

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie



# THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

## DOCTORAT

Filière : Biologie

Spécialité : Biologie Moléculaire et Génomique

Par

**BACHIR MERYEM**

Thème :

---

**Prévalence et détection moléculaire de la résistance primaire  
d'*Helicobacter pylori* aux antibiotiques dans quelques régions  
d'Algérie.**

---

Soutenue le 13/06/2019 devant le jury composé de :

Sebahia Mohammed	Professeur	Université de Chlef	Président
Allem Rachida	Professeur	Université de Chlef	Rapporteur
Abbouni Bouziane	Professeur	Université de Sidi Bel Abbès	Examineur
Aoues Abedelkader	Professeur	Université d'Oran 1	Examineur
Sahraoui Tewfik	Professeur	Université d'Oran 2	Examineur
Setti Benali	professeur	Université de Chlef	Examineur

Année 2018/ 2019

## Remerciements

Au Professeur ALLEM Rachida, un grand merci

Pour votre disponibilité et votre patience.

Pour vos précieux conseils.

Pour la facilité avec laquelle vous avez su booster mon énergie.

Vous êtes une seconde maman pour moi.

Au Professeur AICHOUNI Ahmed,

Pour la disponibilité, l'écoute, le soutien et pour tous ce que vous avez fait  
pour moi et les doctorants.

Aux autres membres du comité de formation doctorale (Dr. SEBAIHIA,  
Prof. SAADI, Prof. SETTI) pour leur contribution à  
l'avancement de ce travail.

Aux membres de jury

Pour leur examen critique de ce travail.

Au Professeur DOUIDI Kara Turki.

Pour m'avoir autorisée d'entreprendre ce travail de thèse, malgré  
l'importance de la charge de travail.

Veillez accepter l'expression de ma gratitude et de mes plus sincères  
remerciements.

A l'ensemble du personnel des laboratoires dans lesquels ce travail a été  
effectué et plus particulièrement au Professeur Francis Mégraud qui m'a  
gentiment accueillie à Bordeaux et m'a fait sentir comme si j'étais chez moi.  
Aux très nombreux cliniciens et gastro-entérologues sans lesquels ce travail  
n'aurait pas pu être envisagé. Plus particulièrement Pr. BOUASRIA, Dr  
HALOUCHE, Dr. NAIMI et Dr DJEBAILI. Merci pour la précieuse  
collaboration.

A ma chère amie, l'ingénieur BENEJAT Lucie

et toute l'équipe INSERM Bordeaux.  
Pour le soutien et le précieux coup de pouce.  
Au Dr. MAHMOUDI Hacene pour ses précieux conseils et  
et sa disponibilité.

Je remercie mon mari et ma fille pour leur patience et le temps qu'il mon  
accorder pour finaliser ce travail.

Je dédie ce travail tout particulièrement à mon père et à ma mère qui  
étaient présents à chaque moment quand les portes se fermait devant moi,  
ils ont su les ouvrir et rendre l'impossible possible.

Aux nombreuses personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre  
à  
l'aboutissement de ce travail.

A mes très fidèles amis qui se reconnaîtront.

A ma famille et a ma belle famille (élargie)

Pour tout l'amour et le soutien indéfectible.

## ملخص

في الجزائر ، البيانات حول المقاومة الأولية للبكتيريا الملوية المعوية البوابية للمضادات الحيوية محدودة. كان الغرض من هذه الدراسة هو تقييم المقاومة الأولية للبكتيريا الملوية المعوية البوابية ضد المضادات الحيوية التالية ، الأموكسيسيلين ، سيبروفلوكساسين ، كلاريثروميسين ، ميترونيدازول ، التتراسيكلين وريفامبيسين وتحديد الآليات الجزيئية المعنية.

**الطريقة:** تطوع مائتين وسبعين بالغاً جزائرياً لم يتلقوا علاجاً لإبادة البكتيريا الملوية في هذه الدراسة. تم الحصول على النزعات البشرية من المعدة وتم إجراء اختبار الحساسية ضد المضادات الحيوية لجميع المضادات الحيوية. تم إجراء PCR في الوقت الحقيقي في جميع الحالات لتقييم مقاومة كلاريثروميسين والطفرات المعنية ، كما تم تقييم المقاومة الأولية لتيتراسيكلين والطفرات المعنية. تمت دراسة تسلسل منطقة QRDR من الجين *gyrA* ، منطقة RRDR من الجين *rpoB* و الجين *rdxA* للكشف عن الطفرات الجينية المشاركة في مقاومة سيبروفلوكساسين ، ريفامبيسين ومقاومة ميترونيدازول ، على التوالي. أجريت دراسة تعدد البكتيريا المقاومة على 10 مرضى مستعمرين بمجموعات متعددة من البكتيريا المعوية، تم فحص عشرون عزلة و تم الحصول عليها من كل مريض من أجل تقييم مقاومة المضادات الحيوية ، والكشف عن السلالة.

النتائج: لم يتم الكشف عن أي مقاومة للأموكسيسيلين وريفامبيسين. تم العثور على مقاومة كلاريثروميسين وسيبروفلوكساسين على التوالي في 29.7% و 17.9% من المرضى، وتم الكشف عن نسبة عالية من المقاومة للميترونيدازول (67.8%). وأظهرت نتائج PCR في الوقت الحقيقي أن طفرة A2143G كانت السبب الرئيسي في مقاومة كلاريثروميسين في كثير من الأحيان، لم يتم العثور طفرة A2142C وكان 42 مريضاً (14.5%) مصاباً بكل من الأنماط الوراثية للمقاومة. كانت هناك عزلتان فقط تحتويان على بكتيريا مقاومة للتيتراسيكلين ولديهما طفرة A926G. أربعة طفرات وجدت مسؤولة عن مقاومة سيبروفلوكساسين ((D91G (7,89%), N87I (18,42%), D91N (23,68%), N87K (44,73%). كشفت دراسة التسلسل العديد من الطفرات العشوائية المسؤولة عن مقاومة الميترونيدازول . أظهرت نتائج الدراسة الاستعمارية المتعددة أن المريض يمكن أن يصاب بأنواع مختلفة من البكتيريا الملوية في نفس الوقت.

الاستنتاج: البيانات المتعلقة بالمقاومة الأولية لـ البكتيريا الملوية البوابية للمضادات الحيوية ، والطفرات الجينية المسؤولة عن هذه المقاومة ودراسة نوع البكتيريا الذي يستعمر مريضاً ضرورية جداً لإنشاء استراتيجيات علاجية جديدة في الجزائر.

المفاتيح: البكتيريا الملوية المعوية البوابية، مقاومة المضادات الحيوية، الجين *gyrA* ، الجين *rpoB* و الجين *rdxA* .

## Résumé

En Algérie, les données sur l'antibiorésistance d'*H. pylori* sont limitées. Le but de cette étude était d'évaluer la résistance primaire d'*H. pylori* aux antibiotiques (amoxicilline, ciprofloxacine, clarithromycine, métronidazole, tétracycline et rifampicine) et de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués.

**Méthodes:** Deux cent soixante-dix cas n'ayant jamais reçu de traitement d'éradication ont été inclus dans cette étude. Des biopsies ont été obtenues pour la culture et un test de sensibilité aux antibiotiques a été réalisé par E-test pour tous les antibiotiques. Une amplification en temps réel a été également réalisée sur tous les cas pour évaluer la résistance à la clarithromycine et les mutations ponctuelles impliquées, ainsi que la résistance primaire à la tétracycline et les mutations impliquées. Le séquençage de la région QRDR du gène *gyrA*, la région RRDR du gène *rpoB* et du gène *rdxA* a été réalisé pour détecter les mutations impliquées respectivement dans la résistance à la ciprofloxacine, à la rifampicine et au métronidazole. Une étude d'Hétéro résistance a été réalisée sur 10 patients colonisés par des populations multiples d'*H. pylori*. Vingt isolats obtenus de chacun des patients ont subi un criblage de la résistance aux antibiotiques, une détection du gène *cagA* et du gène *vacA* et une étude de polymorphisme.

**Résultats:** Aucune résistance à l'amoxicilline et à la rifampicine n'a été détectée. La résistance à la clarithromycine et à la ciprofloxacine a été trouvée respectivement dans 29,7% et 17,9% des cas et un taux élevé de résistance au métronidazole (67,8%) a été détecté. Les résultats de l'amplification en temps réel ont montré que la mutation ponctuelle A2143G la plus fréquemment impliquée dans la résistance à la clarithromycine, la mutation ponctuelle A2142C n'a pas été trouvée. Quarante deux patients (14,5%) ont été infectés à la fois par des génotypes résistants et sensibles. Seuls deux isolats ont été résistants à la tétracycline et présentaient une mutation A926G. Quatre mutations sont responsables de la résistance à la ciprofloxacine (N87K (44,73%), D91N (23,68%), N87I (18,42%) et D91G (7,89%)). Le séquençage du *rdxA* a révélé de nombreuses mutations aléatoires. Les résultats de l'étude de colonisation multiple ont montré qu'un patient peut être infecté par différents types d'*H. pylori* en même temps.

**Conclusion:** Les résultats concernant la résistance primaire d'*H. pylori* aux antibiotiques, les principales mutations génétiques impliquées et l'étude du type de souche colonisant un patient sont nécessaires pour l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques en Algérie.

**Mots-clés:** *Helicobacter pylori*, résistance aux antibiotiques, gène 23S RNAr, QRDR du gène *gyrA*, gène 16S RNAr.

## Abstract

In Algeria, there are limited data regarding the pattern of *H. pylori* primary antibiotic resistance. The aim of this study was to evaluate the primary resistance of *H. pylori* to AMX, CIP, CLA, MTZ, TET and RIF and to determine the molecular mechanisms involved in the resistance.

**Methods:** Two hundred seventy Algerian adults who never received *H. pylori* treatment were enrolled in this study. Human biopsies were obtained for culture and antimicrobial susceptibility testing was performed by E-test for all antibiotics. Real-time FRET-PCR was also performed in all cases to assess primary CLA resistance and point mutations involved, real-time PCR was used to detect mutations involved in TET primary resistance, and sequencing of the QRDR of the *gyrA*, RRDR of *rpoB* and *rdxA* was performed to detect mutations involved in CIP, RIF and MTZ resistance, respectively. A study of multiple populations colonizing a patient and screening of the resistance to CLA, CIP, MTZ, *cagA*, *vacA*, *UreAB* polymorphism and RAPD profiles of 20 isolates from 10 patients each (200 isolates) were done.

**Results:** No resistance to AMX and RIF was detected. Resistance to CLA and CIP was found in 29.7% and 17.9%, respectively and a high rate of resistance to MTZ was detected. Results of real-time FRET-PCR, showed that A2143G was the most frequent point mutation involved in CLA resistance, A2142C was not found and 42 patients (14.5%) were infected by both resistant and susceptible genotypes. Only two isolates were resistant to TET and exhibited an A926G mutation. Four mutations were found to be responsible for resistance to CIP (N87K (44.73%), D91N (23.68%), N87I (18.42%) and D91G (7.89%)). The sequencing of *rdxA* revealed numerous and random mutations. Results of multiple colonization study demonstrated that a patient could be infected by different types of *H. pylori* in the same time.

**Conclusion:** Local data regarding the primary resistance of *H. pylori* to antibiotics, the main genetic mutations involved in the resistance and the study of the strain type colonizing a patient are necessary for a periodic evaluation of antibiotic consumption and new therapeutic strategies in Algeria.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, antibiotic resistance, 23S RNAr gene, QRDR *gyrA* gene, 16S RNAr gene, Algeria.

## Sommaire

Remerciements

Résumé

Liste des publications et communications

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Revue bibliographique</b> .....	4
<b>I. <i>Helicobacter Pylori</i></b> .....	4
I.1. Historique .....	4
I.2. Bactériologie.....	5
I.2.1. Taxonomie .....	5
I.2.2. Habitat.....	6
I.2.3. Morphologie.....	6
I.2.4. Croissance et caractères biochimiques.....	7
I.2.5. Génome.....	7
I.3. Le microbiote gastrique.....	11
I.3.1. Composition du microbiote gastrique.....	11
I.3.2. <i>H. pylori</i> et microbiote intestinal.....	12
<b>II. Physiopathologie et facteurs de virulence</b> .....	13
II.1. Manifestations cliniques.....	13
II.2. Physiopathologie de l'infection.....	14
II.2.1. Maladies ulcéreuses gastroduodénales.....	15
II.2.2. Dyspepsie non ulcéreuse.....	15
II.2.3. Cancers gastriques.....	16
II.2.4. Maladies extra gastriques.....	17

II.3. Epidémiologie.....	17
II.4. Les facteurs de virulence majeurs de <i>H. pylori</i> .....	18
II.4.1. Les facteurs de colonisation.....	18
II.4.2. Les facteurs de persistance.....	19
II.4.2. Les facteurs de pathogénicité.....	19
<b>III. Traitement d'une infection à <i>Helicobacter pylori</i> et résistance aux antibiotiques...</b>	<b>21</b>
III.1. Schémas thérapeutiques.....	21
III.1.1. Antibiotiques utilisés et mode d'action.....	22
III.1.1.1. Nitro-imidazolés.....	23
III.1.1.2. Macrolides.....	24
III.1.1.3. $\beta$ -lactamines.....	24
III.1.1.4. Tétracyclines.....	25
III.1.1.5. Autres antibactériens.....	25
III.1.2. Stratégies thérapeutiques.....	26
III.1.3. Facteurs d'échec d'éradication.....	28
III.2. La résistance aux antibiotiques .....	29
III.2.1. Prévalence de la résistance.....	30
III.2.2. Impact de l'antibiorésistance.....	31
III.2.3. Détection de l'antibiorésistance.....	32
III.2.3.1. Méthodes de détection phénotypiques .....	32
III.2.3.2. Méthodes de détection génotypiques.....	33
III.3. Mécanismes de l'antibiorésistance.....	35
III.3.1. Résistance aux imidazolés.....	36
III.3.2. Résistance aux macrolides.....	37
III.3.3. Résistance aux $\beta$ -lactamines .....	38
III.3.4. Résistance aux tétracyclines.....	39
III.3.5. Résistance aux rifampicines.....	40

III.3.6. Résistance aux fluoroquinolones.....	40
<b>IV. Matériel et méthodes.....</b>	<b>41</b>
IV.1. Cadre d'étude .....	41
IV.1.1. Durée d'étude.....	41
IV.1.2. But du travail et critères d'inclusion, de non inclusion et d'exclusion .....	41
IV.2. Etude de la prévalence de la résistance de <i>H. pylori</i> aux antibiotiques.....	42
IV.2.1. Prélèvement des biopsies.....	42
IV.2.2. Transport des biopsies.....	43
IV.2.3. Broyage des biopsies.....	43
IV.2.4. Isolement d' <i>H. pylori</i> .....	43
IV.2.5. Identification des isolats d' <i>H. pylori</i> .....	43
IV.2.5.1. Examen macroscopique.....	44
IV.2.5.2. Examen microscopique.....	44
IV.2.5.3. tests biochimiques.....	44
IV.2.6. Etude de la susceptibilité aux antibiotiques.....	44
IV.2.7. Extraction et purification de l'ADN génomique.....	45
IV.2.8. La détection moléculaire d' <i>H. pylori</i> .....	47
IV.2.9. La détection moléculaire des facteurs de virulence.....	50
IV.2.9.1. La détection du <i>cagA</i> .....	50
IV.2.9.2. La détection du <i>vacA</i> .....	50
IV.3. La détection moléculaire des mutations associées à la résistance aux antibiotiques.....	51
IV.3.1. Détermination de la présence d' <i>H. pylori</i> et les mutations associées à la résistance aux macrolides.....	51
IV.3.2. Détermination des mutations associées à la résistance à la tétracycline.....	54

IV.3.3.Détermination des mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones..	57
IV.3.4.Détermination des mutations associées à la résistance au métronidazole.....	59
IV.3.5.Détermination de la présence de mutations associées à la résistance à la rifampicine.	61
IV.4. Etude des populations multiples.....	63
IV.4.1.Criblage des populations sensibles et résistantes à la clarithromycine colonisant le même patient.....	63
IV.4.2. Amplification aléatoire d'AND polymorphe (RAPD-PCR) .....	64
IV.4.3. restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) .....	64
IV.5. Analyse statistique.....	65
<b>V. Résultats et discussion.....</b>	<b>66</b>
V.1. Etude de la prévalence de la résistance d' <i>H. pylori</i> aux antibiotiques.....	66
V.1.1. Caractéristiques des patients.....	66
V.1.2. Isolement d' <i>H. pylori</i> .....	68
V.1.3. Identification des isolats d' <i>H. pylori</i> .....	69
V.1.3.1. Examen macroscopique. ....	69
V.1.3.2. Examen microscopique.....	70
V.1.4. Etude de la susceptibilité aux antibiotiques.....	73
V.1.4.1. Résistance aux antibiotiques et sexe.....	77
V.1.4.2. Résistance aux antibiotiques et âge.....	78
V.1.4.3. Résistance aux antibiotiques et pathologies.....	79
V.1.4.4. Résistance aux antibiotiques et provenance des patients.....	80
V.1.5. La détection moléculaire d' <i>H. pylori</i> .....	81
V.1.6. La détection moléculaire des facteurs de virulence .....	83

V.1.6.1. La détection du <i>cagA</i> .....	83
V.1.6.2. La détection du <i>vacA</i> .....	84
V.1.6.3. La combinaison des génotypes <i>cagA</i> et <i>vacA</i> .....	85
V.1.6.4. La relation entre la résistance aux antibiotiques et la présence des facteurs de virulence étudiés.....	86
V.2. La détection moléculaire des mutations associées à la résistance aux antibiotiques.....	88
V.2.1. Détermination de la présence d' <i>H. pylori</i> et les mutations associées à la résistance aux macrolides.....	88
V.2.2. Détermination des mutations associées à la résistance à la tétracycline.....	92
V.2.3. Détermination des mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones.....	94
V.2.4. Détermination des mutations associées à la résistance au métronidazole.....	97
V.2.5. Détermination des mutations associées à la résistance à la rifampicine.....	99
V.3. Etude des populations multiples.....	100
V.3.1. Criblage des populations sensibles et résistantes à la clarithromycine colonisant le même patient.....	100
V.3.1.1. Hétéro- résistance.....	104
V.3.1.2. Hétéro-résistance, quasi-espèce et infection mixte.....	108
V.3.1.3. Traitement et variabilités d' <i>H. pylori</i> .....	115
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	116

## **Références bibliographiques**

### **Publications**

### **Annexes**

## Liste de publications et communications

Ce travail a fait l'objet de plusieurs publications et communications.

### Les publications :

1 /- Molecular detection of mutations involved in *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Algeria.

Auteurs : **Bachir M, Allem R, Benejat L, Tifrit A, Medjekane M, Drici AE, Megraud F, Doudi KT.**

Revue : Journal of Antimicrobial Chemotherapy . 2018 Aug 1;73(8):2034-2038.

2/- Primary antibiotic resistance and its relationship with *cagA* and *vacA* genes in *Helicobacter pylori* isolates from Algerian patients.

Auteurs : **Bachir M, Allem R, Tifrit A, Medjekane M, Drici AE, Diaf M, Doudi KT.**

Revue: Brazilian Journal of Microbiology. 2018 Jul - Sep; 49(3):544-551.

### Les communications:

1/- Détection moléculaire des mutations génomiques associées à la résistance de *Helicobacter pylori* aux antibiotiques en Algérie.

Auteurs: Bachir M, Allem R, Benejat L, Tifrit A, Medjekane M, Drici AE, Megraud F et Doudi KT.  
Congrès annuel du GEFH, Janvier 2018, Tours (France).

2/- Resistance to antibiotics and its relationship with *cagA* and *vacA* genes in *Helicobacter pylori* isolates from Algerian patients.

Auteurs: Bachir M., Allem R., Tifrit A.

The second international workshop management and genetic improvement of plant and microbial resources, 19 to 21 March 2017, Tlemcen (algeria).

