>	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Hp u B <sub>7</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Hp u B <sub>8</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Hp u B <sub>9</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Hp u B <sub>10</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Hp u B <sub>11</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Hp u B <sub>12</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Hp u B <sub>13</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Hp u B <sub>14</sub>	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp u B <sub>15</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Hp u B <sub>16</sub>	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Hp u B <sub>18</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
Hp u B <sub>19</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

**Légendes:**

UTB: test à l'uréase à partir de biopsies  
F.: frottis  
C.: culture  
UTC: test à l'uréase à partir de colonies  
Cat.: catalase  
Oxy.: oxydase

$\gamma$ -GT:  $\gamma$  glutamyl transférase  
P.A.: phosphatase alcaline  
N.R.: nitrate réductase  
nd: réaction indéterminée  
+: réaction positive  
-: réaction négative

Tableau 7 (suite)  
Caractéristiques biochimiques de *Helicobacter pylori*.

Souches	TUB	F.	C.	UTC	Cat.	Oxy.	$\gamma$ -GT	P.A.	N.R.
Hp uB <sub>20</sub>	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Hp uB <sub>21</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>22</sub>	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uB <sub>23</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uB <sub>24</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uB <sub>25</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>26</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>27</sub>	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uB <sub>28</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uB <sub>29</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp uB <sub>30</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp uB <sub>31</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
HP uB <sub>32</sub>	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uB <sub>33</sub>	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uB <sub>34</sub>	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uB <sub>35</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp uB <sub>36</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>37</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uB <sub>38</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp uB <sub>39</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uB <sub>40</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>41</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>42</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uB <sub>43</sub>	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uB <sub>44</sub>	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Hp uB <sub>45</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp uB <sub>46</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp uB <sub>47</sub>	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>48</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>49</sub>	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>50</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>51</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>52</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>53</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>54</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-

*Helicobacter pylori* isolé  
de patients présentant  
un ulcère bulbaire

**Légendes:**

UTB: test à l'uréase à partir de biopsies  
F.: frottis  
C.: culture  
UTC: test à l'uréase à partir de colonies  
Cat.: catalase  
Oxy.: oxydase

$\gamma$ -GT:  $\gamma$ -glutamyl-transférase  
P.A.: phosphatase alcaline  
N.R.: nitrate réductase  
nd: réaction indéterminée  
+: réaction positive  
-: réaction négative

Tableau 7 (suite)  
Caractéristiques biochimiques de *Helicobacter pylori*.

Souches	TUB	F.	C.	UTC	Cat.	Oxy.	γ-GT	P.A.	N.R.
<i>Helicobacter pylori</i> isolé de patients présentant un ulcère bulbaire									
Hp uB <sub>55</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>56</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>57</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>58</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>59</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>60</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>61</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>62</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uB <sub>63</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Helicobacter pylori</i> isolé de patients présentant un ulcère gastrique									
Hp uG <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uG <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp uG <sub>3</sub>	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uG <sub>4</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uG <sub>5</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp uG <sub>6</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uG <sub>7</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp uG <sub>8</sub>	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Hp uG <sub>9</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uG <sub>10</sub>	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uG <sub>11</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uG <sub>12</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uG <sub>13</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uG <sub>14</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uG <sub>15</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uG <sub>16</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uG <sub>17</sub>	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hp uG <sub>17</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp uG <sub>18</sub>	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Hp uG <sub>19</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uG <sub>20</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uG <sub>21</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hp uG <sub>22</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uG <sub>23</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uG <sub>24</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hp uG <sub>25</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-

**Légendes:**

UTB: test à l'uréase à partir de biopsies  
 F.: frottis  
 C.: culture  
 UTC: test à l'uréase à partir de colonies  
 Cat.: catalase  
 Oxy.: oxydase

γ-GT: γ-glutamyl-transférase  
 P.A.: phosphatase alcaline  
 N.R.: nitrate réductase  
 nd: réaction indéterminée  
 +: réaction positive  
 -: réaction négative

### 3.3.2. Bactéries autres que *Helicobacter pylori*.

L'étude bactériologique des biopsies antrales a révélé la présence d'autres germes, ce sont des espèces d'origine aérodigestive supérieure (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas* et levure), nous avons même observé une cohabitation levure et *Helicobacter pylori*.

La présence de ces autres germes a été observée chez 20 patients tous sous traitement antisecretoire consultant après échec du traitement. L'explication est que ces antisécrétoires ont occasionné une hypochloridrie qui a permis aux germes ingérés au cours des repas de s'implanter dans l'estomac (Figure 8,9et10).

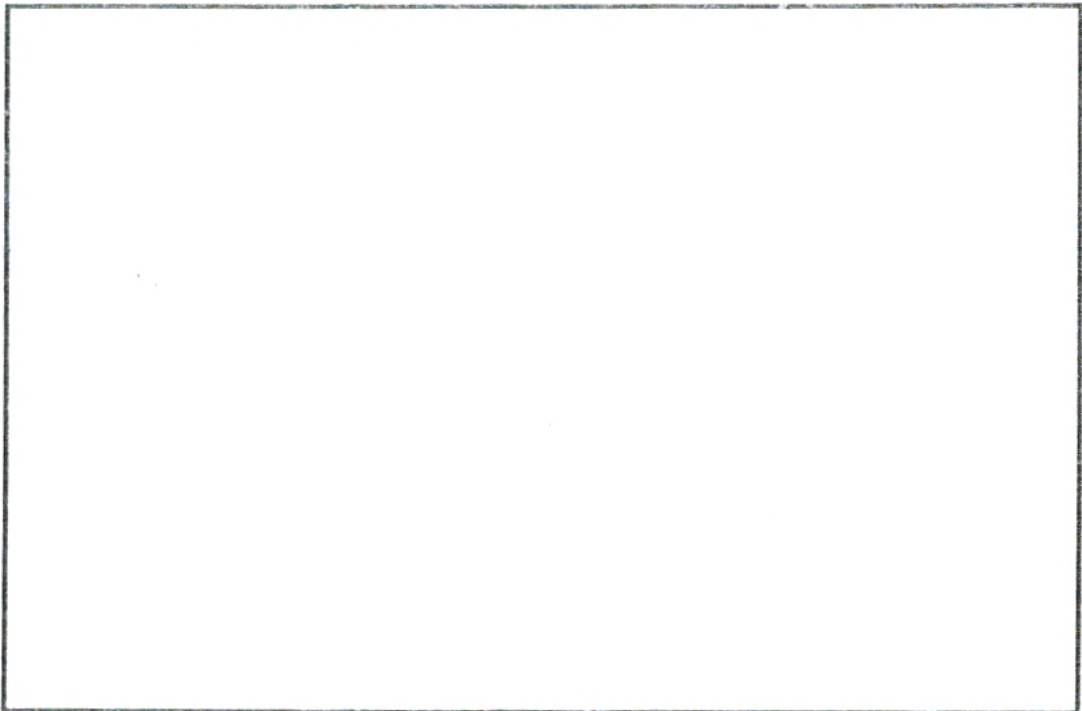
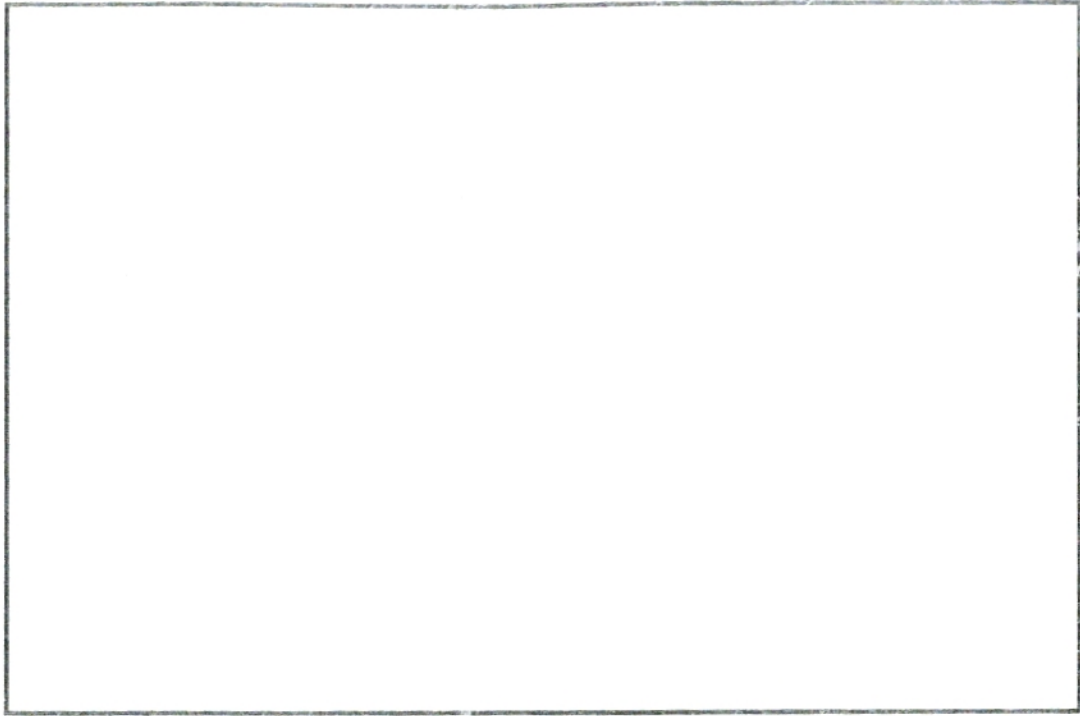
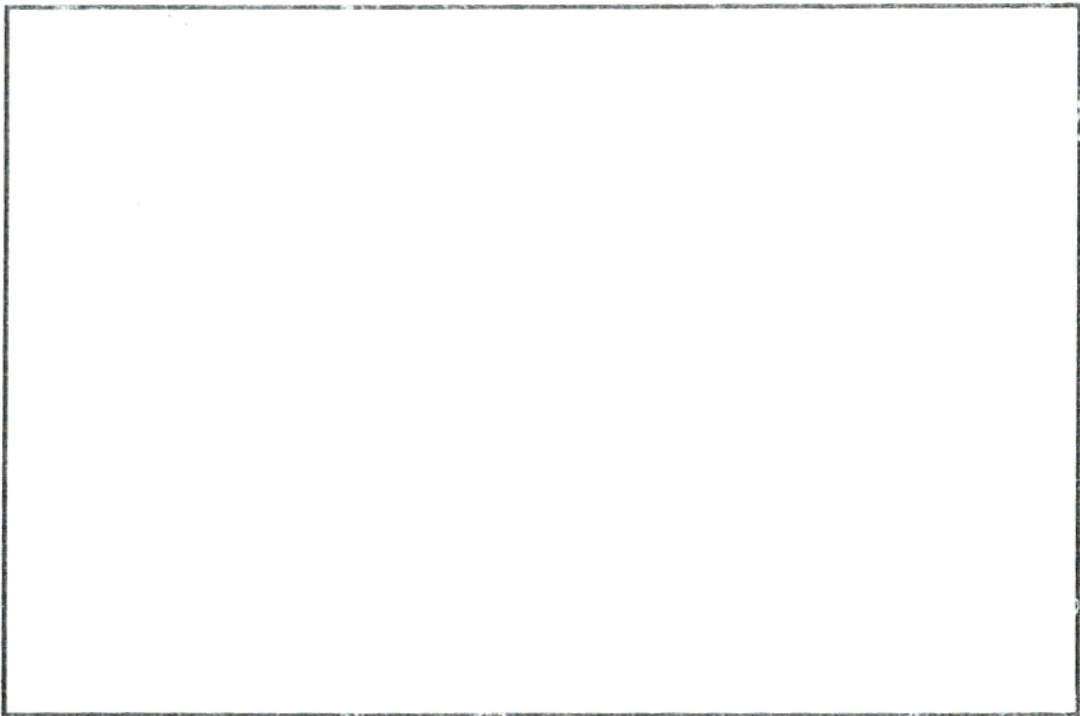