## Liste des abréviations

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMX	Amoxicilline
ARN	Acide ribonucléique
4-1BB	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9
BabA	Blood group antigen-binding adhesin
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra-large
cagA	Cytotoxin Associated Gene A
cag-PAI	Complexe de pathogénicité cag (cag PAthogenicity Island)
C	Cytosine
CIP	Ciprofloxacine
CLA	Clarithromycine
CLSI	The Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
dNTP	Désoxyribonucléotide tri phosphate
dupA	duodenal ulcer promoting gene A
EUCAST	The european commetti on antimicrobial susceptibility testing
FLU	Fluoroquinolone
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	Guanine
IL	Interleukine
IPP	Inhibiteurs de la Pompe à Proton
Lex	Les antigènes sanguins du groupe Lewis x
Ley	Les antigènes sanguins du groupe Lewis y
LPS	Lipopolysaccharide
MALT	Tissu lymphoïde associé aux muqueuses (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue)
MTZ	Métronidazole
MLS	Macrolides, Lincosamides et Streptogramines
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
PBP	Proteines Liant les Penicillines (Penicillins Binding Proteins)

PCR Amplification en chaîne par la polymérase (Polymerase Chain Reaction)  
PLP Protéine liant la pénicilline  
QRDR Quinolone Resistance Determining Region  
RDN Nodulation-division d'efflux  
R-M Restriction-modification  
RUT Test Rapide à l'uréase (Rapid Urease Testing)  
RRDR Rifampicine Resistance Determining Region  
SabA Sialic acid-binding adhesin  
T Thymine  
TET Tétracycline  
TNF Tumor necrosis factor  
TRAF1 Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1  
VacA Cytotoxine vacuolisante A (Vacuolating Cytotoxin Agent A)

## Liste des figures

Figures	pages
<b>Figure01.</b> <i>Helicobacter pylori</i> sous microscope électronique.....	7
<b>Figure02.</b> Schéma thérapeutique.....	25
<b>Figure 03:</b> Principe de la FRET-PCR en temps réel.....	52
<b>Figure 04:</b> Génotypes FRET-PCR (résistance à la clarithromycine).....	52
<b>Figure 05:</b> Observation sous microscope photonique d'un frottis après coloration de Gram. A gauche frottis jeune de 48h et à droite un frottis de 72h.....	70
<b>Figure 06 :</b> Recherche de l'uréase, positive après quelques minutes seulement, en utilisant le milieu urée-indole .....	72
<b>Figure07.</b> Fréquences des isolats résistants aux antibiotiques.....	73
<b>Figure 08.</b> Le taux de la résistance aux antibiotiques en fonction du sexe des patients.....	77
<b>Figure 09.</b> Le taux de la résistance aux antibiotiques en fonction de l'âge des patients.....	78
<b>Figure 10.</b> Le taux de la résistance aux antibiotiques en fonction des pathologies.....	79
<b>Figure 11.</b> Le taux de la résistance aux antibiotiques en fonction De la provenance.....	80
<b>Figure 12.</b> profile électro phorétique de la PCR du gène <i>glmM</i> .....	81
<b>Figure 13.</b> Profile électro phorétique du gène <i>ARNr 16S</i> .....	82
<b>Figure 14.</b> profile électro phorétique de la PCR du gène <i>cagA</i> .....	83
<b>Figure 15.</b> La detection des alleles <i>vacA</i> par PCR.....	84
<b>Figure16.</b> Fréquences des combinaisons des génotypes <i>VacA</i> et <i>CagA</i> .....	85
<b>Figure17.</b> Prevalence de l'antibio-résistance chez le isolats <i>vacA</i> positifs et <i>vacA</i> négatifs...86	
<b>Figure18.</b> Prevalence de l'antibio-résistant chez les isoltas <i>cagA</i> positifs et <i>cagA</i> négatifs...87	
<b>Figure 19.</b> Courbes de fusion de la PCR en temps réel pour détecter les mutations associées à la résistance à la CLA.....	89

<b>Figure 20.</b> Courbes de fusion de la PCR en temps réel pour détecter les mutations associées à la résistance à la CLA.....	90
<b>Figure 21.</b> Courbes de fusion de la PCR en temps réel pour détecter les mutations associées à la résistance à la CLA dans le cas de doubles populations.....	91
<b>Figure 22.</b> Courbes de fusion de 16S-AGA-Sensor et 16S-TTC-Sensor de la PCR en temps réel pour détecter les mutations associées à la résistance à la tétracycline.....	93
<b>Figure 23.</b> Alignement multiple de la séquence 880-999 de l'ARNr 16S.....	93
<b>Figure 24.</b> Alignement multiple d'une partie de la séquence protéique du gène <i>gyrA</i> .....	95
<b>Figure 25.</b> Alignement multiple de séquences RdxA des isolats résistants avec différentes mutations.....	97
<b>Figure 26.</b> Alignement multiple de séquences RdxA des isolats résistants avec un arrêt prématuré de la traduction de la séquence protéique.....	98
<b>Figure 27.</b> Alignement multiple des séquences RRDR.....	99
<b>Figure 28.</b> Courbes de fusion de la PCR en temps réel pour détecter les mutations associées à la résistance à la CLA chez les isolats après criblage des doubles populations.....	105
<b>Figure 29.</b> Alignement multiple des séquences peptidiques codées par le gène <i>rdxA</i> des isolats sensibles et résistants à la CLA du Patient 01.....	107
<b>Figure 30.</b> La detection des alleles <i>vacA</i> par PCR avant criblage.....	109
<b>Figure 31.</b> La détection des allèles <i>vacA</i> par PCR après criblage des populations issues du patient 01.....	109
<b>Figure 32:</b> La détection du <i>cagA</i> par PCR après criblage de populations issues du patient 01, isolats résistants à la CLA.....	110
<b>Figure 33:</b> La détection du <i>cagA</i> par PCR après criblage de populations issues du patient 01.....	110
<b>Figure 34.</b> Profile RAPD amorce1254 des isolats sensibles et résistants isolés du Patient 09 (tout les autres critères sont similaires, CLA-R/S, 3types RAPD).....	111

**Figure 35:** Profile RAPD amorce1254 des isolats sensibles et résistants isolés du patient01 (RAPD TYPE1, CLA-R/S, MTZ-R/S, FLU-S, vacA s1m1, cagA+).....112

**Figure 36:** Profile RAPD amorce 1281 des isolats sensibles et résistants isolés du patient 01(RAPD TYPE1, CLA-R/S, MTZ-R/S, FLU-S, vacA s1m1, cagA).....112

## Liste des tableaux

Tableaux	pages
<b>Tableau 01</b> : Les différentes dilutions et les valeurs seuil pour chaque antibiotique testé, selon L'EUCAST.....	45
<b>Tableau 02</b> : Caractéristiques des PCR classique effectuées pour l'identification de <i>H. pylori</i> et ses facteurs de virulence. ....	48
<b>Tableau 03</b> : Réactifs utilisés dans la PCR pour la détection du gène <i>ARNr 16S</i> pour l'identification d' <i>H. pylori</i> . ....	49
<b>Tableau 04</b> : Réactifs utilisés dans la PCR pour la détection du gène <i>glmM</i> pour l'identification d' <i>H. pylori</i> . ....	49
<b>Tableau 05</b> : Réactifs utilisés dans la PCR pour la détection du gène <i>cagA</i> .....	50
<b>Tableau 06</b> : Réactifs utilisés dans la PCR pour la détection du gène <i>vacA</i> .....	51
<b>Tableau 07</b> : Réactifs utilisés dans la FRET-PCR en temps réel pour la détection des résistances aux macrolides. ....	53
<b>Tableau 08</b> : Réactifs utilisés dans la FRET-PCR en temps réel pour la détection des résistances aux TET.....	55
<b>Tableau 09</b> : Réactifs utilisés dans la réaction d'amplification d'une séquence de 120pb du gène <i>ARNr 16S</i> .....	56
<b>Tableau 10</b> : Réactifs utilisés dans la réaction d'amplification de la région QRDR du gène <i>gyrA</i> . ....	58
<b>Tableau 11</b> : Réactifs utilisés dans la réaction d'amplification de du gène <i>rdxA</i> .....	60
<b>Tableau 12</b> : Réactifs utilisés dans la réaction d'amplification de du gène <i>rpoB</i> .....	62
<b>Tableau 13</b> . Distribution des patients selon les symptômes cliniques.....	66
<b>Tableau 14</b> . Distribution des patients selon les résultats de l'endoscopie et les hôpitaux....	67

<b>Tableau 16.</b> Mutations du <i>ARNr 23S</i> associées à la résistance à la CLA.....	92
<b>Tableau 17.</b> Les mutations dans la region QRDR du gène <i>gyrA</i> des isolats résistants.....	96
<b>Tableau18.</b> Nombre d'isolats et CMI correspondante à chaque isolat par patient après criblage des doubles populations.....	101
<b>Tableau 19.</b> Résultats de la sensibilité aux antibiotiques et génotypage des isolats issu du criblage des doubles populations de chaque patient.....	104
<b>Tableau 20.</b> Génotypes présent chez chaque patient étudiés.....	113

# *Introduction*

# Introduction

---

## Introduction

Une éventuelle implication bactérienne dans les pathologies gastriques n'avait jamais été envisagée avant les années 80. Seul le rôle de l'hyperacidité gastrique liée au stress et à d'autres facteurs environnementaux et génétiques était pris en considération. La découverte d'*Helicobacter pylori* dans l'estomac par Marshal et Warren en 1982, a changé toutes les données sur les désordres gastroduodénaux.

Cette bactérie infecte approximativement la moitié de la population mondiale et est un important facteur de risque pour le développement de gastrites chroniques, d'ulcères peptiques, de carcinomes gastriques et de lymphomes du tissu associé à la muqueuse lymphoïde (MALT). Heureusement, la plupart des pathologies associées à *H.pylori* peuvent être prévenues ou guéries par l'éradication de cette dernière (Malfertheiner *et al.*, 2017).

Les Instituts Nationaux de Santé aux Etats Unis et les conférences des Consensus Maastricht en Europe, recommandent l'éradication d'*H. pylori* pour le traitement ou la prévention des pathologies gastriques (Graham et Fischbach, 2010 ; Malfertheiner *et al.*, 2012). En Algérie, l'éradication d'*H. pylori* est recommandée par une triple thérapie contenant l'amoxicilline (AMX), la clarithromycine (CLA) ou le métronidazole (MTZ) combinés par un inhibiteur de la pompe à proton (PPI) pour 7 à 10 jours (Boudjella *et al.*, 2013).

Ce traitement n'est efficace qu'avec 85% des patients pour plusieurs raisons. Incluant l'absence d'observance thérapeutique, la prescription d'un traitement impropre, la pénétration de la bactérie dans le mucus, l'acidité élevée de l'estomac, les polymorphismes génétiques (IL-1B et CYP2C19), la malabsorption de l'antimicrobien ou sa dilution, la formation de biofilm sont impliqués. Cependant, la plus importante raison est la résistance aux antibiotiques (Graham et Dore, 2016; Malfertheiner *et al.*, 2017).

Ces dernières années, la résistance aux antibiotiques ne cesse d'augmenter, elle touche principalement la clarithromycine, le métronidazole, les fluoroquinolones et à un moindre degré les autres antibiotiques (De Francesco *et al.*, 2017).

La plus part des personnes infectées sont asymptomatiques, mais 15-20% d'individus *H. pylori*- positifs vont développer une pathologie associée à la présence de la bactérie. Le développement de différentes pathologies tels que l'ulcère peptique, le cancer gastrique ou le

## Introduction

---

lymphome de MALT dépend considérablement des caractéristiques du microorganisme, la génétique de l'hôte et les facteurs environnementaux (Erzin *et al.*, 2006).

*H. pylori* exprime des facteurs de virulence qui augmentent le risque des manifestations cliniques. Les résultats de plusieurs études suggèrent que le taux d'éradication chez les patients atteints de gastrite est plus faible que chez les patients atteints d'ulcère peptique (Van Doorn *et al.*, 2000). Depuis que la résistance aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique, des recherches ont été conduites pour trouver une éventuelle relation entre la résistance et la présence des facteurs génétiques de virulence comme le gène associé à la cytotoxine A (*cagA*) et le gène de la cytotoxine vacuolisante A (*vacA*) (Ryan *et al.*, 2001 ; Agudo *et al.*, 2010).

*H. pylori* peut acquérir une résistance vis-à-vis d'un antibiotique par le biais de mutations chromosomiques verticalement transmissibles (Mégraud *et al.*, 2015 ; De Francesco *et al.*, 2017). Les mutations ponctuelles, en positions 2142 et 2143 du gène de l'ARNr 23S, ont été démontrées à l'origine de modification de la conformation du ribosome, conduisant à une réduction de l'affinité de la clarithromycine à ce dernier causant une résistance (Mégraud et Lehours, 2007 ; Cambau *et al.*, 2009).

D'autre part, la résistance aux quinolones est due à des mutations ponctuelles dans le gène codant pour l'enzyme ADN-gyrase (Mégraud et Lehours, 2007 ; De Francesco *et al.*, 2017). Les mutations les plus fréquentes touchent les codons 87 et 91 dans une région spécifique du gène *gyrA*, nommée Quinolone Resistance-Determining Region (QRDR) (Tankovic *et al.*, 2003 ; Mégraud et Lehours, 2007 ; De Francesco *et al.*, 2017). La résistance d'*H. pylori* aux t estetracycline très rare, elle est due à des mutations du gène *16S ARNr*, ce qui affect la liaison de l'aminoacyl-ARNt (Gerrits *et al.*, 2002 ; De Francesco *et al.*, 2017).

Le mécanisme moléculaire associé à la résistance au métronidazole est plus complexe, cet antibiotique nécessite une activation par des enzymes réductases intracellulaires. Ce processus est très répandu chez les bactéries anaérobies, mais le mécanisme qui semble le plus impliqué, est la survenu de mutations diverses et aléatoires dans le gène *rdxA*, codant pour une enzyme insensible à l'oxygène NADPH nitroréductase (De Francesco *et al.*, 2017).

Après la publication du consensus Maastricht V, concernant le management de l'infection à *H. pylori* et son traitement chez l'adulte (Fallone *et al.*, 2016 ; Malfertheiner *et al.*, 2017), la stratégie thérapeutique envisagée en Algérie est mise en question. Le traitement doit être

## Introduction

---

amélioré pour atteindre un taux d'éradication de 90%. Il est très difficile d'adapter un traitement anti-*H.pylori* à un patient en ignorant les caractéristiques de la souche qu'il porte.

En tenant compte des difficultés rencontrées pour isoler *H. pylori* et pouvoir évaluer sa sensibilité aux antibiotiques, il est préférable de trouver d'autres techniques spécifiques et plus rapides. En parallèle, les méthodes moléculaires sont devenues des techniques de choix pour détecter la présence des bactéries et déterminer leur résistance aux antibiotiques avec une très haute sensibilité (Medina *et al.*, 2010).

La résistance d'*H. pylori* aux antibiotiques en Algérie, est mal documentée. La pratique d'un antibiogramme pour évaluer la sensibilité d'*H. pylori* aux antibiotiques est rare malgré les échecs thérapeutiques successifs. Ces raisons nous ont poussés à réaliser une prévalence de la résistance primaire d'*H. pylori* aux antibiotiques. Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse est de contribuer à l'amélioration de la prise en charge des infections à *H. pylori*, les objectifs spécifiques étant :

- Prévalence de l'infection à *H. pylori* en Algérie ;
- Evaluation de la prévalence de la résistance d'*H. pylori* chez des patients symptomatiques habitants Alger, Chlef, Oran et Sidi belabbes;
- Détermination d'une relation possible entre les facteurs de virulence exprimés par les isolats et la résistance aux différents antibiotiques;
- Détermination des mécanismes moléculaires associés à chaque résistance;
- Etude de l'hétéro-résistance, la présence de quasi-espèce, l'infection mixte chez le même hôte et la détermination de l'implication possible d'un génotype précis dans la résistance aux antibiotiques.

# *Revue bibliographique*

## **I. *Helicobacter pylori***

### **I.1. Historique**

Bien que la présence d'une bactérie dans l'estomac n'ait été découverte que depuis environ 37 ans, les premiers rapports parlants d'un micro-organisme spiralé au niveau de la muqueuse gastrique ont été publiés depuis plus de cent cinquante ans mais ces résultats n'ont été pris au sérieux qu'à la fin des années soixante dix, suite aux travaux du pathologiste Australien John Robin Warren.

En réalité, l'histoire remonte jusqu'à 1892, où Giulio Bizzozero, jeune chercheur italien, avait observé des images en forme de « bactéries spiralées » au niveau du tractus gastro-intestinal des chiens (Bizzozero, 1892). Trois ans plus tard, Salomon confirma cette observation au niveau de la muqueuse stomacale de chats et de chiens (Salomon, 1896). En 1899, par une observation semblable au niveau du liquide de lavage gastrique humain par un polonais Walery Jaworski (Jaworski, 1899).

La première observation de bactéries spiralées au niveau même de la muqueuse gastrique humaine remonte à 1905 et est attribuée à Krienitz (Kreinitz, 1905); elle fut confirmée par d'autres chercheurs dans les années 40 (Doenges, 1938). En plus, l'équipe de Freedberg a démontré la présence de ces bactéries dans de prélèvements chirurgicaux frais, faisant ainsi penser à de réels agents pathogènes (Freedberg, 1940).

Ces études n'étaient pas soutenues par la communauté scientifique. Elles tombèrent en désuétude suite à la publication du chercheur américain Palmer qui stipulait, en 1954, qu'il n'avait pas pu isoler la bactérie dans des prélèvements de biopsies gastriques de 1180 personnes (Palmer, 1954). A ce stade, l'acidité provoquerait alors des lésions des muqueuses, conformément à la citation de Schwarz en 1910: « pas d'acide, pas d'ulcère » (Schwarz, 1910).

L'activité uréasique au niveau de l'estomac a été décrite pour la première fois en 1924 (Luck et Seth, 1924). En 1950, deux irlandais démontrent que chez les patients présentant un ulcère gastroduodéal, l'uréase neutralise l'acidité gastrique via la production d'ammoniac. Malgré le fait qu'on ait noté la disparition de cette activité enzymatique avec un traitement antibiotique, le lien entre l'activité uréasique et des bactéries n'a pu être mis en évidence qu'en 1984 (Langenberg et *al.*, 1984).

# Revue bibliographique

---

C'est ainsi qu'en 1975, ayant également observé des bactéries au niveau de l'épithélium gastrique, Steer a essayé de les isoler et s'est malheureusement retrouvé avec une culture pure de *Pseudomonas aeruginosa*, contaminant probable (Steer, 1975). En 1979, la bactérie fut redécouverte par deux chercheurs australiens Barry Marshall et Robin Warren de l'hôpital « Royal de Perth ». La publication de leur recherche fut d'abord refusée en 1983 par la société Australienne de Gastro-entérologie, mais ensuite acceptée lors du deuxième Congrès international sur les infections à *Campylobacter* organisée à Bruxelles, la même année.

Le 14 avril 1982, ces mêmes chercheurs parvinrent enfin, après de nombreuses tentatives avortées pour cause d'incubation trop courte, à cultiver la bactérie spiralée à partir d'une biopsie gastrique d'un patient souffrant d'ulcère duodéal. Ils la baptisèrent initialement *Campylobacter-like organisme* (CLO) car ils pensaient que c'était une nouvelle espèce du genre *Campylobacter* (Marshall *et al.*, 1988).

Après le séquençage de l'ADN codon pour la sous unité 16S de l'ARNr et vu les caractéristiques morphologiques et structurelles différentes montrant que cette bactérie n'appartenait pas au genre *Campylobacter*, elle a été transférée vers un nouveau genre « *Helicobacter* » (Marshall et Goodwin, 1987 ; Goodwin *et al.*, 1989).

Marshall procéda à une ingestion d'une solution concentrée de bactérie pour prouver les effets sur son propre estomac et la disparition des symptômes par administration d'un traitement incluant un antibiotique (tinidazole) et des sels de Bismuth, satisfaisant ainsi à 3 des 4 postulats de Koch, pour convaincre la communauté médicale (Marshall *et al.*, 1988), découverte couronnée en décembre 2005 par l'attribution du Prix Nobel de Médecine et de Physiologie. En 1994, *H. pylori* a été classée parmi les agents carcinogènes de classe I par l'Organisation Mondiale de la Santé. Il s'agit de la première bactérie carcinogène reconnue chez l'homme. Et depuis, pleins de travaux ce font pour étudier cette bactérie et son implication dans la carcinogénèse.