Figure 9

Cohabitation *Helicobacter pylori* et levure à partir de biopsies antrale (x100).



**Figure 10**  
Levure à partir de frottis de biopsies antrales (x 100).



**Figure 11**  
Cocobacilles à partir de biopsie (x 100).



### 3.4. Etude moléculaire sur quelques souches de *Helicobacter pylori*.

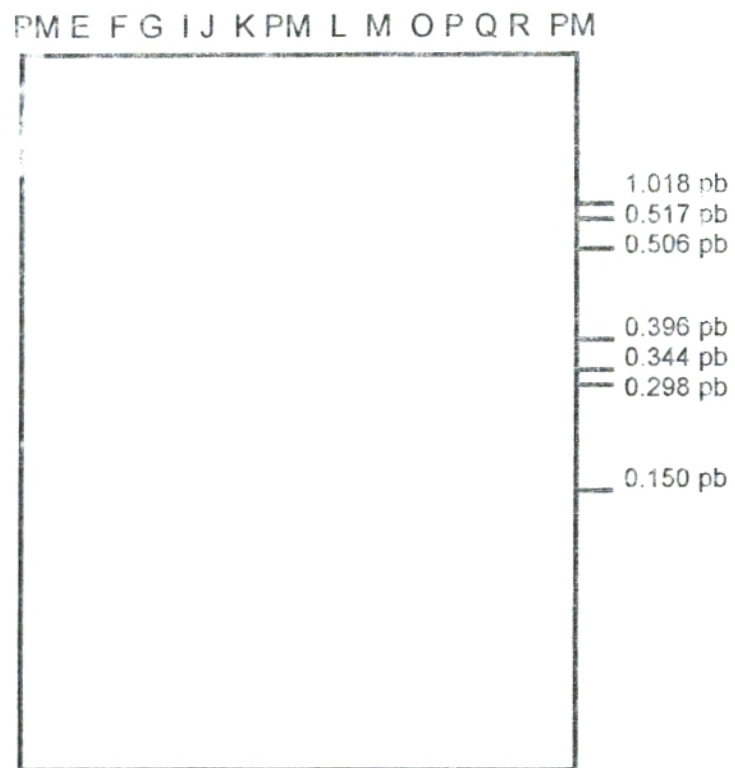
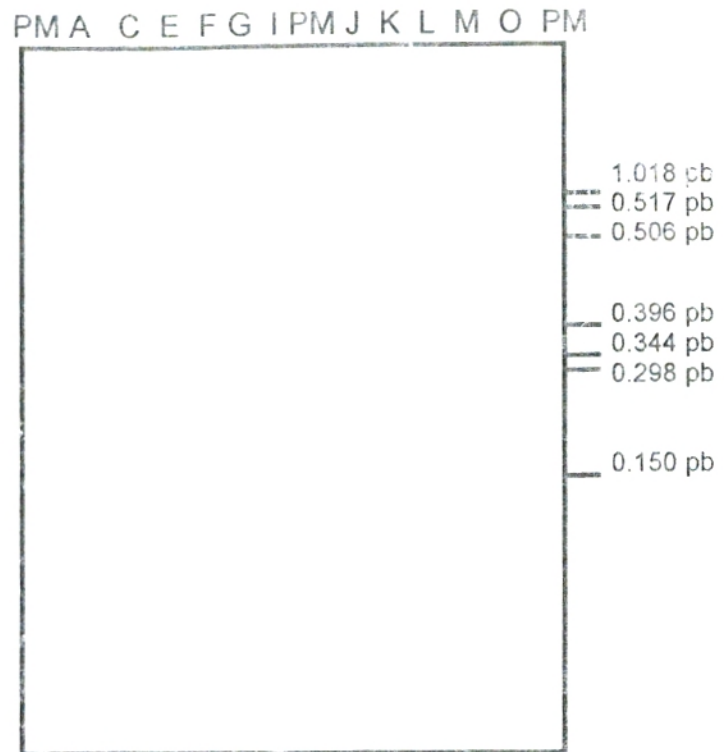
Le but de ce travail est de comparer plusieurs isolats de *Helicobacter pylori* entre eux afin de détecter d'éventuels liens épidémiologiques entre des patients. 14 isolats sont inclus dans ce travail; nommés A, C, E, F, G, I, J, K, L, M, O, P, Q et R.