## **I.2.Bactériologie**

### **I.2.1.Taxonomie**

*H. pylori* est une bactérie de forme hélicoïdale découverte dans une zone de l'estomac proche du pylore, d'où son nom. Actuellement, elle est classée dans le règne des *Bacteria*, la division *Proteobacteria*, la classe *Epsilonproteobacteria*, l'ordre des *Campylobacterales*, la

famille *Helicobacteraceae*, le genre *Helicobacter* et l'espèce *Helicobacter pylori* (Garrity et al., 2005).

Le genre *Helicobacter* est hétérogène, il comprend au moins 26 espèces officiellement nommées, et encore d'autres espèces en cours d'étude (Reshetnyak et al., 2017). Ces espèces très proches ont été trouvées avec au moins 93% de séquences communes. Le groupe le plus intéressant est celui qui comprend les *Helicobacters* gastriques parmi lesquelles trois seulement infectent l'homme : *H.pylori*, *H.heilmanii* et *H.felis* (Garrity et al., 2005 ; Reshetnyak et al., 2017).

### **I.2.2.Habitat**

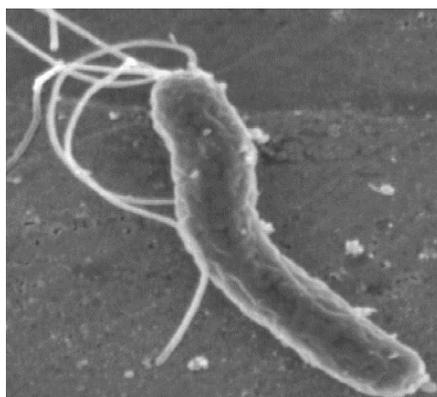
La couche muqueuse de l'épithélium gastrique, en particulier la muqueuse antrale constitue le principal habitat d'*H. pylori*. Par contre, des souches d'*H. pylori* ont été identifiées dans le sang, dans la cavité buccale (salive et plaque dentaire) et dans les selles (Reshetnyak et al., 2017).

Par ailleurs, *H. pylori* a été découverte chez des singes rhésus, le cochon, le babouin et le chat. Il s'agit toutefois de découverte sujette à de nombreuses controverses. Aucune source environnementale (eau, sol...) n'a été identifiée à ce jour (Garrity et al., 2005).

### **I.2.3.Morphologie**

*H. pylori* est un bacille à Gram négatif spiralé non sporulé. Il mesure 0,5 à 1µm de largeur sur 2,5 à 5 µm de longueur (Goodwin et al., 1989 ; Hatakeyama, 2017 ; Reshetnyak et al., 2017). Il est très mobile grâce à la présence de 4 à 7 flagelles gainés, résistibles à l'acide en ciliature lophotriche, qui lui permettent de se mouvoir dans le suc gastrique (Hazell et al., 1991). La forme hélicoïdale lui permet de s'incruster dans la paroi stomacale par des mouvements hydrodynamiques (Reshetnyak et al., 2017).

Après l'isolement de la bactérie en culture *in vitro*, la morphologie peut varier entre une forme bacillaire, en U, en C, en O ou même des formes cocoïdes non viables lorsque les cultures sont vieilles, le milieu est pauvre ou dans d'autres conditions défavorables (Mégraud, 2010 ; Reshetnyak et al., 2017).



**Figure 01.** *Helicobacter pylori* sous microscope électronique (Thomson, 2008)

### **I.2.4. Croissance et caractères biochimiques**

*H. pylori* est une bactérie micro-aérophile avec un optimum de croissance à 37°C. En effet, la bactérie est sensible à l'oxygène et requiert pour vivre une atmosphère appauvrie en oxygène de 3 à 6% (optimum de l'ordre de 5%) et une concentration en CO<sub>2</sub> de 6 à 10% (Goodwin et al., 1989 ; Mégraud, 2010 ; Chmiela et al., 2017 ; Reshetnyak et al., 2017).

*H. pylori* tire son énergie de certains acides aminés, ou certains intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques : glutamate, aspartate, serine. Cette énergie n'est jamais fournie par les hydrates de carbone (Goodwin et al., 1989).

Elle possède une catalase, une oxydase et une superoxyde dismutase (Pecsi et Pickett, 1994). La bactérie synthétise également une  $\gamma$  glutamyl transférase, une leucine aminopeptidase et une phosphatase alcaline (Mégraud, 2010). Son activité enzymatique la plus caractéristique est celle jouée par l'uréase qui lui permet de résister à l'acidité gastrique, en créant un environnement alcalin par l'hydrolyse de l'urée (Mégraud, 2010). L'uréase est une métallo-enzyme sécrétée en quantité abondante par toutes les souches; elle représente 6 à 10% des protéines exprimées par *H. pylori*. Les mutants non uréolytiques sont incapables de coloniser la muqueuse gastrique (Abdi, 2017).

#### **I.2.4.1. Génome**

*H. pylori* compte parmi les espèces bactériennes présentant le plus grand polymorphisme génétique (Taylor et al., 1992; Jiang et al., 1996; Furuta, 2015). Cette diversité génétique permet à *H. pylori* d'adapter son génotype à celui de son hôte (Israel et al., 2001; Giannakis et al., 2008 ; Furuta, 2015) et est probablement à l'origine de la variabilité de son pouvoir pathogène.

## Revue bibliographique

---

La comparaison du génome des souches séquencées a mis en évidence l'exceptionnelle diversité de cette bactérie. Contrairement au monomorphisme phénotypique observé, *H. pylori* est l'une des bactéries pathogènes montrant d'importantes variations génétiques entre les souches, ce particulièrement concernant le polymorphisme au niveau de gènes spécifiques (microdiversité) et même une divergence dans l'organisation des gènes (présence ou absence d'un gène : macrodiversité) (Salama et al., 2000; Gressmann et al., 2005; Suerbaum et Josenhans, 2007 ; Dong et al., 2009). La variation génétique entre les différentes souches d'*H. pylori* est en fonction des régions géographiques (Falush et al., 2003; Linz et al., 2007).

*H. pylori* possède un génome composé d'un seul chromosome circulaire relativement petit, compris entre 1.58 Mb et 1.67 Mb, ce qui reflète probablement la forte adaptation de la bactérie à sa niche écologique unique (Mcclain et al., 2009; Thiberge et al., 2010). Le contenu en GC (Guanine + Cytosine) de toutes ces souches est en moyenne de 39%. Néanmoins les génomes séquencés présentent des régions ayant des contenus en GC% différents. L'une de ces régions correspond à l'îlot de pathogénicité dénommé *cag* dont le contenu en GC est de 35%. La souche B38 est dépourvue de cet îlot (macrodiversité) (Thiberge et al., 2010).

D'après Thiberge et al. (2010), le génome d'*H. pylori* se caractérise par sa richesse inhabituelle en des systèmes de restriction-modification (R-M) et des régions homopolymériques, des répétitions de dinucléotides, des séquences répétées sur des régions étendues distribuées régulièrement le long de l'ADN chromosomique, un contenu plasmidique variable et de multiples copies de séquences d'insertion.

### **I.2.4.1.1. Microdiversité**

La grande variabilité génétique de *H. pylori* a été mise en évidence très tôt par les techniques d'électrophorèse en champ pulsé, de RAPD, d'empreintes génomiques et par l'établissement des cartes de restrictions génétiques (Taylor et al., 1992; Jiang et al., 1996; Kansau et al., 1996; Akopyants et al., 1998). Rapidement, l'analyse du polymorphisme génétique des gènes de ménage est devenue la méthode de référence.

Dès 1996, Kansau et ces collègues montraient que la séquence nucléotidique d'un fragment de 294 paires de base interne au gène *glmM* était unique à chaque souche étudiée et pouvait être utilisée comme marqueur moléculaire (Kansau et al. 1996). L'analyse de 7 gènes de ménage a montré que la recombinaison est si fréquente que pratiquement tous les isolats sont assignés à un nouveau sequence type (ST) (Falush et al. 2001).

Cette exceptionnelle microdiversité a été confirmée par la comparaison des séquences génomiques et elle est principalement due à :

### **A. Populations génétiques modernes**

Malgré son exceptionnelle diversité génétique, *H. pylori* possède une forte structure phyléogéographique (Falush et al., 2003; Linz et al., 2007). L'analyse du polymorphisme génétique de 7 gènes de ménage (*atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI*, *yphC*) chez 769 souches de *H. pylori* isolées de patients originaires de 51 groupes géographiques, ethniques et linguistiques différents a permis d'assigner les souches à 6 groupes génétiques différents : hpEurope, hpAfrica1 (subdivisé en hspSAfrica, hspWAfrica), hpAfrica2, hpEastAsia (subdivisé en hspAmerind, hspEAsia, hspMaori), hpAsia2 et hpNEAfrica.

La structure phyléogéographique de *H. pylori* reflète l'histoire des grandes migrations humaines.

### **B. Populations génétiques ancestrales**

L'analyse des polymorphismes génétiques des 7 gènes de ménage par le modèle « linkage » du logiciel STRUCTURE montre que les populations génétiques dérivent de 6 populations ancestrales : ancestral Europe1 (AE1), ancestral Europe2 (AE2), ancestral EastAsia, ancestral Africa1, ancestral Africa2 et ancestral Sahul (Falush et al., 2003; Linz et al., 2007 ; Linz et al., 2014).

### **C. Coévolution entre l'homme et la bactérie**

La plus grande diversité génétique est observée pour les souches africaines. En particulier, certains peuples xhosas d'Afrique du Sud sont porteurs de souches très différenciées qui, à ce jour, n'ont été observées nulle part ailleurs (hpAfrica 2). La diversité génétique de *H. pylori* décroît de façon presque linéaire lorsque la distance géographique à l'Afrique s'accroît. Cette caractéristique est partagée par la diversité génétique humaine et reflète une coévolution entre l'homme et la bactérie (Linz et al., 2007 ; Linz et al., 2014).

### **D. Changements génétiques pendant l'infection chronique**

*H. pylori* est une des espèces bactériennes présentant un des plus hauts taux de recombinaison (Vos et Didelot, 2009). Il a été estimé par ces mêmes auteurs que 50 % du génome était renouvelé par recombinaison pendant une période comprise entre 40 et 2000

ans. A titre de comparaison, 10 à 100 millions d'années sont nécessaires pour remplacer 60 % du génome d'*E. coli* (Falush et al., 2001 ; Kennemann et al., 2011).

### **I.2.4.1.2. Macrodiversité**

#### **A. Organisation génomique : synthèse**

La comparaison des différentes séquences génomiques a révélé que les gènes sont organisés de façon similaire dans les souches de *H. pylori*: seules 10 régions du génome de la souche J99 de taille comprise entre 1 et 83 Kb sont transposées ou inversées par rapport au génome de la souche 26695 (Alm et al., 1999).

#### **B. "Core" génomique et pan-génome**

Une analyse génomique à l'aide de puces à ADN a comparé la distribution des gènes identifiés dans le génome des souches 26695 et J99 dans le génome de 15 souches de *H. pylori* d'origine caucasienne. Parmi les 1643 gènes analysés, 1281 (78 %) gènes (appelés gènes ubiquistes) étaient présents dans les 15 souches et formaient le « core » génome de l'espèce (Salama et al., 2000). Ce nombre est légèrement plus élevé que dans l'étude publiée par Gressman et al. qui a extrapolé la taille du «core» génomique à 1111 gènes (Gressmann et al., 2005). Selon les différentes études publiées, 20 à 25 % des gènes étaient « souches-spécifiques » ou « non-ubiquistes » avec des variations qualitatives de leur composition (Salama et al., 2000; Gressmann et al., 2005; Han et al., 2007; Romo-Gonzalez et al., 2009). Ces différences peuvent s'expliquer par la différence des conditions de l'expérimentation. Seul le séquençage complet du génome de multiples souches représentatives de la diversité génétique de *H. pylori* permettra de définir précisément le « core » génome et le pan-génome. Une analyse de sept génomes totalement séquencés a identifié 1275 gènes toujours présents (Thiberge et al., 2010).

#### **D. Contenu génétique et pathologie gastro-duodénale**

La plupart des études de génomique comparative ont recherché sans succès une association entre le contenu génétique des souches et la pathologie gastro-duodénale associée. Récemment, une association a été mise en évidence avec des souches associées à un lymphome du MALT (Thiberge et al., 2010). La méthodologie a été la suivante : i) une étude préliminaire a comparé le génome de 24 souches de *H. pylori* d'origines géographiques variées (Afrique, Asie, Europe) à l'aide de membranes d'hybridation à haute densité contenant l'ensemble des gènes de la souche 26695 ; ii) 120 isolats de patients vivant en

France et présentant des pathologies variées ont été analysées à l'aide de ces membranes: 33 étaient associées à une gastrite chronique, 27 à un ulcère duodéal, 17 à une métaplasie intestinale et 43 à un lymphome du MALT.

### **C. Changements génétiques pendant l'infection chronique**

La première étude à avoir investigué les changements génétiques au cours d'une infection chronique est celle réalisée par Israël en 2001 (Israël et *al.*, 2001). A partir d'isolats du même patient porteur de la souche J99 prélevés à six ans d'intervalle, les contenus génétiques des plus récents isolats ont été comparés à celui de la souche J99, dont le génome a été totalement séquencé (Alm et *al.*, 1999). Ils ont montré que de nombreux changements sont apparus au cours de la colonisation, en particulier dans des régions hautement spécifiques du génome, le *cag* PAI et la PZ.

### **D. Mécanisme générant la diversité génétique**

*Helicobacter pylori* est l'une des espèces génétiquement les plus diverses du monde bactérien. Des variations génétiques chez un microorganisme indiquent une sélection constante dans un environnement dynamique. Elles permettent à *H. pylori* de s'adapter à un nouvel hôte après sa transmission, de coloniser l'ensemble de l'estomac et de s'adapter aux conditions changeantes de l'estomac au cours du temps afin notamment d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

D'après Dorer et *al.* (2009), les mécanismes de diversification incluent des mutations ponctuelles, de glissement des brins d'ADN et des recombinaisons intragénomiques. Les changements alléliques impliquent des mutations non silencieuses, des gènes mosaïques dus à des recombinaisons intragénomiques mais la variation de phase est due au glissement des brins d'ADN.

## **I.3. Le microbiote gastrique**

### **I.3.1. Composition du microbiote gastrique**

Le microbiote gastrique fut l'objet de plusieurs études ces dernières années, principalement à cause du dogme selon lequel, qu'en raison de sa production d'acide, l'estomac est un organe stérile, inhospitalier pour les bactéries. En outre, le reflux des acides biliaires dans l'estomac, l'épaisseur de la couche de mucus et l'efficacité du péristaltisme gastrique pourraient aussi empêcher la colonisation bactérienne de l'estomac. De plus, le

nitrate contenu dans la salive et la nourriture est converti par les lactobacilles, dans la bouche en nitrite qui, une fois dans l'estomac, est transformé par le suc gastrique en oxyde nitrique, un puissant agent antimicrobien.

Tous ces facteurs, ainsi que les difficultés techniques dans la collecte d'échantillons pour l'analyse, et l'absence de tests de diagnostic simples et fiables ont entravé l'étude du microbiote gastrique (Yang I *et al.*, 2013 ; Wu *et al.*, 2014).

La découverte de *Campylobacter pyloridis* par Robin Warren et Barry Marshall en 1982 a détruit le dogme de l'estomac stérile. En 2013, Engstrand et Lindberg, ont enquêté sur le microbiote gastrique de 13 sujets sains par pyroséquençage, et ont identifié 200 phylotypes et cinq genres dominant (*Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Rothia*, *Pasturellaceae*). Bien que ces études aient porté sur des populations différentes (africaines, américaines, hispaniques, chinoises et européennes), le microbiote gastrique était étonnamment semblable dans tous les cas, tant au niveau des embranchements qu'au niveau des genres.

### **I.3.2. *Helicobacter pylori* et le microbiote gastrique**

Des études sur des modèles animaux montrent que, à long terme, l'infection à *H. pylori* affecte la composition bactérienne du microbiote gastrique (Nardone et Compare, 2015). En effet, une abondance d'Eubacterium, des espèces du genre *Prevotella* et une diminution des espèces de *Bifidobacterium coccoides* et *Clostridium leptum* ont été trouvées chez des sujets *H. pylori* négatifs (Osaki *et al.*, 2012).

Des études menées chez des patients sans infection à *H. pylori* révèlent qu'il existe un manque relatif des embranchements *Proteobacteria* et *Bacteroidetes*, et une abondance relative des genres *Streptococcus*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* et *Stomatococcus* (Li *et al.*, 2009 ; Petra *et al.*, 2017). Chez des patients *H. pylori* positifs, par rapport aux sujets *H. pylori* négatifs, Maldonado-Contreras *et al.* (2011), rapportent une plus grande abondance de *Proteobacteria*, spirochètes et *Acidobacteria*; et une diminution de l'abondance des Actinobactéries, *Bacteroidetes* et Firmicutes.

Les changements dans la microflore de l'estomac induits par *H. pylori* peuvent être attribués à divers facteurs. A long terme, l'infection à *H. pylori* conduit à l'atrophie gastrique, et par conséquent à une diminution du pH gastrique, ce qui permet la colonisation de l'estomac par des bactéries. En outre, l'ammoniaque et le bicarbonate produit par *H. pylori* à partir de l'urée peuvent servir de substrats pour d'autres bactéries. Il est probable que *H. pylori*

crée des créneaux particuliers qui permettent la survie et la colonisation de bactéries présentes dans l'estomac (Maldonado-Contreras et *al.*, 2011).

En dépit de ces conclusions, la relation entre *H. pylori* et le microbiote gastrique est encore controversée. En effet, Tan et *al.*, (2007) rapportent que l'infection chronique à *H. pylori* ne modifie pas significativement le microbiote de l'estomac murin. Très récemment, Khosravi et *al.*, (2014) ont confirmé ces observations sur un échantillon important de sujets, comprenant 131 *H. pylori*-positifs et 84 *H. pylori*-négatifs. Il est probable que des facteurs tels que l'inflammation liée à la quantité d'*H. pylori* présente, le moment de l'infection, la présence, le type et l'extension des lésions précancéreuses doivent être pris en compte, lorsque l'on aborde la composition du microbiote gastrique.

## **II. physiopathologie et facteurs de virulence**

### **II.1. Manifestations cliniques de l'infection à *H. pylori***

*H. pylori* colonise l'estomac d'environ 50 % de la population mondiale avec une répartition hétérogène : soit 90% de la population des pays en voie de développement, et seulement 20 à 30 % de la population des pays développés. La plus faible prévalence des infections à cette bactérie dans les pays développés est probablement due à des facteurs tels que l'amélioration des conditions d'hygiène et l'augmentation de la prise d'antibiotiques durant l'enfance (Pellicano et *al.*, 2016).

*H. pylori*, armé de son pouvoir colonisateur et de ses facteurs de virulence, entraîne l'apparition de gastrites qui peuvent être chroniques et asymptomatiques ou évoluer vers différentes pathologies : 1) soit une hypersécrétion acide gastrique confine *H. pylori* dans l'antra, la gastrite est alors antrale et peut évoluer vers l'ulcère duodéal ; 2) soit une hyposécrétion acide permet l'expansion de la colonisation par *H. pylori* vers le corps de l'estomac, on parle alors de pangastrite qui peut évoluer soit vers l'ulcère gastrique, soit vers le lymphome gastrique du MALT (mucosa associated lymphoid tissue), soit vers un adénocarcinome gastrique (Chaput et Gomperts Boneca, 2006 ; Pellicano et *al.*, 2016).

Il faut toutefois des années, voire des décennies, avant l'apparition de symptômes. Le cancer gastrique apparaît chez 1 à 3% des individus infectés ce qui a amené l'Organisation mondiale de la santé (OMS) à déclarer *H. pylori* comme un agent carcinogène de classe I en 1994. Ainsi, *H. pylori* est responsable des infections chroniques les plus répandues dans le monde (Correa et *al.*, 1990).

## Revue bibliographique

---

En effet *H. pylori* est l'une des causes majeures de la maladie ulcéreuse peptique gastrique et des gastrites chroniques (Antos *et al.*, 2005). La connaissance de son rôle dans la genèse d'un processus inflammatoire gastrique a permis de l'incriminer dans le développement de certaines pathologies gastroduodénales (Delchier, 2008). Son éradication par des antibiotiques est d'un apport fondamental pour la prévention de la survenue de l'adénocarcinome gastrique et pour la guérison de la majorité des ulcères gastroduodénaux (Malfertheiner *et al.*, 2017).

### II.2. Physiopathologie de l'infection à *H. pylori*

*H. pylori* colonise spécifiquement la muqueuse gastrique et peut y survivre, en raison de sa puissante activité uréasique qui neutralise l'acidité de l'estomac. La lésion élémentaire est constamment une gastrite, le plus souvent asymptomatique, potentiellement évolutive. Cette gastrite, transitoirement aiguë, puis chronique, détermine l'expression de la maladie en fonction de sa sévérité et de sa distribution dans l'estomac (Pellicano *et al.*, 2016).

La gastrite chronique modifie la physiologie gastrique, principalement les sécrétions acides. L'évolution est ensuite variable et incomplètement élucidée. Dans 10 % des cas, la gastrite chronique peut évoluer vers une maladie ulcéreuse gastroduodénale ou des néoplasies gastriques (Pellicano *et al.*, 2016). La présence de l'infection à *H. pylori* à la surface de la muqueuse entraîne d'une part un afflux de polynucléaires neutrophiles au niveau de l'épithélium, et d'autre part une réaction inflammatoire du chorion sous la forme d'une augmentation de la population lymphoplasmocytaire (Delchier, 2008).

L'importance de l'afflux de polynucléaires permet de déterminer l'activité de la gastrite et celle de l'infiltration lymphoplasmocytaire liée à la gastrite. Au cours du temps apparaissent des signes d'atrophie qui sont plus ou moins associés à une métaplasie intestinale, c'est-à-dire au remplacement des cellules épithéliales gastriques par des cellules de type intestinal. Plus tard, apparaissent chez certains patients des signes de dysplasie, voire un cancer gastrique (Delchier, 2008). Ces anomalies peuvent être vues le plus souvent au niveau de l'antrum gastrique qui est le site privilégié de l'infection à *H. pylori* mais, chez de nombreux patients, elle peut également être vue au niveau du fundus ou au corps gastrique.

L'évaluation histologique des biopsies gastriques (au mieux 2 biopsies fundiques, 2 biopsies antrales et une biopsie de l'angle de la petite courbure) permet de déterminer

## Revue bibliographique

---

l'intensité et la topographie de la gastrite selon un score conforme à la classification de Sidney (Dixon, 1996), qui est actuellement la classification internationale des gastrites.

La topographie de la gastrite est étroitement corrélée avec les maladies induites par l'infection à *H. pylori*. Ainsi, une topographie purement antrale est associée à l'ulcère duodéal alors qu'une topographie pangastrique, ou prédominante sur le fundus gastrique, est associée à l'ulcère gastrique et au cancer gastrique (Delchier, 2008). Ainsi, en cas d'infection purement antrale, l'inflammation induite entraîne une hypergastrinémie avec pour conséquence une augmentation de la production d'acide par le fundus qui est le siège des cellules pariétales. A l'inverse, en cas d'infection prédominante sur le fundus ou pangastrique, l'inflammation présente au niveau du fundus a pour conséquence, du fait de la production d'interleukines 1, une hypochlorhydrie qui est le marqueur de l'ulcère gastrique et du cancer (Delchier, 2008).

### II.2.1. Maladie ulcéreuse gastroduodénale

*H. pylori* est responsable de 70 % des ulcères gastriques et de 90 % des ulcères duodénaux. L'éradication de la bactérie permet la cicatrisation de l'ulcère duodéal et prévient la récurrence des ulcères gastriques et duodénaux (Megraud, 2010). La maladie ulcéreuse gastroduodénale a cependant diminué dans des proportions très importantes, parallèlement à la diminution de la prévalence de l'infection à *H. pylori* (Pellicano et al., 2016).

La particularité de ces dernières années est le diagnostic d'ulcères gastroduodénaux apparemment *H. pylori* négatifs chez des malades n'ayant pas pris d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). La raison principale semble être le masquage de l'infection à *H. pylori* par la prise d'antisécrétoires. Ces médicaments ont en effet la propriété de négativer les tests de diagnostics (excepté la sérologie) en cas de prise récente (< 15 jours) ou concomitante au test (Genta et Puztaszeri, 2006). Il est donc primordial d'arrêter les antisécrétoires au moins deux semaines avant la recherche d'*H. pylori*.

### II.2.2. Dyspepsie non ulcéreuse

Dans cette maladie fréquente au cadre nosologique imprécis, différents essais thérapeutiques ont montré une guérison dans 10 % des cas par l'éradication d'*H. pylori* (Moayyedi, 2005). Ce chiffre est peut-être sous-estimé. Il est en effet compréhensible qu'une infection présente depuis plusieurs décennies induise des modifications histologiques de la

muqueuse gastrique qui ne disparaissent pas en quelques semaines ou moins (Megraud, 2010).

### **II.2.3. Cancers gastriques**

#### **II.2.3.1. Lymphome gastrique du MALT**

Cette maladie très rare est le seul exemple de cancer qui peut être guéri par l'éradication de la bactérie. *H. pylori* induit la prolifération d'un tissu lymphoïde normalement absent au niveau de la muqueuse gastrique (MALT). Chez certains sujets, sans que l'on ait pu encore identifier des facteurs génétiques et environnementaux spécifiques, un lymphome se développe. La présence de souches particulières d'*H. pylori* pourrait être en cause (Lehours et al., 2004 ; Pellicano et al., 2016).

A l'état normal, la muqueuse gastrique est quasiment dépourvue de lymphoplasmocytes. L'infection à *H. pylori* a pour conséquence un afflux de lymphoplasmocytes de type B qui ont les caractéristiques des lymphoplasmocytes normalement présents au niveau de la plaque de Peyer. La particularité de ces lymphocytes est de posséder une protéine d'adhésion qui va assurer leur « *homing* » au niveau de la muqueuse digestive (Delchier, 2008).

La stimulation inflammatoire secondaire à l'infection à *H. pylori* peut aboutir à la formation de follicules lymphoïdes réactionnels. Lorsque ces follicules lymphoïdes réactionnels sont nombreux, un aspect micronodulaire de la muqueuse gastrique peut être observé en endoscopie (Delchier, 2008).

#### **II.2.3.2. Carcinome gastrique**

Des modifications histologiques de la muqueuse apparaissent au fil des décennies, décrites sous le nom de cascade de Correa et se terminent par une transformation maligne des cellules épithéliales (Correa et al., 1990). Des facteurs génétiques liés à l'hôte (polymorphisme des cytokines) et environnementaux (régime riche en protéines et en sel, pauvre en vitamines) ont été mis en cause. Des facteurs liés à la virulence de la bactérie comme l'oncoprotéine CagA, ont également été impliqués (Ohnishi, 2008). Ainsi, dans les populations à haut risque, l'éradication d'*H. pylori* peut prévenir l'évolution vers des lésions cancéreuses (Pellicano et al., 2016).

### II.2.3.2. Maladies extradigestives

Plusieurs maladies sont maintenant rattachées à l'infection *H. pylori*, des affections auto-immunes comme le purpura thrombopénique idiopathique ont vu leurs symptômes régresser après éradication d'*H. pylori*, de même pour certaines anémies ferriprives inexplicables (Korwin, 2008 ; Megraud, 2010). On note également les affections suivantes : les maladies dermatologiques, cariovasculaires, bronchopulmonaires... (Korwin, 2008). D'après les recommandations européennes « Maastricht III », les conclusions de la réunion « *Maastricht III Consensus Report* », qui s'est tenue en 2005, ont concerné pour la première fois des recommandations de recherche et d'éradication de *H. pylori* dans les affections extradigestives (Malfertheiner *et al.*, 2007 ; Pellicano *et al.*, 2016).

### II.3. Epidémiologie de l'infection à *H. pylori*

Il est bien admis que l'infection à *H. pylori* est en règle générale acquise très tôt dans l'enfance et perdure toute la vie du sujet en l'absence de traitement d'éradication (Megraud, 2010). Une constante observée dans tous les pays occidentaux est la diminution de la prévalence de l'infection à *H. pylori* au fil des générations.

Bien qu'il n'y ait pas eu récemment de grandes études de prévalence organisées, les études ponctuelles menées indiquent que cette infection est devenue exceptionnelle chez les jeunes à l'âge de 20 ans (< 5 %) alors qu'elle est encore de l'ordre de 40 % chez les plus âgés (> 70 ans). Cette évolution, qui indique que les enfants de notre époque sont beaucoup moins souvent infectés que leurs homologues nés avant et pendant la seconde guerre mondiale, s'explique essentiellement par l'amélioration des conditions socioéconomiques. En termes concrets, une amélioration du niveau socioéconomique signifie : moins de promiscuité dans la famille (logement plus grand, fratrie plus réduite), plus de facilités d'hygiène (adduction d'eau, toilettes), plus d'éducation (Megraud, 2010 ; Chmiela *et al.*, 2017).

On considère en effet que la transmission de cette infection est strictement interhumaine, le plus souvent intrafamiliale (Dominici *et al.*, 1999), et survient le plus souvent par voie oro (gastro)-orale ou fécale-orale (Megraud, 2010). Le risque maximum semble survenir lorsqu'un membre de la famille souffre d'une gastroentérite. En effet, d'une part le temps de transit digestif est diminué permettant la survie de *H. pylori* après son passage intestinal, à l'opposé de ce qui existe dans les conditions normales, et d'autre part la survenue de

vomissements permet une exposition des membres de la famille à des *H. pylori* abondants et viables (Perry *et al.*, 2006 ; Chmiela *et al.*, 2017).

Dans les pays moins favorisés, la prévalence de l'infection est encore très élevée, c'est le cas des principaux pays d'Afrique du Nord, d'Afrique noire et la Turquie, et ceci concerne les enfants comme les adultes. Si l'on peut s'attendre à la présence de la même souche bactérienne au sein d'une famille de génération en génération, ce concept semble moins vrai dans les pays à forte prévalence, sans doute du fait de la multiplication des expositions (Raymond *et al.*, 2008 ; Pellicano *et al.*, 2016).

### **II.4. Les facteurs de virulence majeurs d'*H. pylori***

*H. pylori* colonise généralement l'hôte pour la vie sauf si un traitement spécifique soit administré. *H. pylori* a co-évolué avec les humains pendant au moins 58.000 an, et il existe des types de souches qui prédominent dans certaines régions du monde en corrélation avec les grandes migrations de l'homme (Linz *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2012).

La plupart des personnes infectées ne développent pas de maladie parente, ce qui a conduit à l'hypothèse très controversée que certaines souches de *H. pylori* sont inoffensives voire bénéfiques (Mishra, 2013). Cependant, la liste des maladies potentiellement causées ou aggravées par *H. pylori* n'a cessé de croître au cours des dernières années, ce qui rend prématuré la conclusion que toute souche soit commensale. Plusieurs propriétés uniques contribuent à la persistance de *H. pylori*.

#### **II.4.1. Facteurs de colonisation**

Tous les isolats cliniques d'*H. pylori* expriment l'uréase. L'uréase convertit l'urée en ammoniac ainsi qu'en dioxyde de carbone et entraîne l'élévation du pH de la zone environnante (Backert et Clyne, 2011).

La mobilité d'*H. pylori* est un facteur indispensable à la colonisation de la muqueuse gastrique. La morphologie spiralée et la présence de flagelles permettent, après ingestion de la bactérie, d'abrégier son séjour dans le suc gastrique, de pénétrer dans la couche de mucus et de s'y mouvoir. La machinerie flagellaire est fonctionnelle grâce à l'expression d'une quarantaine de gènes (flgE, flbA, flgR, flaA, flaB...) (Tomb *et al.*, 1997).

Une autre caractéristique intéressante de la membrane est le lipopolysaccharide (LPS) relativement peu toxique trouvé chez *H. pylori*, qui peut contribuer à sa persistance en

limitant la réponse inflammatoire de l'hôte. A la différence du LPS provenant d'autres bactéries, le LPS d'*H. pylori* est reconnu par les TLR-2 et non les TLR-4. Dans certaines souches, des chaînes latérales sur le LPS O miment les antigènes sanguins du groupe Lewis Lex et Ley (Backert et Clyne, 2011).

### II.4.2.Facteurs de persistance

En dépit d'une réponse humorale et spécifique de l'hôte dirigée contre *H. pylori* dès les premières étapes de l'infection, la bactérie est capable de persister et de se maintenir durant des dizaines d'années. Pour se faire, *H. pylori* dispose de nombreux moyens pour résister au stress oxydatif généré par les macrophages, notamment la superoxyde dismutase (produit du gène *sodB*) qui décompose les ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (Pesci et al., 1994).

La catalase (produit du gène *kataA*) qui dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (Hazell et al., 1991) et une famille d'enzymes dénommées peroxyrédoxines dont la plus connue est l'alkylhydroperoxyde réductase (produit du gène *ahpC*) (Wang et al., 2005).

### II.4.3.Facteurs de pathogénicité

De nombreux facteurs de virulence bactériens sont impliqués dans le processus d'inflammation et de dégâts tissulaires qui peuvent résulter d'une infection à *H. pylori*.

#### II.4.3.1. Cytotoxin associated gene pathogenicity island (cag-PAI)

Codé par un gène A dit associé à la cytotoxine (*cagA*), CagA est le facteur de virulence le plus important et le mieux étudié; cependant, il ne fonctionne pas isolément. Les souches CagA positives d'*H. pylori* sont associées à une inflammation plus développée et un risque accru d'ulcère et de cancer chez les humains et les animaux en expérience (Kim et al., 2011 ; Hatakeyama, 2017). Le gène *cagA* fait partie d'un îlot de pathogénicité qui code également pour les composants d'un appareil de sécrétion de type IV (TSS4). L'appareil de sécrétion est une structure semblable à une seringue que l'on pensait avoir peu d'importance en dehors de sa capacité à injecter CagA (Chmiela et al., 2017 ; Hatakeyama, 2017).

Il est important de noter que la présence de CagA coïncide généralement avec la présence d'autres facteurs de virulence, dont VacA, BabA et OipA (Yamaoka, 2010). Ainsi, la pathogénie d'*H. pylori* est multifactorielle et ne peut se résumer à un gène. CagA est

## Revue bibliographique

---

responsable des altérations de nombreux systèmes de signalisation cellulaire, qui influencent profondément la physiologie de la cellule hôte.

Quand *H. pylori* est en contact avec les cellules hôtes, la protéine CagA est directement injectée dans le cytoplasme de la cellule hôte où elle est phosphorylée et se lie au domaine SHP2 de l'hôte (Higashi *et al.*, 2002). SHP-2 est une phosphatase impliquée dans la transduction du signal pour le récepteur tyrosine kinase (Bourzac et Guillemin, 2005). Des mutations dans le domaine SHP-2 sont présentes dans certaines tumeurs humaines, et fournissent un lien mécanistique entre l'activité CagA et le développement de la tumeur (Bourzac et Guillemin, 2005).

### II.4.3.2. Vacuolating toxin A (VacA)

La toxine vacuolisante (VacA) a été dénommée pour sa capacité à induire de nombreuses vacuoles de grande taille dans les cellules en culture. A la différence de CagA, VacA forme une structure d'auto transporteur et se sécrète elle-même sans la nécessité d'un contact avec la cellule hôte. Les protéines VacA s'oligomérisent pour former des structures semblables à des pores. VacA se transporte au récepteur tyrosine phosphatase (RPTP $\alpha$  et RPTP $\beta$ ) et d'autres protéines transmembranaires glycosylées sur la surface de la cellule hôte (Sewald *et al.*, 2008 ; Chmiela *et al.*, 2017). VacA pénètre ensuite par endocytose et forme des canaux d'anions sélectifs dans la membrane des vacuoles. Les canaux permettent l'accumulation d'anions chlorure et de bases faibles, ce qui entraîne un gonflement osmotique (Cover et Blaser, 2009).

Toutes les souches d'*H. pylori* contiennent des gènes *vacA*, mais toutes les souches ne produisent pas une protéine VacA fonctionnelle. Ceci est dû à des polymorphismes dans le gène *VacA*, en particulier à l'extrémité amino-terminale (région s), au milieu du gène (région m), et dans la région intermédiaire (région i). Le polymorphisme s2 donne une toxine inactive (Kim et Blanke, 2012 ; McClain *et al.*, 2017 ). Ainsi, les souches avec l'allèle s2 sont souvent appelés "VacA négative". Les souches hébergeant l'allèle s1m1 ont été le plus souvent associées aux ulcères et au cancer gastrique, mais il semble maintenant que l'allèle i1 soit plus fortement associé à ces maladies que la présence du génotype s1m1 (Kim et Blanke, 2012 ; McClain *et al.*, 2017).

### II.4.3.3. Blood group antigen-binding adhesin (BabA) et Sialic acid-binding adhesin (SabA)

Après avoir quitté la lumière gastrique, *H. pylori* traverse le mucus où la bactérie se multiplie. L'adhérence est une condition préalable pour la colonisation par *H. pylori* et la survenue des pathologies. Une faible proportion de bactéries atteint la surface des cellules épithéliales et adhèrent aux cellules de l'épithélium gastrique grâce à l'expression d'adhésines (Falk *et al.*, 2000) dont BabA (Blood group antigen-binding adhesin) et SabA (Sialic acid-binding adhesin) (Chmiela *et al.*, 2017). Le récepteur cellulaire du BabA est l'antigène fucosylé Lewisb (Ilver *et al.*, 1998); celui du SabA c'est une forme sialylée des motifs Lewis X (Mahdavi *et al.*, 2002).

Les souches *H. pylori* BabA2+ adhèrent mieux que les autres aux cellules épithéliales et grâce à leur activité proinflammatoire, elles sont plus souvent associées à des pathologies gastriques sévères (telles que l'ulcère et l'adéno-carcinome gastrique). L'activité de liaison de BabA est le plus souvent présente dans les souches CagA positives (Lu *et al.*, 2005). L'adhérence par BabA facilite également le contact de l'appareil de sécrétion de type IV avec les cellules hôtes, conduisant à une réponse inflammatoire plus forte (Ishijima *et al.*, 2011 ; Matsuo *et al.*, 2017).

Les antigènes de Lewis sialylés sont plus répandus sur le tissu enflammé ou au cours du cancer gastrique, ce qui conduit à l'hypothèse que SabA est impliqué dans la carcinogénèse. Toutes les études mettent en évidence des corrélations entre SabA et la présence d'un cancer (Yamaoka, 2010 ; Matsuo *et al.*, 2017).

## III. Traitement d'une infection à *H. pylori* et résistance aux antibiotiques

### III.1. Schémas thérapeutiques

Généralement, l'ulcère peptique et les autres désordres associés à *H. pylori* régressent ou guérissent après l'éradication d'*H. pylori* par des antibiotiques (Bayerdorffer *et al.*, 1995 ; Sugiyama *et al.*, 2002 ; Selgrad et Malfertheiner, 2017). L'infection à *H. pylori* est difficile à traiter pour plusieurs raisons : une localisation gastrique en milieu acide et dans le mucus, site protégé créant des conditions néfastes à la diffusion et à l'efficacité des antibiotiques (Lozniewski *et al.*, 1998); une croissance bactérienne lente et une sensibilité particulière d'*H. pylori* aux antibiotiques (De Korwin et Lozniewski, 1996 ; Delchier, 1999 ; De Francesco *et*

*al.*, 2017). Ces particularités expliquent, qu'en dépit d'une sensibilité *in vitro* à de nombreux antibiotiques, très peu d'entre eux aient une efficacité *in vivo*.

Le traitement d'une infection à *H. pylori* inclut un inhibiteur de la sécrétion acide, soit un inhibiteur de la pompe à proton (IPP), soit un antagoniste des récepteurs H2 de l'histamine (anti-H2) et au moins deux antibiotiques. Il ressort d'une importante méta-analyse, regroupant trente deux études, que les IPP sont plus efficaces que les anti-H2 (Gisbert *et al.*, 2003 ; De Francesco *et al.*, 2017 ; Selgrad et Malfertheiner, 2017). Ils ont une activité bactériostatique sur *H. pylori* et agissent en synergie avec certains antibiotiques (MTZ, CLA, TET). La suppression de l'acidité gastrique qu'ils provoquent potentialise l'activité des antibiotiques, la pénétration des sels de Bismuth dans la muqueuse gastrique et la concentration des antibiotiques dans l'estomac (MTZ, CLA et TET) (Erah *et al.*, 1997 ; De Francesco *et al.*, 2017).