On procède à la comparaison moléculaire des isolats par leurs empreintes génomiques, en utilisant 2 méthodes: l'étude du polymorphisme des gènes *HTRA* et *UreB* et l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction du chromosome total.

Tous les gels comportaient un marqueur de poids moléculaire( 1 kb Ladder, GIBCO).

L'estimation de la taille des fragments reposait sur la conversion des distances de migration en poids moléculaire, par ajustement hyperbolique à partir du marqueur, selon le modèle décrit par Scaffer 1981.

Les figures 6 et 7 montrent les gels d'électrophorèse des fragments de restriction des gènes *HTRA* et *UreB* obtenu à l'aide des endonucléases *Alu I* et *Hae III*.



Figures 12 et 13

Profil électrophorétique des fragments de restriction après digestion par *Alu* I et *Hae* III des gènes *HTRA* et *Ure B*.

La comparaison des profils des isolats de *Helicobacter pylori* isolés de différents patients (A, C, E, F, G, I, J, K, L, M, O, P, Q, et R) montre un profil de restriction pour le patient A différent de tout les autres profils avec des fragments de longueur comprise entre 0,533 kb et 0,181kb avec absence de fragment de 0,152 kb retrouvé chez la majorité des autres patients.

Le patient C quant a lui présente un profil distinct avec 8 fragments compris entre 0,408 kb et 0,113 kb avec présence du fragment de 0.152 kb.

Les patients E et F présentent des profils sensiblement identiques, avec deux fragments supplémentaires de 0,317 kb et de 0,249 kb pour le patient E.

Le patient G présente un profil différent de tout les autres avec seulement 5 fragments compris entre 0,441kb et 0,181kb avec absence du fragment de 0,152 kb retrouvé chez les autres souches.

Les patients I et J présentent un profil sensiblement identique avec une bande supplémentaire de 0,144 kb pour le patient J.

Les patients K, L et M présentent un profil sensiblement identique entre eux avec présence de 10 fragments compris entre 0,980 kb et 0,113 kb.

Les patients O et P présentent aussi un profil sensiblement identique entre-eux avec 8 fragments.

Quant aux patients Q et R ; ils possèdent un profil identique avec 7 fragments compris entre 0,408 kb et 0,130 kb.

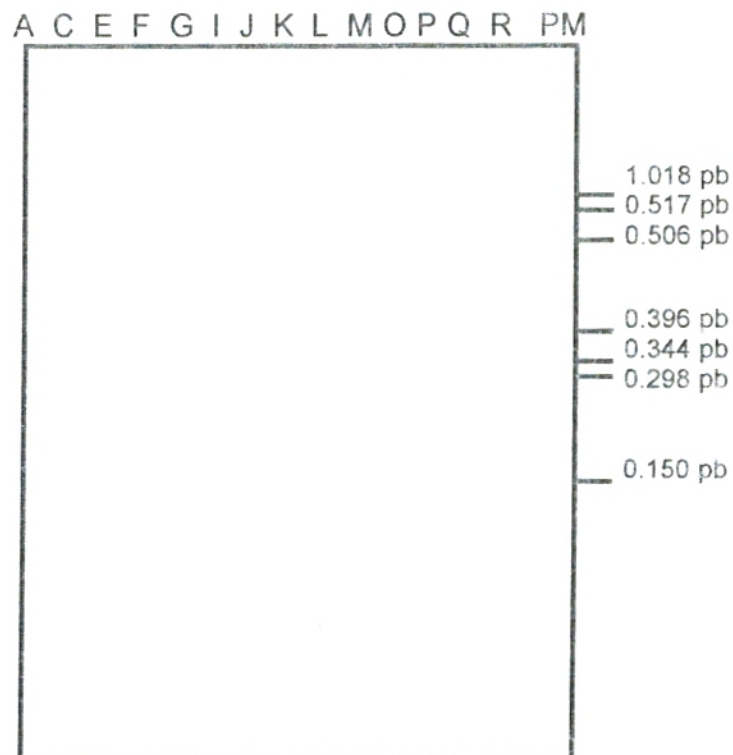
Nous obtenons donc dix profils différents (A, C, E, F, G, J, I), (M, L, et K), (P et O) et (R et Q) dans cette série de 14 patients ; 6 profils sont retrouvés une seule fois (A, C, E, F, G, J et I) avec (I=J) et 4 profils sont retrouvés 2 fois (I=J, L= M, O= P et Q=R) (Tableau 8).

**Tableau 8**  
**Taille des fragments de restriction des gènes *HTRA* et *Ure B*.**

Isolats	A	C	E	F	G	I	J	K	L	M	O	P	Q	R
Fragments(pb)														
0.980	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
0.598	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.564	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
0.533	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
0.441	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
0.408	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.350	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
0.317	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.310	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
0.288	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
0.267	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
0.249	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.243	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.237	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.231	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
0.190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
0.195	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
0.181	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
0.164	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
0.152	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.130	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.113	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
0.087	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

L'analyse de L'ADN total après digestion par les endonucléases de restriction (*Hind* III et *Bst*E II) appliquée sur les 14 souches de *Helicobacter pylori* montre 9 profils électrophorétiques différents entre eux et de tous les autres patients. Pour les patients I et J; ils présentent un profil sensiblement identique entre eux et différent des autres patients.