### III.1.1. Antibiotiques utilisés et mode d'action

Les gastro-entérologues doivent faire un choix rationnel parmi les agents thérapeutiques disponibles en prenant en considération les caractéristiques optimales des antibiotiques disponibles et les facteurs prédictifs de l'évolution du traitement de l'infection à *H. pylori*. Les caractéristiques optimales d'une molécule anti-*H. pylori* sont (Vakil et Mégraud, 2007):

- Bonne activité *in vitro* ;
- Forte concentration au niveau du suc gastrique ;
- Activité par voie endoluminale et systémique ;
- Stabilité sur des gammes étendues de pH (1 à 7) ;
- Bonne tolérance et peu d'effets secondaires ;
- Faible propension à la résistance ;
- Coût abordable.

Les antibiotiques de premier choix inclus dans le traitement d'éradication sont les Nitroimidazolés, les macrolides, les  $\beta$ -lactamines et les tétracyclines.

### III.1.1.1. Nitro-imidazolés

Les Nitro-imidazolés sont des dérivés semi-synthétiques de l'azomycine produite par les *Streptomyces*. Ils ont été longuement utilisés uniquement pour leurs propriétés antiparasitaires. C'est l'ajout de la fonction nitro en position 5 qui leur confère l'activité antibactérienne, spécifiquement sur les bactéries anaérobies ainsi que sur certaines espèces micro-aérophiles dont *H. pylori*. Ils agissent par inhibition de synthèse de l'ADN bactérien (Van Zaten et *al.*, 1992).

Le MTZ et les autres composés nitro-imidazoles sont des médicaments clés dans le traitement de l'infection à *H. pylori* malgré leur activité relativement modeste *in vitro*. Le MTZ est administré sous forme de promédicament. C'est la réduction du groupement nitré du nitro-imidazole (par une nitroréductase bactérienne) qui va lui conférer son activité *in vivo* dans le cytoplasme bactérien. Il en résulte d'importants dommages entraînant la mort bactérienne (Goodwin et *al.*, 1988 ; Marshall et *al.*, 1988).

L'activité du MTZ n'est pas influencée par le pH. Il est sécrété de façon active dans la lumière gastrique. L'éventuelle résistance observée *in vitro* est relative. Le MTZ pourrait être associé à plusieurs autres molécules. Le coût est très abordable. Les inconvénients à son usage incluent les effets secondaires principalement de types gastro-intestinaux (intolérance due au goût métallique, nausées, vomissements, stomatite) et la haute prévalence de la résistance dans le monde (de l'ordre de 40%). Son usage est déconseillé, en première intention, dans des zones où la résistance primaire est au-delà de 40% (Malfertheiner et *al.*, 2007).

Par ailleurs, le MTZ peut être mutagène ou cancérigène. Malgré le fait qu'aucun cas de malformation congénitale, ni de cancer, n'a été décrit chez l'homme, il n'est pas préconisé durant la grossesse et l'allaitement.

### III.1.1.2. Macrolides

Les macrolides sont actifs contre les bactéries Gram-positifs et de nombreux agents pathogènes potentiels Gram-négatifs telles que *Campylobacter*, *Legionella*, *Chlamydia*, *Helicobacter* et *Mycoplasma*. Les macrolides sont constitués d'un anneau lactone macrocyclique d'environ 14 atomes et 16 atomes avec différents substituants. L'érythromycine et la tylosine sont des antibiotiques naturels synthétisés par des bactéries actinomycètes, alors que les nouveaux macrolides comme azithromycine et la CLA sont des

## Revue bibliographique

---

composés semi-synthétiques avec substitutions sur le cycle lactone entraînant moins d'effets secondaires et de meilleures propriétés pharmacologiques (Malathum *et al.*, 1999).

Les macrolides se fixent sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien, notamment au niveau du nucléotide A2058 sur l'ARNr 23S. Il en résulte une inhibition de l'élongation du peptide en cours de synthèse, par blocage des étapes de transfert peptidique ou de translocation (Weisblum, 1995 ; Poehlsgaard *et al.*, 2005).

La CLA reste le macrolide le plus utilisé pour la thérapie anti-*H. pylori*. Les essais avec l'azithromycine ont abouti à des résultats fort variables (Calabrese *et al.*, 2000; Laurent *et al.*, 2001 ; Sheu *et al.*, 2017). En cas de sensibilité des souches, la CLA est la molécule de premier choix dans la thérapie anti-*H. pylori*. C'est d'ailleurs la molécule au rapport dose-efficacité le plus élevé (Cammara *et al.*, 2004 ; Sheu *et al.*, 2017). Elle diffuse très bien dans la muqueuse gastrique et agit en synergie avec les supprimeurs de l'acidité.

Ses désavantages sont principalement sa dégradation en milieu acide (labile en milieu acide), sa propension à la résistance (les études épidémiologiques ont montré qu'un taux de 15 à 20 % de bactéries résistantes à cet antibiotique était atteint ou dépassé dans plusieurs pays), ses effets secondaires (perturbation du goût) et son coût élevé. Par ailleurs, une éventuelle résistance *in vitro* entraîne une perte absolue d'efficacité *in vivo* (effet « on-off »). De ce fait, son usage est déconseillé, en première intention, dans des zones où la résistance primaire est au-delà de 15-20% (Malfertheiner *et al.*, 2007).

### III.1.1.3. $\beta$ -lactamines

*H. pylori* est très sensible aux  $\beta$ -lactamines (Sheu *et al.*, 2017). La pénicilline, l'ampicilline, l'amoxicilline ainsi que les carbapénèmes sont les composés les plus actifs. La plupart des céphalosporines sont aussi actifs, mais à un moindre degré à l'exception de la céfsulodine qui trouve un intérêt dans la composition de milieux sélectifs (Dent et McNulty, 1988). Les isoxazolyl-pénicillines et les monobactames sont modérément actifs. L'activité inhibitrice des pénicillines diminue lors d'une diminution du pH. Les valeurs de CMI augmentent de 10 et 20 fois *in vitro* quand on passe de pH 7,5 & pH 5,5 (Lambert *et al.*, 1986).

L'AMX est la  $\beta$ -lactamine essentiellement utilisée dans les régimes d'éradication d'*H. pylori*. Son effet bactéricide n'est pas concentration-dépendant. Sa faible pénétration tissulaire est cependant un handicap à une bonne efficacité *in vivo* (Megraud *et al.*, 1991).

L'AMX est une aminopénicilline dont la structure résulte de l'addition d'un groupe amine à la benzylpénicilline. Elle inhibe la synthèse du peptidoglycane, constituant de la paroi bactérienne en s'attaquant aux protéines liant les pénicillines (PLP, PBP = Penicillins Binding Proteins). Très peu de souches d'*H. pylori* sont résistantes à l'AMX, d'où son usage fréquent dans les associations. Ses désavantages sont son spectre large, ses effets secondaires, dermatologiques et surtout intestinaux. Son usage est contre indiqué en cas d'allergie connue, IgE-médiée (Sheu *et al.*, 2017).

### III.1.1.4. Tétracyclines

Les TET sont des antibiotiques à large spectre, avec une activité contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, *Chlamydia spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Rickettsiae spp.* et certains protozoaires (Roberts, 2003).

Les TET inhibent la synthèse des protéines bactériennes en se liant à la sous unité 30S du ribosome où elle bloque la fixation de l'aminoacyl-ARNt résultant en la synthèse d'un peptide tronqué. Les molécules utilisées sont la tétracycline et la doxycycline. Elles sont souvent utilisées en quadruple thérapie grâce à la synergie avec les sels de bismuth. Les désavantages sont liés aux effets secondaires : rash cutané, troubles gastro-intestinaux et surtout décoloration des dents chez les enfants. Les TET sont, par conséquent, contre-indiquées chez la femme enceinte et les enfants de moins de huit ans (Midolo *et al.*, 1996).

### III.1.1.5. Autres antibactériens

- Fluoroquinolones

Antibiotiques bactericides, ils agissent par inhibition de l'activité de l'ADN-gyrase en empêchant le « surenroulement » du chromosome bactérien. L'ADN est alors désorganisé, avec pour conséquence des réplifications défectueuses. Les nouvelles fluoroquinolones sont très actives sur *H. pylori* par inhibition de la sous-unité A de l'ADN gyrase bactérienne codée par le gène *gyrA*. Cette enzyme est un tétramère constitué de deux sous-unités A codées par le gène *gyrA* et deux sous-unités B codées par le gène *gyrB*. Les molécules utilisables sont la lévofloxacine et la moxifloxacine. Elles sont très bien tolérées et par conséquent l'observance du traitement est améliorée. On observe une propension à la résistance probablement liée à leur utilisation massive pour d'autres indications (Sheu *et al.*, 2017).

- Sels de Bismuth. Ils ont un effet antibactérien par inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne. En outre, ils alcalinisent le milieu (accroissent le contenu en ions  $\text{HCO}_3^-$  au niveau de la muqueuse gastrique), ce qui potentialise l'effet des antibiotiques auxquels ils sont associés (De Francesco *et al.*, 2017 ; Selgrad et Malfertheiner, 2017 ; Sheu *et al.*, 2017).
- Rifamycines (RIF, rifabutine) qui inhibent la synthèse de l'ARN bactérien par blocage de la synthèse de la sous unité B de l'ARN polymérase ADN dépendante codée par le gène *rpoB* (Xiao *et al.*, 1990).
- Furazolidone, dérivé du nitrofurane, étudiée dès les années 90 pour son activité anti-*H. pylori* (Xiao *et al.*, 1990). En pratique, c'est face à la flambée de la résistance aux antibiotiques de premier choix que son usage est actuellement préconisé (Graham et Fischbach, 2010).
- Molécules en cours d'études cliniques : les dérivés de la benzamide, les pyloricidines, et la nitazoxanide (Campo *et al.*, 2007 ; Graham et Fischbach, 2010).

### III.1.2. Stratégies thérapeutiques

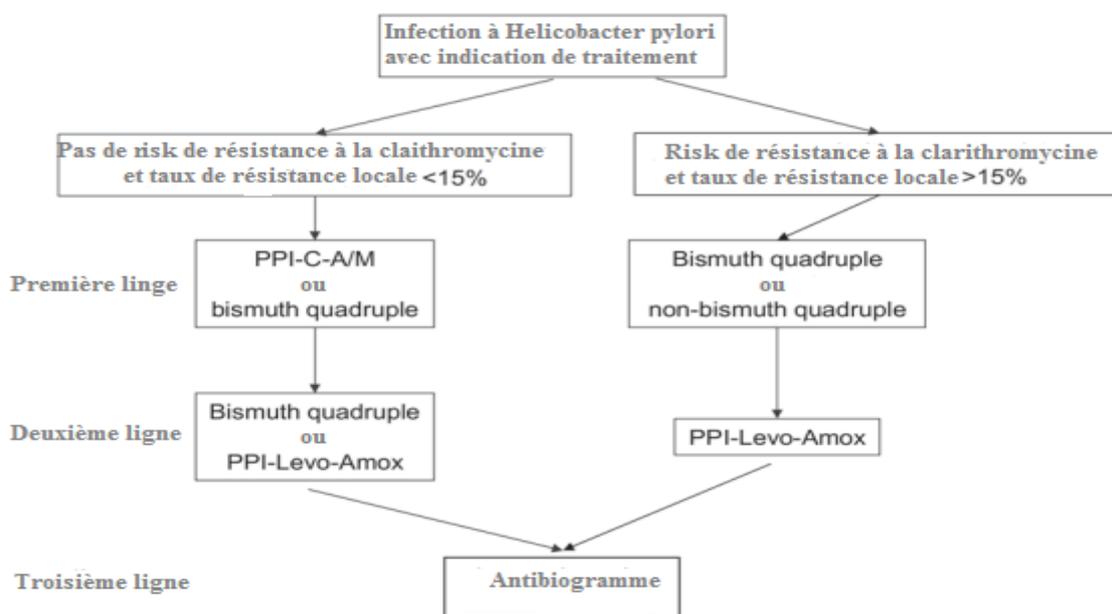
#### III.1.2.1. Traitement de première ligne

Le traitement classique consiste en une triple thérapie de sept à quatorze jours associant deux antibiotiques (CLA + AMX ou CLA + MTZ) à un IPP à double dose pour neutraliser l'acidité gastrique (Malfertheiner *et al.*, 2007 ; Pellicano *et al.*, 2016 ; Selgrad et Malfertheiner, 2017). Dans ces conditions, la bactérie n'est éradiquée que dans environ 70% des cas (Graham et Shiotani, 2008) et en cas de résistance à la CLA, le taux d'éradication est plus inférieur (De Francesco *et al.*, 2017 ; Selgrad et Malfertheiner, 2017 ; Sheu *et al.*, 2017).

#### III.1.2.2. Traitement de deuxième ligne

- la quadri-thérapie de dix à quatorze jours incluant le Bismuth : IPP + Sels de Bismuth + TET + MTZ. Le taux d'éradication est de l'ordre de 85% (Fischbach *et al.*, 2004 ; De Francesco *et al.*, 2017).
- des thérapies incluant les nouvelles générations de fluoroquinolones (lévofloxacine, moxifloxacine), généralement associées à l'AMX et un IPP. Ce schéma devient fortement limité par l'accroissement rapide de la résistance aux quinolones (Bogaerts *et al.*, 2006 ; Vandebosch *et al.*, 2009 ; Selgrad et Malfertheiner, 2017).

- des schémas incluant les rifamycines (RIF, rifabutine) ou la furazolidone ont également été proposés (Malfertheiner et *al.*, 2007 ; Selgrad et Malfertheiner, 2017).



**Figure02.** Schéma thérapeutique (Selgrad et Malfertheiner, 2017)

### III.1.2.4. La thérapie séquentielle

Ce schéma, prometteur, propose de manière successive les mêmes médicaments. Il consiste en 5 jours de traitement avec un IPP et de l'AMX suivi de 5 jours de prise d'IPP avec deux autres antibiotiques (CLA et MTZ). Il a été d'ailleurs proposé récemment comme traitement de première ligne (Gatta et *al.*, 2009 ; De Francesco *et al.*, 2017 ; Sheu *et al.*, 2017).

### III.1.2.5. Autres schémas thérapeutiques

- Schémas classiques avec de hautes doses d'IPP. Il ressort de deux méta-analyses qu'une double dose d'IPP permet d'obtenir 82 à 84% d'éradication comparé à 74 à 77% avec une simple dose (Vallve et *al.*, 2002 ; Villoria et *al.*, 2008 ; Sheu *et al.*, 2017).
- Schémas classiques avec de hautes doses d'antibiotiques. Une tendance à l'augmentation des doses de MTZ est particulièrement observée au Nord de l'Afrique. Néanmoins il ressort d'une importante étude multicentrique (Europe et Canada) que cela n'améliore pas le succès d'éradication (Bardhan et *al.*, 2000).

- Schémas classiques avec une augmentation de la durée du traitement. Cette formule a plus de succès aux Etats-Unis qu'en Europe (Malfertheiner *et al.*, 2007 Sheu *et al.*, 2017).
- Prise concomitante d'IPP et de trois antibiotiques (Graham et Shiotani, 2008 ; Sheu *et al.*, 2017).

### III.1.3. Facteurs d'échecs d'éradication

Les principales causes d'échec de traitement (absence d'éradication d'*H. pylori* de la muqueuse gastrique, persistance des lésions des gastrites) sont la résistance aux antibiotiques et la non observance du traitement.

#### III.1.3. 1. Mauvaise observance du traitement

Reliée à la lourdeur des thérapies et aux effets secondaires des antibiotiques, la mauvaise observance semble être une importante cause d'échec de traitement. Graham et Yamaoka (2007) avaient démontré que le taux d'éradication était de 96% pour les patients ayant pris plus de 60% des médicaments prescrits et 69% pour les patients qui étaient moins assidus (De Francesco *et al.*, 2017).

#### III.1.3. 2. La résistance aux antibiotiques

Des cas de résistance d'*H. pylori* ont été décrits pour tous les antibiotiques proposés pour l'éradication (Vakil et Mégraud, 2007). Le taux de résistance aux antibiotiques est beaucoup plus élevé en cas d'échec d'éradication (Duck *et al.*, 2004 ; Koletzko *et al.*, 2006; Agudo *et al.*, 2010) et est proportionnel au nombre de tentatives infructueuses (Miendje *et al.*, 2011 ; De Francesco *et al.*, 2017).

La résistance aux antibiotiques conduit à un échec d'éradication global de 55 à 70% pour la clarithromycine et de 25 à 37% pour le métronidazole (Van der Wouden *et al.*, 1999 ; Dore *et al.*, 2000; Fischbach, 2004; Mégraud, 2004). La résistance aux FLU a été associée à une diminution de 66,7% du taux d'éradication (Nishizawa *et al.*, 2009).

#### III.1.3.3. Autres facteurs d'échec d'éradication

- Polymorphisme du Cytochrome P450 ; les IPP sont métabolisés différemment chez les patients, selon le polymorphisme du CYP2C19 avec comme conséquence un pH moins élevé chez les métaboliseurs rapides (Furuta *et al.*, 2001). Il ressort d'une méta-analyse que le taux

## Revue bibliographique

---

d'éradication est moins bon chez les métaboliseurs rapides comparativement aux métaboliseurs lents, indépendamment de la dose d'IPP (Padol et *al.*, 2006).

- Durée du traitement, controversée en Europe (Malfertheiner et *al.*, 2007).
- Tabagisme ; le fait de fumer pourrait réduire de moitié l'efficacité d'un traitement d'éradication (Camargo et *al.*, 2007).
- Nature et posologie des antibiotiques ; les autres macrolides sont moins efficaces que la CLA (Calabrese et *al.*, 2000 ; Laurent et *al.*, 2001)
- Age des patients ; les données sont fort variables. On note généralement plus de difficultés d'éradication chez les patients de moins de 50 ans.

### III.2.La résistance aux antibiotiques

L'émergence rapide de bactéries résistantes aux antibiotiques est une menace majeure pour la santé publique, la préoccupation évidente étant que les infections peuvent ne plus être traitables avec des antibiotiques. Les antibiotiques efficaces sont également des outils essentiels pour la transplantation d'organes, la chimiothérapie et la chirurgie orthopédique (Cars et *al.*, 2008). Les données de surveillance ont montré une incidence accrue des infections causées par des pathogènes résistants aux antibiotiques dans de nombreux pays (EARSS, 2007).

L'échec du traitement à base d'antibiotique d'une infection conduit généralement à de graves conséquences pour le patient et est associée à des coûts accrus de soins de la santé publique. Dans une étude récente sur de plus de 1800 enfants tanzaniens montrant des signes d'infection systémique, le taux de mortalité dû à des bactériémies à Gram négatif était plus du double de celui de la malaria (44% comparativement à 20%) (Blomberg et *al.*, 2007).

*H. pylori* est sensible *in vitro* à de nombreux antibactériens ; néanmoins peu sont efficaces pour son éradication *in vivo* et l'une des particularités de cette bactérie est sa capacité à acquérir des résistances essentiellement par mutation (Megraud et Lehours, 2007; Boyanova et Mitov, 2010; De Francesco et *al.*, 2017). L'équipement de *H. pylori* en enzymes de restriction, enzymes dont la fonction est de détruire les ADN exogènes qui pénètrent dans la cellule bactérienne, semble assez important pour éviter l'introduction de résistance provenant de bactéries phylogéniquement éloignées, par transformation ou un autre mécanisme d'échange génétique. De plus, les contacts entre *H. pylori* et ces bactéries

semblent peu importants sauf si l'on admet que *H. pylori* puisse se multiplier dans l'intestin (Tomb *et al.*, 1997).

La transmission de la résistance est essentiellement verticale et les taux de résistance augmentent progressivement du fait de la pression de sélection. Tous les antibiotiques sont concernés bien que la résistance à l'amoxicilline soit exceptionnelle (Megraud et Lehours, 2007; Boyanova et Mitov, 2010; De Francesco *et al.*, 2017).