Les patients (K, L et M) ont un profil sensiblement identique entre eux et différents des autres. Les profils des souches de *Helicobacter pylori* isolées des patients O et P Q et R ils sont strictement identiques.



**Figure14**  
**Profil d'électrophorèse des fragments de restriction**  
**(*Hind* III et *Bst* E II) du chromosome total.**

### 3.4.1. Conclusion

L'analyse des fragments de restriction montre que tous les isolats présentent un fragment de 0,400 kb environ. Ce fragment est en effet couramment retrouvé dans le gène *HTRA* de souches de *Helicobacter pylori* d'origines diverses. Par contre, toutes les souches présentent également un fragment d'environ 0,150 kb qui est retrouvé uniquement dans notre série de souches de *Helicobacter pylori* et qui n'est habituellement pas retrouvé chez les autres souches de *Helicobacter pylori*.

QUATRIÈME PARTIE

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

## Conclusion et perspectives

Notre étude a débuté par la recherche de *Helicobacter pylori* à partir de biopsies antrales de patients présentant des pathologies gastroduodénales connues ou de patients présentant une symptomatologie révélatrice.

Cela nous a permis d'isoler et d'identifier 177 souches de *Helicobacter pylori*. Les souches que nous avons pu isoler révèlent des particularités régionales au niveau des caractères biochimiques avec présence de l'activité nitrate réductase chez 20% des souches isolées, cette activité est retrouvée chez les souches isolées de patients présentant essentiellement des ulcères gastriques (90%) ou bien chez quelques rares patients présentant une association gastrite antrale et l'ulcère bulbaire.

La culture apparaît dans notre étude avec une sensibilité et une spécificité de 100% sans faux positifs vu la particularité morphologique de ce germe. Cependant nous nous apercevons qu'il existe des cas où de nombreuses bactéries sont observées sur frottis alors que la culture ne donne aucune colonie; ceci est dû en premier lieu aux aléas du transport et à l'équipement du laboratoire. Nous avons en outre pu mettre en évidence que la détection de *Helicobacter pylori* est possible par PCR directement sur biopsies antrales en ciblant les gènes *UreB* et *HTRA*, cette méthode nous donne une spécificité et une sensibilité identique à celle de la culture. Cependant la PCR à l'avantage d'être rapide et ne nécessite pas de bactéries vivantes et peut se faire dans la demi-journée; sauf qu'elle reste coûteuse et n'est réalisée que dans quelques laboratoires spécialisés.

Quant au typage moléculaire, il révèle aussi des particularités intéressantes, à savoir la disparité régionale des souches de cette espèce bactérienne, mais ne nous renseigne pas sur le mode de dissémination de la bactérie. Cependant il ressort de notre étude que les souches étudiées possédant une particularité singulière qui est la présence du fragment de 0,150 kp. Ceci pourrait refléter la clonalité épidémique de *Helicobacter pylori*. Cependant l'identité des isolats révélés par le typage moléculaire et par l'analyse des profils de restriction de l'ADN total doit être interprétée avec prudence. Si l'identité des souches isolées des patients I et J est plausible puisqu'ils partagent les mêmes conditions de vie et cela depuis deux ans



dans le cadre du service national ; l'identité pour les autres patients (L et M, O et P, Q et R) est improbable. Ces derniers n'ont pas pu bénéficier d'une investigation épidémiologique complète. D'autres explications peuvent être envisagées en dehors de la possibilité d'évoquer une transmission à savoir matériel d'endoscopie insuffisamment décontaminé.

Pour répondre à de telles questions il nous faudra mener de manière prospective, une investigation complète sur les contacts entre les sujets.

L'étude du polymorphisme des souches de *Helicobacter pylori* que nous avons pu réaliser nous permettra de préciser la clonalité régionale présumées de nos souches et d'étudier les particularités de ce fragment de 0,150 kb, on pourra également poursuivre l'étude des autres caractères biochimiques en évaluant leurs expressions chez les différentes souches de *Helicobacter pylori* responsables des différentes pathologies gastroduodénales que nous n'avons pas cerner dans cette partie de notre étude à savoir lymphome et le cancer gastrique.

## Résumé

Nous avons recherché la présence de *Helicobacter pylori* chez 223 patients présentant des pathologies gastro-duodénales (ulcère gastrique et bulbaire ainsi que des lésions qui ont pour siège la muqueuse gastrique ou bulbaire) donnant un pourcentage supérieur à 82%.

La recherche de *Helicobacter pylori* dans les biopsies antrales nous a permis d'isoler 177 souches. La caractérisation biochimique a permis de révéler une particularité régionale: l'activité nitrate réductase chez 20% de souches isolées.

A partir de séquences d'ADN spécifique de *Helicobacter pylori* il nous a été possible de détecter ce dernier directement au niveau de biopsies antrales grâce à l'amplification en chaîne (PCR). La sensibilité, et la spécificité de cette technique se révèlent identiques à celle de la culture.

La comparaison moléculaire des isolats par leurs empreintes génomiques, en utilisant 2 méthodes: l'étude du polymorphisme des gènes *HTRA* et *Ure B* ainsi que l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction montre que nos souches présentent un fragment de 0,150 kb qui n'est pas retrouvé dans le gène *HTRA* des souches de *Helicobacter pylori* d'origines diverses. Cette particularité régionale pourrait refléter la clonalité épidémique de *Helicobacter pylori*.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Akopyants, N.S., Kersulyte et D. Berg, D.E.** 1995.  
Cag II a new multigene locus associated with virulence in *Helicobacter pylori*.  
*Gut*. **37**: A61.
- Béji, A. Mégraud, F., Vincent, P., Gavini, F., Izard, D et Leclerc, H.** 1987.  
A rapid chemical procedure for isolation and purification of chromosomal DNA from negative bacill.  
*Analytical biochemistry*. **162**: 18-23.
- Béji, A. Mégraud, F., Vincent, P., Gavini, F., Izard, D et Leclerc, H.** 1988.  
GC content of DNA of *Campylobacter pylori* and other species belong or related to the genus *Campylobacter*.  
*Ann. Ins. Pasteur/ Microbiol.* **139**. 527-534.
- Bigard, M.A et Colin, R.** 1996.  
Conférence de consensus, ulcère et gastrite à l'heure de *Helicobacter pylori*, pourquoi et comment?  
*Gastroenterol.Clin. Biol.* **20**: 51-54.
- Bliss, CH. JR., Keates, S., Linevsky, J.K. et Kelly, C.P.** 1995.  
*Helicobacter pylori* stimulates chemotactic cytokine release from human monocytes.  
*Gastroenterol.* **18**: A785.
- Bouché, O.** 1996.  
Faut-il éradiquer *Helicobacter pylori* chez un malade ayant une gastrite chronique?  
*Gastroentérol. Clin. Biol.* **20**. 143-153.
- Bretagne, J.** 1994.  
Quels sont les liens entre les lésions gastroduodénales observées sous AINS et *Helicobacter pylori*?  
*Gastrographie*. Numéro hors série: 32-33.
- Buckley, M.et O'Morain, C.** 1996.  
Quand faut-il éradiquer *Helicobacter pylori*?  
*Gastroenterol. Clin.Biol.* **20**: 95-102.
- Cayla, R.** 1996.  
Comment éradiquer *Helicobacter pylori*?  
*Gastroenterol.Clin. Biol.* **20**: 119-130.
- Cayla, R.** 1996.  
Eradication de *Helicobacter pylori*.  
*Hepatogastro.* **2**: 53-61.
- Cellini, L., Allocali, N., Angelluci, D., Lezzi, T., Dicampoli, E., Marzeio, L et Dainelli, B.** 1994.  
Coccioid *Helicobacter pylori* not culturable in vitro reverts in mice.  
*Microbiol. Immunol.* **38**: 843-850.

- Cellini, L., Allocali, N., Piattelli, A., Petrelli, I., Fanci, P. et Dainelli, B.** 1995.  
Microbiological evidence of *Helicobacter pylori* from dental plaque in dyspeptic patients.  
*Microbiologica*. **18**: 187-192.
- Cellini, L.** 1992.  
New plate medium for growth and detection of uréase activity of *Helicobacter pylori*.  
*Journal of clinical microbiology*. **5**: 1351-1353.
- Chamourad, P.** 1996.  
Place de l'infection de *Helicobacter pylori* dans les causes et les mécanismes de l'ulcère gastroduodénal et des gastrites chroniques.  
*Gastroentérol. Clin. Biol.* **20**: 103-110.
- Clayton, C.L., Kleanthous, H., Morgan, D.D., Puckley, L. et Tabaqchali, S.** 1993.  
Rapid fingerprinting of *Helicobacter pylori* by polymérase chain réaction and restriction fragment length polymorphism analysis.  
*J. Clin. Microbiol.* **31**: 1420-1425.
- De Korwin, J.D.** 1994.  
Comment expliquer que *Helicobacter pylori* puisse être à l'origine de différentes maladies gastro-duodénales?  
*Gastrographie*. Numéro hors série: 22-23.
- De Korwin, J.D.** 1994.  
Réponse immunitaire locale, cytokines et *Helicobacter pylori*.  
*la lettre de l'inféctiologue*. **4**: 14-19.
- De Mascarell, A et Merlio, J.P.** 1989.  
Mise en évidence histologique de *Campylobacter pylori*.  
*Gastroentérol. Clin. Biol.* **13**: 26-30.
- Delchier, J.CH.** 1994.  
Y a t'il d'autres méthodes que celles nécessitant une biopsie gastrique pour diagnostiquer la présence de *Helicobacter pylori*?  
*Diagnostic*. **2**: 36-41.
- Dorval, E J.** 1995.  
*Helicobacter pylori* dans la pathogénie de la maladie ulcéreuse et des gastrites.  
*Gastroentérol. Clin. Biol.* **20**: 23-52.
- Fauchère, J.L.** 1994.  
Quelle est la signification et quelles sont les conséquences de la réponse inflammatoire dans les lésions dues à l'infection par *Helicobacter pylori*? pourquoi les défenses de l'hôte ne peuvent-elles pas éliminer *Helicobacter pylori*?  
*Gastrographie*. Numéro hors série: 11.