### III.2.1. Prévalence de la résistance aux antibiotiques

L'antibiorésistance est la raison principale de l'échec du traitement d'éradication d'*H. pylori* d'où l'importance de la détection de cette résistance. La sensibilité de *H. pylori* aux antibiotiques est déterminée par les méthodes de culture sur milieux solides tels que E-test, dilution sur milieu gélosé et diffusion sur disques. Ces méthodes servent à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques. Des facteurs tels que la variabilité cellulaire, le volume d'inoculation, les conditions d'incubation ainsi que le milieu de culture peuvent influencer les résultats (Arslan *et al.*, 2017). Les méthodes basées sur les techniques moléculaires sont indépendantes de tous ces facteurs.

La prévalence de la résistance d'*H. pylori* aux antibiotiques a été évaluée dans le monde entier. Cependant, la plupart des études provenaient de centres uniques, incluant seulement un petit nombre de souches, souvent isolées à partir d'un nombre limité de patients sélectionnés, et les techniques utilisées pour évaluer la sensibilité aux antibiotiques, sont différentes. Les taux de résistance aux antibiotiques doivent être de préférence obtenus à partir de programmes de surveillance multicentriques à grande échelle en utilisant des méthodes de détection normalisées afin de réduire la probabilité de sous ou surestimation de la prévalence de l'antibiorésistance d'*H. pylori*. Toutefois, ces programmes de surveillance sont coûteux et ne sont réalisés que dans quelques pays et le plus souvent par des enquêteurs plutôt que par le gouvernement.

La résistance aux antibiotiques chez *H. pylori* est déjà répandue et ne cesse d'augmenter. La résistance au MTZ (CMI > 8 mg / L) est la résistance aux antimicrobiens la plus commune chez *H. pylori*. Dans les pays industrialisés environ 35% des souches d'*H. pylori* sont MTZ-résistantes, alors que dans les pays en voie de développement, les taux de résistance d'*H. pylori* au MTZ sont très élevés, et dans certaines régions presque toutes les souches d'*H. pylori* sont MTZ-résistantes (Zhou *et al.*, 2014; Bai *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Zhang

YX *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2016; Ji *et al.*, 2016 ; Song *et al.*, 2016). Cette corrélation peut être expliquée par l'utilisation fréquente du MTZ dans le domaine gynécologique, dentaire et pour le traitement des maladies parasitaires (Mascellino *et al.*, 2017).

En comparaison avec la résistance au MTZ, la prévalence de la résistance à la CLA (CMI  $\geq 2$  mg / L) dans *H. pylori* est beaucoup plus faible. Dans les pays industrialisés, environ 10% des souches d'*H. pylori* sont résistantes à la CLA. Dans les pays en voie de développement, les taux de résistance à la CLA sont plus élevés et varient entre 25 à 50% (Bai *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Zhang W *et al.*, 2015; Zhang YX *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2016; Ji *et al.*, 2016; Malfertheiner *et al.*, 2017).

Jusqu'à la fin du 20<sup>e</sup> siècle, on pensait que la résistance à l'AMX et la TET était très rare ou absente chez *H. pylori* (Song *et al.*, 2014; Nishizawa *et al.*, 2015; Sugimoto *et al.*, 2015 ; Zhang, YX *et al.*, 2015). Contrairement à d'autres bactéries, où la résistance à ces antibiotiques est très répandue, l'incidence de la résistance d'*H. pylori* à l'AMX et la TET semble augmenter (Bai *et al.*, 2015; Zhang W *et al.*, 2015; Zhang YX *et al.*, 2015; Ji *et al.*, 2016), en particulier dans certaines régions géographiques (par exemple l'Italie, le Brésil, le Salvador, l'Inde et la Lituanie), où ces antibiotiques peuvent être obtenus sans ordonnance. Les taux de résistance d'*H. pylori* de 72% et 59% pour l'AMX et la TET, respectivement, ont été signalés à Shanghai, en Chine (Wu *et al.*, 2005).

Le taux de résistance aux FLU comme la levofloxacine par exemple varie considérablement selon les régions (12.6–54.8%) (Song *et al.*, 2014; Zhang YX *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2016; Ji *et al.*, 2016). Bien que les RIF soient rarement utilisés pour le traitement d'éradication, une apparition de souches *H. pylori* résistantes à la RIF a été observée à travers le monde (14.2–18.2%) (Song *et al.*, 2014; Zhang YX *et al.*, 2015).

### **III.2.2.L'impact de l'antibiorésistance**

De nombreuses études ont montré que la résistance aux antibiotiques entrave sérieusement l'efficacité de la thérapie anti-*H. pylori* (Houben *et al.*, 1999 ; Laheij *et al.*, 1999 ; Van der Wouden *et al.*, 2000). La résistance aux antibiotiques réduit les taux d'éradication d'*H. pylori* et dépend d'une variété de facteurs, tels que les composants utilisés dans le traitement, la dose des médicaments antimicrobiens, la durée du traitement, et le niveau de résistance présente dans la souche d'*H. pylori* (Van der Wouden *et al.*, 2000).

Plusieurs études ont montrées que quand un patient est colonisé par une souche d'*H. pylori* résistante au MTZ, les taux d'éradication d'une trithérapie, à base d'IPP et contenant le MTZ, baissent d'environ 20%, passant de 93% (86-100%) pour les souches sensibles au MTZ à 71% (45-94%) pour les souches résistantes (Houben et *al.*, 1999 ; Van der Wouden et *al.*, 1999).

D'autres études ont montré que la résistance au MTZ peut avoir un impact plus important sur les taux d'éradication obtenus avec une trithérapie à base d'IPP et contenant le MTZ. Dans ces études, les taux d'éradication passent de 91% (56-97%) pour les souches sensibles contre 63% (17-96%) pour les souches résistantes (Houben et *al.*, 1999 ; Van der Wouden et *al.*, 1999). L'ajout d'un composant comme le bismuth à une thérapie à base d'IPP (quadruple thérapie) a augmenté l'efficacité de la thérapie, de 91% (80-100%) pour les souches sensibles au métronidazole contre 77% (53-100%) pour les souches résistantes (Van der Wouden et *al.*, 1999).

Puisque la prévalence de la résistance d'*H. pylori* à la CLA est faible, la plupart des études qui évaluent l'effet de la résistance à la CLA sur l'efficacité du traitement ne contenait qu'un petit nombre de patients. Malgré cette limitation, il semble que la résistance à la CLA réduit l'efficacité de tous les régimes d'éradication contenant la CLA de façon spectaculaire (Megraud et *al.*, 1991).

Les taux d'éradication de la CLA contenant des bithérapies (médicaments IPP ou bismuth) ont diminué d'environ 40%, passant de 67% (62-74%) pour les souches sensibles à la CLA à 28% (20-40%) pour les souches résistantes à la CLA. Bien que les taux d'éradication de la CLA contenant des trithérapies (PPI et l'AMX ou le MTZ) augmente d'environ 90% pour les souches sensibles à la CLA, le taux demeure faible (36%) pour les souches résistantes (Houben et *al.*, 1999). En raison de la présence de la résistance d'*H. pylori* à l'AMX ou à la TET, un échec de la thérapie a été rapporté (Dore et *al.*, 2000 ; Ecclissato et *al.*, 2002), mais il n'y a pas suffisamment de données encore disponibles pour mesurer l'impact de ces résistances.

### **III.2.3. Détection de l'antibiorésistance**

#### **III.2.3.1. Méthodes de détection phénotypiques**

Elles reposent classiquement sur l'antibiogramme, réalisé à partir de subcultures obtenues par repiquage de la souche isolée lors de la mise en culture des biopsies gastriques (Grignon

et *al.*, 2002 ; McNulty et *al.*, 2002). La difficulté technique de ces méthodes phénotypiques est réelle en raison de la croissance lente d'*H. pylori* et des besoins culturels spécifiques de cette bactérie (microaérobie, température à 37 °C, milieux enrichis...) (Grignon et *al.*, 2002; McNulty et *al.*, 2002). Le problème est compliqué par la constatation chez un même malade de la coexistence possible mais assez rare de plusieurs souches d'*H. pylori* de sensibilité différente : dans 5 cas sur 238 à partir de plusieurs sites de biopsies gastriques chez l'enfant, dans 5 à 10% des cas pour le MTZ d'après une revue de la littérature (McNulty et *al.*, 2002). Des recommandations ont été proposées pour la réalisation des antibiogrammes par la méthode de diffusion en agar à l'aide de disques de CLA ou de MTZ (McNulty et *al.*, 2002).

La méthode de diffusion en agar, sur milieu de Mueller-Hinton enrichi en sang à 10 % sous atmosphère microaérobie, a été validée par le Groupe d'études français des *Helicobacter* pour l'étude de la sensibilité aux macrolides. Il suffit de tester l'érythromycine en raison de la bonne concordance des résultats avec la CLA. Pour cet antibiotique, on peut aussi employer la technique du E-test à la place des disques (Grignon et *al.*, 2002).

Les sensibilités à l'AMX et à la TET peuvent aussi être déterminées par la méthode de diffusion à l'aide de disques (McNulty et *al.*, 2002). En revanche, aucune des méthodes habituelles ne semble encore adaptée à la détermination de la sensibilité au MTZ, particulièrement en raison de problèmes de reproductibilité. A défaut, il est recommandé d'utiliser la méthode de diffusion à l'aide de disque de MTZ en utilisant une souche témoin d'*H. pylori* sensible (par exemple NCTC 12822) (McNulty et *al.*, 2002). En cas de résultat intermédiaire (taille des zones de 16–21 mm), il est conseillé de le contrôler à l'aide de l'E-test (McNulty et *al.*, 2002). Seule la méthode de dilution en agar, plus difficile à mettre en œuvre et inutilisable en routine, semble reproductible pour le MTZ.

### **III.2.3.2. Méthodes de détection génotypiques de la résistance**

Puisque chez *H. pylori*, la plus part des résistances sont dues à des mutations spécifiques, des méthodes moléculaires peuvent offrir une alternative intéressante aux méthodes basées sur la culture classique. Les méthodes moléculaires sont indépendantes de la viabilité des cellules ou du taux de croissance des bactéries, et donc plus constantes, reproductibles et beaucoup plus rapides. Si elles sont directement appliquées à des biopsies gastriques, les résultats peuvent être obtenus le jour de l'endoscopie.

## Revue bibliographique

---

Bien que le séquençage d'ADN soit la meilleure méthode pour la détection des mutations, il n'est pas rentable dans un contexte de routine. De nombreuses méthodes moléculaires sont maintenant disponibles pour évaluer la résistance à la CLA, la TET, et à la CIP chez *H. pylori*, mais malheureusement ce n'est pas le cas pour le MTZ et l'AMX.

Le développement de tests rapides, en ce basant sur le génotype d'*H. pylori* pour la détection d'une résistance au MTZ n'est pas facile, parce que la résistance est associée à diverses mutations situées ou non sur le gène *rdxA* et d'autres gènes codant pour la réductase (Latham *et al.*, 2001). En dépit de ces obstacles, il y a de nouvelles preuves qui indiquent que le système basé sur la détection de la protéine pourrait être développé en utilisant un immunoblot avec un anticorps spécifique anti-*rdxA*, une bande immuno-réactive 24 kDa a été observée dans tous les isolats sensibles au MTZ mais était absente dans la plupart (90%) d'isolats résistants au MTZ (Latham *et al.*, 2001).

De nombreuses techniques ont été développées pour la détection de la résistance à la CLA chez *H. pylori*. La plupart des tests sont une réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en utilisant différentes méthodes pour étudier les amplifias. Restriction fragments length polymorphism (RFLP) est une méthode simple qui repose sur la présence de sites de restriction au sein de l'amplifia. Ce test permet de détecter des mutations de l'*ARNr 23S* mentionnés précédemment en utilisant les endonucléases de restriction, MboII (A2142G), BBSi (A2142G), BsaI (A2143G) et BceAI (A2142C) (Occhialini *et al.*, 1997 ; Menard *et al.*, 2002). Comme la PCR-RFLP était initialement pas en mesure de détecter la mutation A2142C, une méthode PCR amorce inverse 3'-décalage (3M-PCR) a été développé (Alarcon *et al.*, 2000).

D'autres méthodes, comme la méthode immuno-enzymatique PCR-ADN (DAEI), oligonucléotide PCR essai de ligature (LLO), la formation de homoduplex préférentiel (PHFA) et de la sonde PCR ligne test (LIPA), comprend une étape d'hybridation supplémentaire après la PCR. Les produits de PCR ont été hybridés avec des sondes oligonucléotidiques marquées dans des conditions très strictes et les hybrides ont ensuite été détectés avec des anticorps spécifiques (Stone *et al.*, 1997 ; Pina *et al.*, 1998 ; Maeda *et al.*, 2000 ; Van Doorn *et al.*, 2000).

Récemment, plusieurs essais d'hybridation PCR en temps réel ont été développés. Dans ces essais un fragment de l'*ARNr 23S* est amplifié en présence d'une mutation marqué par fluorescence et la sonde d'ancrage. Lorsque ces sondes s'hybrident avec le produit de la PCR,

un signal de fluorescence est émis. Après achèvement de la PCR, la température est augmentée pour déterminer le point de fusion de la sonde de mutation. La température augmente pour indiquer le point de fusion de la sonde de mutation. Quand il y a des décalages présents dans la séquence cible, les températures de fusion obtenues sont inférieures par rapport à l'hybride identifié. Cette technique est simple et rapide, et si elle est appliquée directement sur le tissu gastrique, les résultats peuvent être obtenus dans 3 heures (Gibson et *al.*, 1999 ; Oleastro et *al.*, 2003 ; Chisholm et *al.*, 2007).

Il y a aussi une possibilité de détecter la résistance à la CLA sans effectuer une PCR, en utilisant l'hybridation fluorescente in situ (FISH). Dans cet essai les bactéries intactes sont hybridées avec une sonde marquée fluorescente spécifique à la séquence 16S et 23S d'*H. pylori*. Les bactéries marquées sont ensuite visualisées par microscopie à fluorescence. Ce test permet la détection d'*H. pylori* et la résistance à la CLA simultanément. En outre, ce dosage ne nécessite pas la préparation de l'ADN et peut être directement appliqué sur la biopsie gastrique (Trebesius et *al.*, 2000).

Comme le mécanisme moléculaire pour la détection de la résistance d'*H. pylori* à la TET a été récemment identifié, l'information sur les techniques de détection moléculaire est encore limitée. Jusqu'à présent, deux méthodes basées sur la PCR ont été développées: (i) une PCR-RFLP, et (ii) une PCR en temps réel (Trieber et Taylor, 2002).

### **III.3. Mécanismes de la résistance aux antibiotiques**

La résistance d'*H. pylori* a été décrite pour tous les antibiotiques cités. Contrairement à la majorité des bactéries, le mécanisme moléculaire impliqué dans la résistance d'*H. pylori* aux antibiotiques est essentiellement caractérisé par une acquisition de mutations ponctuelles au niveau du chromosome bactérien. A ce jour, aucune résistance médiée par un plasmide, transposant ou intégrant n'a encore été décrite (Gomez-Lus, 1998). Par conséquent la transmission de la résistance à la descendance d'une souche est essentiellement verticale (Smeets et *al.*, 2003 ; Arslan et *al.*, 2017).

Certaines souches peuvent développer des pompes d'efflux, notamment vis-à-vis de la CLA, du MTZ et de la tétracycline. Ce mécanisme de résistance serait plus fréquent chez des souches multi-résistantes (Liu et *al.*, 2008 ; Tsugawa et *al.*, 2011). Néanmoins la résistance intrinsèque, par éjection des molécules à l'extérieur de la cellule, n'affecte que la TET (Wu et *al.*, 2005).

### III.3.1. Résistance aux nitroimidazoles

Une résistance au MTZ acquise en cours de traitement est fréquente chez *H. pylori*. Dans le cas d'*H. pylori*, les niveaux de résistance au MTZ sont très divers, avec des CMI allant de 8 à  $\geq 256$  mg / L (Kwon et al., 2000). Cet écart dans les valeurs de CMI suggère que la résistance au MTZ peut résulter d'une mutation ponctuelle à un locus, mais il est plus probable que plusieurs voies sont impliquées. Les mécanismes potentiels de résistance au MTZ étudié dans *H. pylori* incluent (i) déficience de l'absorption de médicaments et / ou une augmentation d'efflux, (ii) une activité accrue des enzymes de réparation, (iii) augmentation des capacités de capture de l'oxygène, et (iv) diminution de l'activation de l'antibiotique résultant de changements des enzymes de réduction du MTZ (Kwon et al., 2000).

Le MTZ est un exemple typique de résistance par le mécanisme de nodulation-division d'efflux (RDN), un mécanisme qui joue un rôle important dans la résistance aux antibiotiques de plusieurs bactéries. Dans le génome d'*H. pylori*, les trois systèmes putatifs d'efflux RDN ont été identifiés (Bina et al., 2000). La mutation de ces trois opérons RDN, n'a pas affecté la susceptibilité d'*H. pylori* à dix-neuf antibiotiques *in vitro*. Bien que le MTZ n'a pas été inclus dans cette étude, mais il a été suggéré que les niveaux d'expression de ces protéines étaient trop faibles et ne pourrait influencer la sensibilité aux antibiotiques en général (Bina et al., 2000). L'inactivation d'un mécanisme d'efflux de type TopC augmenterait la sensibilité des souches d'*H. pylori* au MTZ (Tsugawa et al., 2011 ; Arslan et al., 2017).

Les activités classiques du NADPH oxydase ont été trouvées dans plusieurs organismes, y compris *H. pylori* (Smith et Edwards, 1997). Le rôle exact de ce type d'enzyme dans la résistance au MTZ est inconnu, mais il a été publié qu'ils sont impliqués dans le piégeage de l'oxygène. L'activité de la NADPH oxydase était presque identique pour les isolats d'*H. pylori* sensibles et résistants au MTZ, et parfois trois fois plus élevée chez les isolats sensibles (Smith et Edwards, 1997 ; Jenks et Edwards, 2002).

Le faible taux intracellulaire de la NADPH oxydase peut compromettre la tension en oxygène, permettant au potentiel redox de s'élever suffisamment pour empêcher l'activation de MTZ, ce qui conduit à une résistance à cet antibiotique.

Les isolats d'*H. pylori* résistants au MTZ peuvent devenir sensibles après une exposition à de courtes périodes d'anaérobiose *in vitro* (Smith et Edwards, 1997), il a été suggéré que la sensibilité au MTZ peut être rétablie à faibles teneurs en oxygène à travers l'activation des

voies potentielles de réduction anaérobiques qui fonctionnent moins, ou pas du tous, sous microaérophilie (Smith et Edwards, 1997 ; Jenks et Edwards, 2002 ; Mascellino *et al.*, 2017).

Le mécanisme moléculaire impliqué dans la résistance au MTZ a été élucidé par la découverte d'une mutation chromosomique du gène *rdxA* codant pour la NADPH nitroréductase insensible à l'oxygène (Hoffman *et al.*, 1996). D'autres mutations sur d'autres gènes seraient également impliquées: *frxA* (NADPH flavin oxidoreductase), *fdxB* (ferredoxin-like protein) (Kwon *et al.*, 2000).

L'implication d'une séquence d'insertion (mini-IS605) associée à des délétions dans le même gène a également été incriminée dans l'acquisition de résistance. Par ailleurs, il a été démontré que de nombreuses enzymes bactériennes (thioredoxine reductase, alkylhydroperoxide reductase, superoxide dismutase) peuvent réduire le MTZ, en fonction du potentiel redox des cellules (Smith et Edwards, 1997 ; Mendz et Trend, 2001 ; Trend *et al.*, 2001 ; Arslan *et al.*, 2017).

### III.3.2. Résistance aux macrolides

La région la plus décisive pour l'activité des macrolides est une boucle très conservée entre les espèces, dans le domaine V de l'*ARNr 23S*, région impliquée dans le transfert peptidique. Ce sont les positions 2142, 2143, 2144 et 2696 du gène de l'*ARNr 16S* qui sont cruciales. Seules les espèces comportant une adénine en position 2143 et une liaison entre les bases 2142 et 2696 (soit une paire G-C ou U-A) sont sensibles à ces molécules (Arslan *et al.*, 2017 ; Mascellino *et al.*, 2017).