- Ferrero, R.** 1995.  
Premier pas vers un vaccin contre *Helicobacter pylori*.  
*Hepatogastro.* **2**: 63-67.
- Ferrero, R.** 1996.  
Vaccination espoir pour la prévention et le traitement ?  
*Actualités innovatons- médecine.* Numéro hors série: 3.
- Fitzgerald, O. et Murphy, P.** 1995.  
Studies on physiological chemistry and clinical signifiacne of uréase and urea with special référence to the stomach.  
*Ir. J. Med. Sci.* **292**: 97-159.
- Fléjou, J.L.** 1989.  
Apport de l'anatomie pathologique à l'étude de *Campylobacter pylori*.  
*Gastroentérol. Clin. Biol.* **13**: 53-58.
- Fléjou, J.F.** 1994.  
Par quels mécanismes une infection à *Helicobacter pylori* peut-elle favoriser le développement d'un cancer gastrique?  
*Gastrographies.* Numéro hors série: 29-31.
- Fléjou, J.F.** 1995.  
Lymphome gastrique et infection à *Helicobacter pylori*.  
*La lettre de l'infectiologue.* **4**: 164-167.
- Fléjou, J.F.** 1996.  
Gastrite chronique et ulcère gastroduodénaux aspects anatomo-pathologiques, filiation et évolution.  
*Gastroentérol. Clin. Biol.* **20**: 9-13.
- Foliguet, B. Vicari, F. Guedenet, J.C. De korwin, J.D et Marchal, L.** 1989.  
Etude en microscopie électronique à balayage de *Campylobacter pylori* et des lésions gastroduodénales associées.  
*Gastroentérol. Clin. Biol.* **13**: 65-70.
- Graham, D.Y., Lew, G.M. et Lechago, J.** 1993.  
Antral G-cell and D-cell numbers in *Helicobacter pylori* infection, effect of *Helicobacter pylori* eradication.  
*Gastroenterol.* **104**: 1655-1660.
- Guerre, J.** 1996.  
Pathologie gastroduodénale et *Helicobacter pylori*.  
Compte rendu du 9<sup>ème</sup> congrés international du groupe européen d'études sur *Helicobacter pylori*. 1026-1028.
- Hachem, C.Y., Clarridge, J.E., Evans, D.G. et Graham, D.Y.** 1995.  
Comparaison of agar based média for primary isolation of *Helicobacter pylori*.  
*J. Clin. Pathol.* **48**: 714-716.

- Han, S.W., Flamm, R.H., Hachem, H.Y., Claridge, J.E., Evans, D.G., Beyer, J. et, Graham, D.Y. 1995  
Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates.  
*Eur. J. Clin Microbiol Infect Dis.* **14**: 349-352.
- Hatz, R.A., Kopp, R., Lehn, N., Seidl, G., Andrez, H.J., Bayerdoff, E. et Stalle Menders, G. 1995.  
Direct enhancement of gastric release by *Helicobacter pylori* water soluble proteine.  
*Gut.* **37**: A9.
- Hudziak, H. 1996.  
Traitement de l'ulcère gastrique.  
*Gastroentérol. Clin. Biol.* **20**: 136-163.
- Karita, M., Tummuru, M.K.R. et Blaser, M.J. 1995.  
Growth phase and pH - related regulation of cag A , cagC and urée A expression in *Helicobacter pylori*.  
*Gut.* **37**: 11.
- Kwipers, E.J. 1995.  
*Helicobacter pylori* et atrophie gastrique.  
*La lettre de l'infectiologue.* **4**: 159-163.
- Labigne, A. 1994 a.  
*Helicobacter pylori* et biologie moléculaire.  
*Gastroentérol. Clin. Biol.* **18**: 206-211.
- Labigne, A. 1994 b.  
Y-a t-il des souches de *Helicobacter pylori* ulcérogènes?  
*Gastrographie.* Numéro hors série: 24-25.
- Labigne, A. 1994 c.  
Existe t-il différentes souches pathogènes de *Helicobacter pylori*?  
*Gastrographie.* Numero hors série: 6-7.
- Labigne, A. 1995.  
Où en est le vaccin anti -*Helicobacter pylori*?  
*Gastrographie.* Numéro hors série: 50-51.
- Lamarque, J. 1995.  
Influence de *Helicobacter pylori* sur la physiologie gastrique.  
*Hepatogastro.* **2**: 35-38.
- Lamouliatte, H. 1989.  
Traitement des gastrites chroniques associés à *Campylobacter pylori*.  
*Gastroentérol. Clin. Biol.* **13**: 101-6B.

- Lamouliatte, H. Mégraud, F et Cayla, R. 1992.**  
*Helicobacter pylori* et pathologies gastroduodénale  
*Editions techniques, encyclo-Med. cheru (Paris-france) Gastroentérologie. 9021E: 1-12.*
- Lecterc, H. Béji, A et Vincent, P. 1989.**  
Marqueur moléculaires et identification des souches de *Campylobacter pylori*.  
*Gastroenterol. Clin. Biol. 13:44-48.*
- Lemaire, A. 1995.**  
Le diagnostic d'infection par *Helicobacter pylori* peut-il être fait par des méthodes non invasives?  
*Concours medical. 41: 3371-3375.*
- Li, C. Musich, R.R., Ferguson, D.JR., Patel, N.R., Chi, D.S et Thomas, E. 1995.**  
High prévalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstred by PCR.  
*Journal of clinical pathology. 48. 662-666.*
- Logan, R.P.H. 1994.**  
Test respiratoire marquée pour le dépistage de *Helicobacter pylori*.  
*La lettre de l'infectiologue. 4: 11-13.*
- Lozniewski, A. 1996.**  
Méthodes de diagnostics de l'infection à *Helicobacter pylori*.  
*Gastroentérol. Clin. Biol. 41: 11-118.*
- Marshall, B. 1994.**  
*Helicobacter* au pinacle.  
*Abstract. 36: 15-17.*
- Marshall, B. 1995.**  
*Helicobacter pylori*.  
*Quadrennal review of Helicobacter pylori for the world congress of gastroentérology. 1-6.*
- Matysiak, T. et Mégraud, F. 1996.**  
Facteurs pathogènes bactériens dans l'infection à *Helicobacter pylori*.  
*Hepatogastro. 2: 21-27.*
- Matysiak, T. et Mégraud, F. 1997.**  
Prise en charge de l'infection à *Helicobacter pylori* en pratique de ville.  
*Mise a jour du groupe d'étude français de Helicobacter pylori. 5: 5-56.*
- Mégraud, F. Trimoulet, P. Lamouliatte, H et Boyanova, L. 1991.**  
Bactericidal effect of amoxicillin on *Helicobacter pylori* in vitro model using épithélias cells.  
*Antimicrobial agents and chémoterapy. 35: 869-872.*



- Mégraud, F.** 1992 a.  
Méthodes diagnostiques pour *Helicobacter pylori*.  
*Le point en 1992*. Le groupe d'étude Français de *Helicobacter pylori*. 15-19.
- Mégraud, F.** 1992 b.  
Mise en évidence de *Helicobacter pylori* au niveau de biopsies gastriques par les méthodes bactériologique.  
*Revue Française des laboratoires* Tiré à part : 1-2
- Mégraud, F.** 1994 .  
Difficultés pratiques de l'éradication de *Helicobacter pylori* dans la maladie ulcéreuse duodénale.  
*Med et hyg.* **52**: 1813-1816.
- Mignon, M. et Popsai, D.** 1996.  
Rôle de la sécrétion acide dans la pathogénie de la maladie ulcéreuse duodénale.  
*Gastroentérol. Clin. Biol.* **20**: 14-24.
- Monteiro, L.** 1995.  
*Helicobacter pylori* facteurs pathogènes bactériens.  
*Hepatogastro.* **2**: 23-27.
- Mori, M., Suzuki, M., Muira, S. et Ishii, H.** 1995.  
Oxygen radical-scavenging enzymes in extract of *Helicobacter pylori*.  
*Gastroentérol.* **18**: A170.
- Mueller, H.J. et Hinton, J.** 1941  
A protein-free medium for primary isolation of *Gonococcus* and *Meningococcus*.  
*Proc. Soc. expt. Biol. Med.*
- Newell, D.G. et Stacey, A.** 1989.  
Antigens for the sérodiagnostics of *Campylobacter pylori* infections.  
*Gastroentérol. Clin. Biol.* **13**: 37-41.
- Ruszniewski, P.H.** 1994.  
Quelles sont les conséquences de l'infection à *Helicobacter pylori* sur la sécrétion gastrique acide?  
*Gastrographie*. Numéro hors série. p 27.
- Schaffer, E. et Sedeeof, R.** 1981  
Improved estimation of DNA fragment lengths from agarose gels.  
*Analytical. Biochemistry.* **115**: 113-122.
- Sobhani, i., Flouré, B., Lavergne, A., Colin, R., Mignon, M., Modigliani, R. et Rambaud, J.C.** 1991.  
*Helicobacter pylori* et pathologie gastroduodénale.  
*Gastroentérol. Clin. Biol.* **15**: 145-146.

- Souquet, J.C.** 1995.  
Diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori*.  
*Gastrohépato*.2: 17-22.
- Stewart Goodwin,C., Armstrong, A., Chilvers,T., Peters, M., David collin, M., Sly, L., Mc Connell, W. et Harpers, H.S.** 1989.  
Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen.nov. as *Helicobacter pylori* comb.nov. and *Helicobacter mustelae* comb.nov. respectively.  
*International journal of systematic bacteriology*. 397-405.
- Tanfer, E., Brandstatter, G. ,Dragosics, B., Hirschl, A.M., Nemeč, H., Schutz, K.M et Wurzer, H.** 1993.  
Effect of ranitidine and amoxicilline plus métronidazole on eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodénal ulcère.  
*The new england journal of medecine*. 4: 308-312.
- Tsai, C. et Chang, M.H.** 1995.  
Seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in children in taipei city.  
*Acta paediatrica sinica*. 36: 254-256.
- Vallot, T.** 1994.  
*Helicobacter pylori* et pathologie gastroduodénale.  
*Revue du praticien*. 7: 894-899.
- Vanderhulst, R.W.M., Josbert, J., Keller, A., Ramus, J. et Guido,N.J.T.** 1997.  
Traitement de l'infection à *Helicobacter pylori* revue de littérature mondiale.  
*Helicobacter*.1: 3-16.
- Vincent, P.** 1996.  
*Helicobacter pylori* et profil de restriction.  
*Bactériologie*,Lille.Numéro hors série: 1-9.
- Weeb, P.M.,Knight, T., Elder, J.B., Newel, D.G. et Forman, D.** 1997.  
*Helicobacter pylori* est-il transmis du chat à l'homme?  
*Helicobacter*.1: 22-24.
- Yousfi, M. M., Reddy, R.,Osato, M. et Graham, D.** 1997.  
Antre ou corps gastrique: quel est le meilleur site biopsique pour mettre en culture *Helicobacter pylori*?  
*Revue Helicobacter pylori* .2: 25-27.
- Zerbib, F.** 1994.  
Quels sont les liens entre infection à *Helicobacter pylori* et dyspepsie non ulcéreuse?  
*Gastrographie*.Numéro hors série: 32-33.