C'est au niveau de ces positions critiques que des modifications conférant la résistance aux macrolides ont été décrites. Il s'agit de modifications de la cible de l'antibiotique, entraînant une moindre affinité pour la molécule antibactérienne. Celles-ci sont de deux types.

#### a. Modification post-transcriptionnelle de l'*ARNr 23S* (MLSb)

Le support génétique de cette résistance est un gène de la famille des gènes *erm* (erythromycin resistance methylase), codant pour une N-méthyltransférase qui va diméthyliser l'adénine en position 2143 du domaine V de l'*ARNr 23S*. Des gènes *erm* ont été retrouvés chez de nombreuses espèces bactériennes, mais jamais chez *H. pylori*, qui ne semble donc pas pouvoir résister aux macrolides par cette voie (Mascellino *et al.*, 2017).

### b. Mutations dans le gène de l'ARNr 23S

Chez la plupart des espèces bactériennes, on retrouve au sein du génome plusieurs copies de l'opéron ribosomal (qui code pour les sous unités ARNr 5S, 16S et 23S). Les mutations dans le gène de l'ARNr 23S n'ayant pas un caractère dominant, la survenue d'une mutation sur une ou quelques copies du gène ne suffit pas pour entraîner la résistance, puisqu'il reste des allèles sauvages. Ainsi ce mécanisme de résistance ne peut être retrouvé que chez des bactéries de croissance lente qui ne possèdent qu'un faible nombre de copies de cet opéron ribosomal. C'est justement le cas d'*H. pylori* qui ne possède que 2 copies (Mascellino *et al.*, 2017).

La quasi-totalité des souches résistantes présente au moins une mutation ponctuelle dans la boucle du domaine V évoquée plus haut : les mutations A2142G et A2143G sont les plus fréquentes, la mutation A2142C étant beaucoup plus rare. Il a été montré qu'une mutation sur l'une des deux copies du gène de l'ARNr 23S était suffisante pour conférer la résistance (Versalovic *et al.*, 1997 ; Arslan *et al.*, 2017 ; Mascellino *et al.*, 2017). En Asie, c'est la mutation T2182C qui est la plus fréquente (Khan *et al.*, 2012) néanmoins son impact sur la résistance a été controversée par une équipe française.

Cette résistance s'applique à l'ensemble du groupe MLS (Macrolides, lincosamides et streptogramines). Les mutations A2142C et A2142G sont liées à un haut niveau de résistance croisée à tous les macrolides, alors que la mutation A2143G donne lieu à un haut niveau de résistance à l'érythromycine et un niveau de résistance intermédiaire à la clindamycine et streptogramine (Arslan *et al.*, 2017).

### III.3.3. Résistance aux $\beta$ -lactamines

De rares cas de souches résistantes à l'AMX ont été rapportés. Elles sont liées à des mutations ponctuelles dans le gène codant pour les PLP entraînant un blocage du transport de l'antibiotique. L'un des premiers cas a été décrit en 1996 aux Pays-Bas chez un patient ayant été traité plusieurs fois par l'AMX suite à une infection respiratoire chronique. La souche d'*H. pylori* isolée montrait une résistance stable (CMI = 8  $\mu$ g/ml) non reliée à une production de  $\beta$ -lactamase (Van Zwet *et al.*, 1998).

Chez les bactéries à Gram négatif, la résistance aux antibiotiques  $\beta$ -lactamines est principalement due à la production de  $\beta$ -lactamase, soit codée par le chromosome ou le plasmide. Cependant, chez *H. pylori*, il n'y a aucune indication que la résistance à l'AMX est

due à l'acquisition ou à l'expression de  $\beta$ -lactamase, puisque aucune activité  $\beta$ -lactamase n'a été détectée. D'autres mécanismes en relation avec la résistance à l'AMX ont été étudiés sont principalement : (i) des modifications structurelles dans les PLP, (ii) la diminution de la perméabilité membranaire, et (iii) l'efflux ( Kwon *et al.*, 2000 ; Dore *et al.*, 2001 ; Arslan *et al.*, 2017 ; Mascellino *et al.*, 2017).

Les PLP sont des enzymes impliquées dans la synthèse et le maintien de la couche de peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne. Chez *H. pylori* neuf PLP présumés ont été identifiés, trois PLP haut poids moléculaire et six PLP bas poids moléculaire (Harris *et al.*, 2000). Dans un premier temps, deux de ces protéines ont été associés à la résistance à l'AMX chez *H. pylori*, le mécanisme moléculaire a été décrit pour les isolats résistants à l'AMX (CMI > 256 mg / L) obtenus à partir de patients dyspeptiques de l'Italie et des États-Unis. Ces isolats ont perdu leur phénotype de résistance lors de la congélation à -80 ° C (Dore *et al.*, 2001), ils sont souvent appelés AMX - tolérants.

Plus tard après, des isolats *H. pylori* résistants à l'AMX stables ont été obtenus avec des CMI comprises entre 8-64 mg / L (Kwon *et al.*, 2000). La Résistance à l'AMX dans ces isolats a été causée par diverses mutations ponctuelles dans le gène *pbp1a* (Kwon *et al.*, 2000). Récemment, il a été décrit l'implication de plusieurs gènes notamment les gènes des *pbp-1*, *pbp-2* et *pbp-3* (Rimbara *et al.*, 2008 ; Arslan *et al.*, 2017 ; Mascellino *et al.*, 2017).

### III.3.4. Résistance aux tétracyclines

De rares cas de résistance d'*H. pylori* aux TET ont été décrits. Le premier cas remonte à 1996, en Australie, où une souche résistante à la TET a été isolée chez un malade après une tentative d'éradication infructueuse (Midolo *et al.*, 1996). La TET est un antibiotique qui est largement utilisé dans de nombreux pays industrialisés, et comme conséquence une résistance à ce médicament est devenue un problème émergent.

En général, quatre mécanismes de résistance à la TET ont été identifiés: (i) déficience de l'absorption du médicament et / ou une augmentation de l'efflux; diminution de la liaison à l'antibiotique par (ii) les changements dans les protéines ribosomales de protection, ou (iii) des mutations dans l'*ARNr 16S* site de liaison de la TET, et (iv) inactivation enzymatique de la TET. Dans le cas de *H. pylori*, les trois premiers mécanismes ont été étudiés (Bina *et al.*, 2000; Trieber et Taylor, 2002 ; Hu Y *et al.*, 2017 ; Mascellino *et al.*, 2017).

## Revue bibliographique

---

Le mécanisme le plus probable pour la résistance à la TET chez *H. pylori* est basée sur une triple substitution dans trois résidus d'ARNr 16S adjacents, AGA926 - 928TTC (Dailidienne et al., 2002 ; Hu Y et al., 2017 ; Mascellino et al., 2017). Cette mutation est située dans la liaison primaire, site de la TET, et peut affecter l'affinité de l'interaction médicament-ribosome et donc réduire l'efficacité de la TET comme inhibiteur de traduction.

Outre cette triple substitution, AGA926 - 928TTC, il existe plusieurs substitutions simples et doubles, soit A926G, A926T, A928C, AG926 - 927GT et A926G/A928C qui peuvent être impliqués dans la résistance d'*H. pylori* à tétracycline (Dailidienne et al., 2002 ; Gerrits et al., 2002 ; Hu Y et al., 2017 ; Mascellino et al., 2017).

La mutation AGA926 - 928TTC semble responsable d'une résistance stable à haut niveau avec des CMI très élevées, alors que les substitutions simples et doubles sont responsables d'une résistance à bas niveau (CMI ne dépassant pas les 4 mg / L) (Dailidienne et al., 2002 ; Arslan et al., 2017 ; Mascellino et al., 2017).

### III.3.5. Résistance aux rifabutines

Des cas de résistance d'*H. pylori* à la RIF ont été décrits. Il ya quelques années la résistance aux RIF et rifabutine *in vivo* était très rare, cependant, l'incidence de cette résistance a augmenté (Kist et Glocker, 2004 ; Arslan et al., 2017).

La résistance à la RIF est généralement associée à des mutations du gène *rpoB* au niveau des codons 524, 525, et 585 tels que décrits pour *Mycobacterium tuberculosis* et *Escherichia coli* (Heep et al., 2000). Une autre mutation, acquise sous traitement, a été décrite au niveau du codon 149 (V149F : remplacement de la valine par la phenylalanine) Toutes ces mutations affectent l'ensemble des molécules du groupe des RIF (Heep et al., 2000 ; Arslan et al., 2017 ; Mascellino et al., 2017).

### III.3.6. Résistance aux fluoroquinolones

*H. pylori* est naturellement résistant à l'acide nalidixique suivant un mécanisme non encore élucidé. La plupart des isolats de *H. pylori* sont sensibles aux FLU, mais l'incidence de la résistance aux FLU semble augmenter (Kist et Glocker, 2004).

L'acquisition de la résistance aux FLU est liée à la survenue de mutations dans la « Quinolone Resistance Determining Region » (QRDR) du gène *gyrA* au niveau des codons 86, 87 et 91 Une seule mutation est suffisante pour conférer la résistance. A ce jour, une douzaine

## Revue bibliographique

---

de mutations ont été décrites. Il existe des souches résistantes qui n'ont pas ces mutations et dont le mécanisme reste à explorer (Moore *et al.*, 1995; Tankovic *et al.*, 2003 ; Cattoir *et al.*, 2007 ; Mascellino *et al.*, 2017).

## *Matériel et méthodes*

### IV. Matériel et méthodes

#### IV.1. Cadre d'étude

Plusieurs centres ont constitué le cadre de l'étude. Il s'agit:

- **du Centre Hospitalier Universitaire Mustapha Pacha d'Alger**, est l'un des plus grands et important hôpitaux en Algérie;
- **de l'Etablissement Hospitalier Universitaire Premier Novembre 1954 d'Oran** (Algerie) ;
- **du Centre Hospitalier Universitaire Hassani Abedelkader de Sidi Belabbes**,
- **La Cabinet Privé de Médecine Interne Dr Hallouche à Chlef**, cabinet de médecine interne, gastro-entérologie et d'hépatologie.

##### IV.1.1. Durée d'étude

La durée de l'étude a été de quatre ans (4 ans) allant de mars 2013 à décembre 2016. Cette étude était réalisée dans le cadre d'une thèse de doctorat à l'université de Hassiba Benbouali de Chlef. Une partie de l'étude a été effectuée au sein du Laboratoire de Bio ressources et la partie moléculaire a été faite au sein du Centre national de Référence (CNR) *Helicobacter/Campylobacter* et l'unité INSERM U853 (actuellement INSERM UMR 1053 BaRITON, équipe 2 : *Helicobacter* Infection, Inflammation and Cancer) de l'Université de Bordeaux (France).

##### IV.1.2. But du travail et critères d'inclusion, de non inclusion et d'exclusion

Notre travail constitue une étude rétrospective portant sur 270 patients souffrant d'une douleur abdominale, adressés pour une endoscopie digestive haute. Les biopsies prélevées ont été analysées pour déterminer la prévalence de la résistance d'*H. pylori* aux antibiotiques et les mécanismes moléculaires associés à cette résistance. Les antibiotiques étudiés sont : l'amoxicilline, la clarithromycine, le métronidazole, la tétracycline, la ciprofloxacine et la rifampicine. Pour réussir à isoler la bactérie, il a fallu inclure et exclure certains critères chez les patients.

### **Les critères d'inclusion:**

Nous avons inclus tous les cas de gastrite chronique à *H. pylori*, diagnostiquées sur biopsies gastriques chez les patients âgés de 18 ans à 82 ans et de tout sexe. Le consentement du patient au protocole d'étude était le premier critère à inclure.

### **Les critères de non inclusion:**

Les biopsies non incluses dans notre étude sont celles portant sur les formes de gastrites sans signes d'infection à *H. pylori* ou dans le cas où le sujet refuse de participer à l'étude.

### **Les critères d'exclusion:**

Nous avons exclu les gastrites chroniques à *H. pylori* concernant les patients:

- Dont l'âge est inférieur à 18 ans,
- ayant reçu un traitement dans le mois précédent par les inhibiteurs de la pompe à protons (IPP), antibiotiques ou anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS),
- les gastrites à *H. pylori* au voisinage d'une néoplasie maligne ou d'un ulcère duodénal, les gastrites à *H. pylori* associées à une autre pathologie notamment de reflux ou gastrites avec signes évocateurs d'une origine auto-immune, les gastrites granulomateuses à *H. pylori*, et les prélèvements biopsiques de mauvaise qualité ou non représentatifs du corps gastrique.

## **IV.2. Etude de la prévalence de la résistance d'*H. pylori* aux antibiotiques**

### **IV.2.1. Prélèvement des biopsies**

Durant toute la période de l'étude, les patients ont subi une endoscopie haute pour obtenir quatre fragments de biopsies de 0.5mm, deux biopsies antrales et deux biopsies fundiques. La fibroscopie a été effectuée grâce à un endoscope stérile, le prélèvement de la biopsie a été fait grâce à une pince stérile et nettoyée du formol pour éviter la fixation des cellules. Les fragments de biopsies de 0.5mm ont été déposés dans un tube stérile contenant du PBS et transportés immédiatement à 4°C au laboratoire de Bio ressources (l'isolement a été fait dans un délai ne dépassant pas les 4 heures) (Mégraud *et* Lehours, 2007).

### **IV.2.2. Transport des biopsies**

Les problèmes de transport sont à l'origine de l'échec de la mise en culture d'*H. pylori*. Ce micro organisme est très fragile, il est donc obligatoire de le protéger de la dessiccation, le contact avec l'oxygène et la température ambiante. Les biopsies ont été déposées immédiatement dans une solution saline si le transport ne dépassait pas les 4h ou dans un milieu de transport semi solide porta-germ pylori à 4°C (Mégraud et Lehours, 2007).

### **IV.2.3. Broyage des biopsies**

La comparaison des cultures effectuées à partir de biopsies broyées et non broyées a montré un nombre élevé de colonies après le broyage. Pour cette raison, les biopsies obtenues ont subi un broyage manuel dans 01ml de bouillon cœur cerveau (BHIB). Tous les instruments et les produits utilisés ont été stérilisés rigoureusement pour éviter la contamination (Mégraud *et* Lehours, 2007).

### **IV.2.4. Isolement d'*H. pylori***

*H. pylori* a été isolé à partir de biopsies broyées sur gélose Coeur cerveau (BHI) (bioMérieux) supplémentée de: 10% de sang humain, 0.4% IsoVitaleX, 5 mg/l de triméthoprime, 5 mg/l de cefsulodine, 10 mg/l de vancomycine et 8 mg/l of amphotericine B.

Des volumes de 250 µl du broyat ont été ensemencés sur le milieu sélectif. Les boîtes ont été incubées à 37°C sous atmosphère humide et micro-aérobie (5 à 6% d'O<sub>2</sub>, 8 à 10% de CO<sub>2</sub>, 80 à 85% de N<sub>2</sub>) pendant 7 jours ou plus.

Après 72 heures d'incubation, une première lecture des boîtes est effectuée, suivie par une lecture quotidienne pendant au maximum 12 jours au-delà, les boîtes étaient considérées négatives en cas d'absence de croissance. Les Isolats ont été conservés à -80° dans le BHIB additionné de 20% glycerol (Mégraud et Lehours, 2007 ; Zhen-Hua *et al.*, 2013).

### **IV.2.5. Identification des isolats d'*H. pylori***

Les isolats d'*H. pylori* ont été identifiés selon l'aspect macroscopique, l'aspect microscopique (coloration de Gram) (Annexe 01) et les tests biochimiques (l'uréase, la catalase et l'oxydase) (Mégraud et Lehours, 2007 ; Zhen-Hua *et al.*, 2013).

### IV.2.5.1. Examen macroscopique

L'aspect des colonies et leurs dimensions sont obtenus après isolement d'*H. pylori* sur milieu de culture solide enrichi au sang (Mégraud et Lamouliatte, 1992).

### IV.2.5.2. Examen microscopique

Il a été effectué sur un frottis, préparé à partir de colonies suspectes en cultures pures en appliquant la coloration de Gram (Annexe 01). L'examen microscopique peut montrer différentes formes de cellules bactériennes. Sous microscope optique et après coloration de Gram, les cellules ont une forme bacillaire incurvée ou arrondie (Mégraud et Lehours, 2007).

### IV.2.5.3. tests biochimiques

Pour confirmer qu'il s'agit bien d'*H. pylori*, il suffit d'effectuer trois tests biochimiques pour chercher l'uréase, l'oxydase et la catalase. Ces trois tests ont été effectués sur une lame porte-objet en utilisant respectivement le milieu urée-indole, les disques oxydase et l'eau oxygénée. La lecture se fait immédiatement. Les isolats identifiés ont été conservés à -80° dans le BHIB additionné de 20% de glycérol (Mégraud et Lehours, 2007 ; Zhen-Hua *et al.*, 2013).

### IV.2.6. Etude de la susceptibilité aux antibiotiques

La susceptibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de dilution sur milieu gélosé et par les E-tests selon l'EUCAST. Les antibiotiques testés sont : l'AMX, la CLA, la CIP, le MTZ, la RIF et la TET.

La gélose Mueller-Hinton supplémentée de 7% de sang de cheval défibriné (bioMérieux), a été additionnée par des séries de concentrations des différents antibiotiques : CLA, 0.016-256mg/L; AMX, 0.016- 32 mg/L; MTZ, 0.016-256 mg/L; TET, CIP and RIF, 0.016-32 mg/L (bioMérieux) (tableau 01). Une suspension d'*H. pylori*, ajustée à une turbidité équivalente au standard de McFarland 3.0, a été utilisée pour inoculer les boîtes de pétri. Dans le cas des E-test, les bandelettes ont été déposées sur les boîtes après inoculation. Les boîtes ont été incubées à 37°C sous micro aérobie pour 3 jours (EUCAST, 2017).

## Matériel et méthodes

**Tableau 01.** Les différentes dilutions et les valeurs seuil pour chaque antibiotique testé, selon L'EUCAST.

Antibiotiques	Dilutions (mg/L)	Valeurs seuils de CMI (mg/L)
Amoxicilline	0.016-32 mg/L	> 0.5
Ciprofloxacine	0.016-32 mg/L	> 1
Clarithromycine	0.016-256 mg/L	> 1
Métronidazole	0.016-256 mg/L	> 8
Rifampicine	0.016-32 mg/L	> 1
Tétracycline	0.016-32 mg/L	> 1

### IV.2.7. Extraction et purification de l'ADN génomique

L'ADN génomique total a été extrait et purifié grâce à deux kit commerciaux: Magazorb DNA mini-prep kit (Promega) pour les biopsies gastriques et Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) pour les Isolats. L'application des protocoles a été faite selon les instructions du fabricant. L'AND génomique des biopsies et des isolats a été conservé à -20°C.

#### A. Extraction et purification de l'ADN génomique à partir de colonies bactériennes caractéristiques et jeunes

Le protocole utilisé est le protocole accompagnant le kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Dans des instruments propres et stériles, nous avons ajouté 01ml de la suspension bactérienne à un eppenderoff de 1.5ml. Après Centrifugation à 13,000–16,000 ×g pour 2 min, le surnageant a été jeté. 600µl de « Nuclei Lysis Solution » a été ajouté et a été pipeté doucement pour re-suspendre les cellules.

Une Incubation à 80°C pour 5 min a été effectuée. Après refroidissement à la température ambiante, 03µl de la solution RNase ont été ajoutés au lysat des cellules, le tout a été mélangé par renversement du tube.

## Matériel et méthodes

---

Une incubation à 37°C pour 15 à 60 min a été effectuée. Après refroidissement à la température ambiante, 200µl de « Protein Precipitation Solution » ont été ajoutés et ont été Vortexés vigoureusement à grande vitesse pour 20sec.

Une nouvelle incubation sur la glace pour 5 min suivie par une centrifuger à 13,000–16,000 × g pour 3 min, ont été effectuées. Puis, le surnageant contenant l'ADN a été transféré à un autre eppendorff propre et stérile contenant 600µl d'isopropanole. Le tube a été inversé doucement pour mélanger jusqu'à la formation d'un précipitât.

Une Centrifuger à 13,000–16,000 × g pour 2 min a été effectuée avant d'éliminer le surnageant et un séchage du tube avec le papier absorbent a été appliqué.

600µl d'éthanol 70% ont été ajoutés et mélangés doucement. L'éthanol a été aspiré après centrifugation à 13,000–16,000 × g pour 2 min. En fin, le tube a été séché sur un papier absorbent et a été laissé à l'air libre pour 10 à 15 min. En suite, 100µl de « DNA Rehydration Solution », ont été ajouté et ont été incubé à 65°C pour 1 h. L'ADN a été conservé à –20°C.

### **B. Extraction et purification de l'ADN génomique à partir des fragments de biopsies**

Le protocole utilisé est le protocole accompagnant le kit Magazorb DNA mini-prep kit (Promega). Pour obtenir un maximum de rendement d'AND à partir du fragment de tissu, il a fallu procéder par un broyage mécanique. Tous les instruments utilisés sont propres et stériles. Toutes les solutions du Kit sont bien mélangées avant leur utilisation.

Nous avons ajouté 5 à 10mg de tissu à un tube eppendorff de 2ml. Nous avons homogénéisé le tissu dans 200µl de tampon TE pour obtenir une suspension uniforme et nous l'avons laissé sur la glace.

20µl de la solution PK ont été ajoutés au centre du tube pour éviter de toucher les bords, le tous a été mélanger par un pipetage. Un Mixage manuel doux sans que la solution touche le bouchon du tube a été effectué. Puis, 20µl de solution de RNase A (20mg/ml) ont été ajoutés, vortexés pendant 15sec et incubés à température ambiante pendant 5 min.

200µl de clear Lysis Buffer ont été ajoutés et bien mixés jusqu'à obtention d'une mixture homogène (15 sec). Une incubation dans un bain marie à 56°C pendant 10 min a été effectuées.

## Matériel et méthodes

---

Les tubes ont été enlevés du bain marie et ont été séchés par papier absorbant. 500µl de « Binding Buffer » ont été ajoutés et mixés pour homogénéiser.

20µl de «MagaZorb Reagent» ont été ajoutés aux tubes et ont été bien mélangés par Vortex (15 sec). Une incubation à température ambiante pendant 10 min en mixant toutes les 2 min a été mise en œuvre.

Les particules « MagaZorb » ont été sédimentées en utilisant un aimant. Le surnageant a été éliminé par aspiration. Le tube doit être pressé sur l'aimant. 1ml de tampon de lavage” Wash Buffer” a été ajouté puis les tubes ont été éloignés de l'aimant et bien mélangés pour disperser les particules.

Les particules ont été sédimentées encore une fois sur l'aimant et le surnageant a été éliminé par aspiration. Les étapes 15 à 19 ont été répétées. 200µl de « Elution Buffer » ont été ajoutés et mixés doucement puis incubés à la température ambiante pendant 10min en mélangeant toutes les 2 min.

Les particules ont été sédimentées sur l'aimant et le surnageant contenant l'ADN été transféré dans un nouveau tube. L'ADN à été conservé à -20°C.

### **IV.2.8. La détection moléculaire d'*H. pylori***

La détection moléculaire d'*H.pylori* à partir des biopsies et l'identification des isolats ont été effectuées en utilisant les amorces amplifiant le gène *glmM* et une région conservée du gène *ARNr 16S* spécifique à *H. pylori*, les amorces sont représentées dans le (tableau 02).

## Matériel et méthodes

**Tableau 02.** Caractéristiques des PCR classiques effectuées pour l'identification d' *H. pylori* et ses facteurs de virulence.

amorces	Sequence (5'-3')	PCR conditions	Taille du produit	Reference
HEL-F	AAC GAT GAA GCT TCT AGC TTG CTA	Dénaturation Initiale à 94°C pendant 10min; 35 cycles de 94°C pendant 30 sec, 56°C pendant 1 min et 72°C pendant 1 min; extension finale à 72°C pendant 10 min.	399bp	(Smith <i>et al.</i> , 2011)
HEL-R	GTG CTT ATT CST NAG ATA CCG TCA T			
<i>glmM</i> -F	GGA TAA GCT TTT AGG GGT GTT AGG GG	Dénaturation Initiale à 94°C pendant 10min; 40 cycles de 94°C pendant 30 sec, 58 °C pendant 30 sec et 72°C pendant 1 min; extension finale de 72°C pendant 10 min.	294pb	(Yang J <i>et al.</i> 2013)
<i>glmM</i> -R	GCT TAC TTT CTA ACA CTA ACG CGC			
<i>cagA</i> -F1	GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G	Dénaturation Initiale à 94°C pendant 10min; 40 cycles de 94°C pendant 30 sec, 58 °C pendant 30 sec et 72°C pendant 1 min; extension finale de 72°C pendant 10 min.	349pb	(Yamaoka <i>et al.</i> , 1999 ; Nagiyev <i>et al.</i> , 2009)
<i>cagA</i> -B1	CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A			
VA1-F	ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC	Dénaturation Initiale à 94°C pendant 10min; 35 cycles de 94°C pendant 30 sec, 60°C pendant 30sec et 72°C pendant 30sec; extension finale à 72°C pendant 10 min.	259pb	(Yamaoka <i>et al.</i> , 1999 )
VA1-R	CTG CTT G AATGC GCC AAAC			
VA1-F	ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC	Dénaturation Initiale à 94°C pendant 10min; 35 cycles de 94°C pendant 30 sec, 60°C pendant 30sec et 72°C pendant 30sec; extension finale à 72°C pendant 10 min.	286pb	(Yamaoka <i>et al.</i> , 1999 )
VA1-R	CTG CTT G AATGC GCC AAAC			
VAG-F	CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG	Dénaturation Initiale à 94°C pendant 10min; 35 cycles de 94°C pendant 30 sec, 60°C pendant 30sec et 72°C pendant 30sec; extension finale à 72°C pendant 10 min.	570pb	(Yamaoka <i>et al.</i> , 1999 )
VAG-R	GCG TCA AAT AAT T CCA AGG			
VAG-F	CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG	Dénaturation Initiale à 94°C pendant 10min; 35 cycles de 94°C pendant 30 sec, 60°C pendant 30sec et 72°C pendant 30sec; extension finale à 72°C pendant 10 min.	645pb	(Yamaoka <i>et al.</i> , 1999 )
VAG-R	GCG TCA AAT AAT T CCA AGG			

La réaction de PCR standard a été faite dans un volume final de 20µl contenant du PCR buffer x1, 1.5mM Chlorure de Magnesium (MgCl<sub>2</sub>), 200µM de chaque dNTP, 0.5µM de chaque amorce et une 1U hot start Taq DNA polymerase (Promega) (tableau 03 et 04). L'amplification a été effectuée dans un Eppendorf Mastercycler gradient et les étapes de l'amplification sont représentées dans le (tableau 02).

Le produit de PCR a été séparé sur un gel d'agarose de 2% et un marqueur de taille de 100bp a été utilisé pour déterminer la taille de l'amplifiât (Smith *et al.*, 2011 ; Yang J *et al.* 2013).

## Matériel et méthodes

**Tableau 03.** Réactifs utilisés dans la PCR pour la détection du gène *ARNr 16S* pour l'identification d'*H. pylori*.

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon
Eau	12,65
Buffer (5X) Promega	4,00
dNTP (10 mM)	0,40
Hel-F (25µM)	0,40
Hel-R (25µM)	0,40
GoTaq	0,15
Matrice	2
Vol final	20

**Tableau 04.** Réactifs utilisés dans la PCR pour la détection du gène *glmM* pour l'identification d'*H. pylori*.

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon
Eau	12,65
Buffer (5X) Promega	4,00
dNTP (10 mM)	0,40
Hel-F (25µM)	0,40
Hel-R (25µM)	0,40
GoTaq	0,15
Matrice	2
Vol final	20

## Matériel et méthodes

### IV.2.9. La détection moléculaire des facteurs de virulence

#### IV.2.9.1. La détection du *cagA*

La présence du génotype *cagA* a été déterminée par PCR en utilisant les amorces *cagA*-F1 et *cagA*-B1 représentées dans le (tableau 02). L'ADN de la souche *H. pylori* J99 a été utilisé comme control positif et l'eau distillée stérile comme contrôle négatif.

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume final de 10µl contenant du PCR buffer x1 concentré, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM dNTP, 0,5µM de chaque amorce, 0.5 U hot start taq polymérase (Promega) (tableau 05). L'amplification a eu lieu dans un Eppendorf Mastercycler gradient et les étapes de l'amplification sont représentées dans le (tableau 02).

Le produit de PCR a été séparé sur un gel d'agarose de 2% et un marqueur de taille de 250bp a été utilisé pour déterminer la taille de l'amplifiât (Yamaoka *et al.*, 1999 ; Nagiyev *et al.*, 2009).

**Tableau 05.** Réactifs utilisés dans la PCR pour la détection du gène *cagA*.

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon
Eau	4,75
Buffer (5X) Promega	2,00
dNTP (10 mM)	0,20
<i>cagA</i> -F (25µM)	0,20
<i>cagA</i> -R (25µM)	0,20
GoTaq	0,05
Matrice	2
Vol final	8

#### IV.2.9.2. La détection du *vacA*

La présence du génotype *vacA* et les allèles (*s1*, *s2*, *m1* and *m2*) a été déterminé par PCR simplex en utilisant les amorces représentées dans le (tableau 02). L'ADN de la souche *H. pylori* J99 a été utilisé comme contrôle positif et l'eau distillée stérile comme contrôle négatif.

## Matériel et méthodes

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume final de 20µl contenant du PCR buffer x1, 1.5mM Chlorure de Magnésium, 0.4µM dNTP, 0.5µM de chaque amorce, 1U hot start taq polymérase (Promega) (tableau 06). L'amplification a eu lieu dans un Eppendorf Mastercycler gradient et les étapes de l'amplification sont représentées dans le (tableau 02). Le produit de PCR a été séparé sur un gel d'agarose de 2% et un marqueur de taille de 100bp a été utilisé pour déterminer la taille de l'amplifiât (Yamaoka *et al.*, 1999 ).

**Tableau 06.** Réactifs utilisés dans la PCR pour la détection du gène *vacA*.

Réactifs	Volume (µl) pour un
Eau	9,1
Buffer (5X) Promega	4,00
dNTP (10 mM)	0,80
VA1-F (25µM)	1,00
VA1-R (25µM)	1,00
VAG-F (25µM)	1,00
VAG-F (25µM)	1,00
GoTaq	0,1
Matrice	4
Vol final	20

### IV.3. La détection moléculaire des mutations associées à la résistance aux antibiotiques

#### IV.3.1. Détermination de la présence d'*H. pylori* et les mutations associées à la résistance aux macrolides

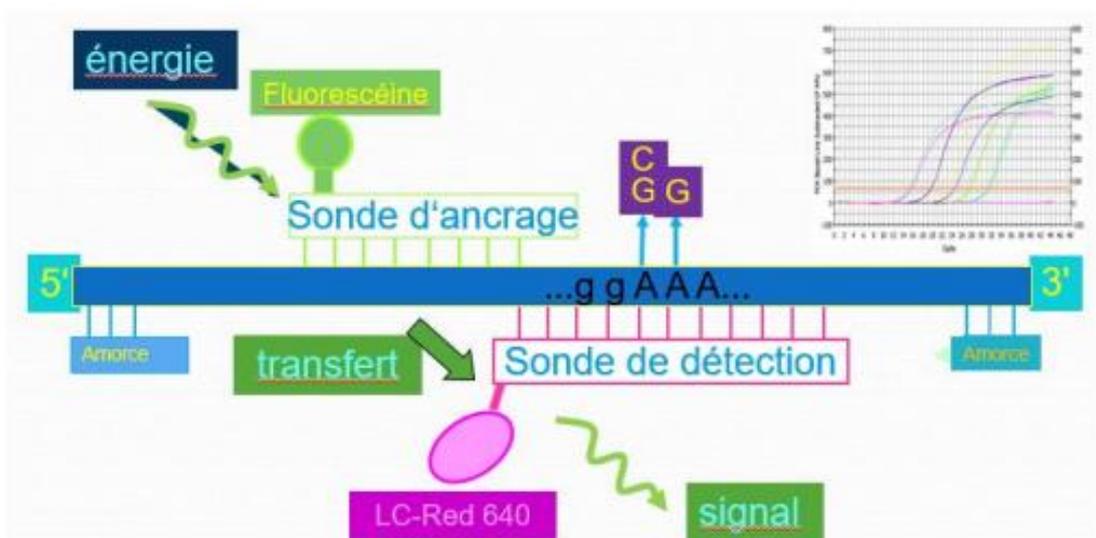
La détection d'*H. pylori* et la détermination des mutations ponctuelles associées à la résistance aux macrolides, directement à partir des biopsies, ont été réalisées grâce à la PCR en temps réel selon la technologie FRET publiée par Ménard *et al.* (2002).

La méthode consiste en l'amplification d'un fragment de 267bp du gène de l'ARN *r 23S* d'*H. pylori* et la détection simultanée de l'amplifiât grâce à l'hybridation de deux sondes : la sonde d'ancrage (anchor) (5-TGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTC CTACCC-3) couplée à la fluorescence et la sonde de détection (sensor) (5-GGCAAGA CGGAA AGACC-3) qui s'hybrident avec la région qui contient la mutation. Lorsque la sonde d'ancrage se fixe, il y'a

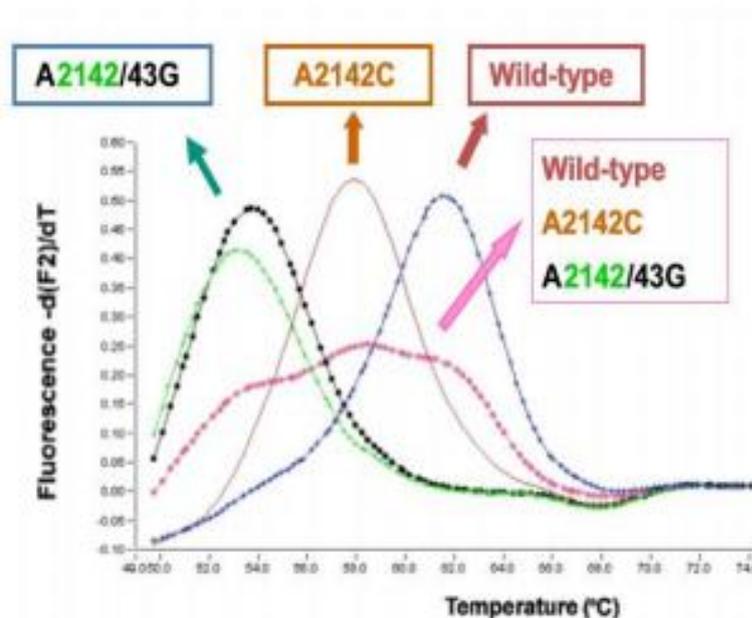
## Matériel et méthodes

transfert d'énergie sur la sonde de détection avec émission de signal, suivie de l'analyse de la courbe de fusion (Oleastro *et al.*, 2003).

Dans le cas où il y a absence de mutation, l'hybridation des sondes est parfaite et la température de fusion des sondes est maximale. Mais en présence de mutation, l'hybridation n'est pas parfaite du fait d'un mésappariement, et la température de fusion est plus faible. Ainsi sont déterminés les génotypes sauvages (Wild type) et mutants (A2142G, A2142C, A2143G) (Mégraud *et al.*, 2015).



**Figure 03.** Principe de la FRET-PCR en temps réel.



**Figure 04.** Génotypes PCR FRET (résistance à la CLA) (Mégraud *et al.*, 2015)

## Matériel et méthodes

En utilisant le thermocycleur LightCycler (Roche Diagnostics, France), la PCR et la réaction d'hybridation ont été faites dans des capillaires en glasses avec un volume final de 8µl contenant 1µl de l'ADN matrice ou l'un des trois échantillons d'ADN de souches *H. pylori* utilisés comme contrôles positifs, une souche de génotype sauvage et deux souches portant l'une des mutations connues du gène *ARNr 23S* (mutations A2142C et A2142,3G respectivement), MgCl<sub>2</sub> (25 mM), les amorces (20 µM), le sensor et l'anchor (20 µM) (tableau 07).

L'amplification a compris un cycle de dénaturation initiale à 95°C pour 10 min, suivi de 50 cycles d'amplification (avec un taux de transition de 20°C/s), chaque cycle a compris une initiation de 0 s à 95°C, une hybridation à 60°C pour 20 s et une extension à 72°C pour 12 s. Après l'amplification, une étape de fusion a été effectuée, consistant en une initiation de 0 s à 95°C, un refroidissement à 38°C pour 50 s (avec un taux de transition de 20°C/s), une augmentation de température ralenti jusqu'à 80°C à un taux de 0.1°C/s avec une acquisition continue de baisse de fluorescence. Et finalement une étape de refroidissement finale à 40°C pour 30 s (avec un taux de transition de 20°C/s).

**Tableau 07.** Réactifs utilisés dans la FRET-PCR en temps réel pour la détection des résistances aux macrolides.

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon
Eau	4,98
MgCl <sub>2</sub>	0,66
HpyA (20µM)	0,20
HpyS (20µM)	0,20
HpyRED (20µM)	0,08
Anc FL (20µM)	0,08
Enzyme (tp10x)	0,80
Matrice	1
Vol final	8

### IV.3.2. Détermination des mutations associées à la résistance à la TET

#### IV.3.2.1. PCR en temps réel

Pour déterminer les mutations associées à la résistance à la TET, une PCR en temps réel a été effectuée sur l'AND extrait directement à partir des biopsies. La méthode consiste en l'amplification d'un fragment du gène *ARNr 16S* de *H. pylori* en utilisant la paire d'amorces suivante, 16S-880fw (5'-ATAGACGGGGACCCGCACAAG-3'), 16S-999rv (5'-TGGCAAGCCAGACTCCA-3') (Glocker *et al.*, 2007 ; Mégraud *et al.*, 2015) et la détection simultanée du produit de la PCR par des sondes d'hybridation, la sonde d'ancrage 16S-Anc (5'-TCTAGCGGATTCTCTCAATGTCAAGCCTAG-3'), la sonde correspondant au génotype sauvage 16S-AGA-Sensor (5'-AAG GTT CTT CGT GTA TCT TCG-3') et une autre sonde, 16S-TTC-Sensor (5'-AAG GTT CTT CGT GTA GAA TCG-3') qui s'hybride avec la séquence du mutant TTC.

La PCR en temps réel a été accomplie dans un volume final de 20 µl dans des capillaires en verre (Roche Diagnostics, Germany) en utilisant un thermocycleur LightCycler (Roche Diagnostics, Germany). Le master mix de la PCR a contenu le MgCl<sub>2</sub> (25 mM), les amorces 16S-880fw et 16S-999rv (25 µM), l'anchor et les deux sensor (2 µM), la taq polymérase et ADN matrice (tableau 08).

Les conditions de la PCR ont compris une étape d'activation initiale à 95°C pour 15 min, 10 cycles de dénaturation à 95°C pour 10 s et une étape d'hybridation à 56°C pour 10 s, avec une étape d'élongation à 72°C pour 10 s. La température d'hybridation a été diminuée de 1°C par cycle jusqu'à atteindre une température d'hybridation de 51°C, suivi de 35 cycles (50 cycles en total). Après l'amplification, les échantillons ont été dénaturés à 95°C pour 0 s puis refroidis à 30°C, ou ils étaient maintenus à cette température jusqu'à 30 s. Puis, ils ont été chauffés à 85°C à un taux de transition de 0.1°C/s avec une acquisition continue de baisse de fluorescence. Les courbes de fusion ont été analysées automatiquement par le logiciel du LightCycler.

## Matériel et méthodes

**Tableau 08.** Réactifs utilisés dans la FRET-PCR en temps réel pour la détection des résistances aux TET.

Réactifs	Volume ( $\mu$ l) pour un échantillon
Eau	7,55
MgCl <sub>2</sub>	1,65
16S-880fw (25 $\mu$ M)	0,40
16S-999rv (25 $\mu$ M)	0,40
16S-Anc (2 $\mu$ M)	2,00
16S-TTC sensor (2 $\mu$ M)	2,00
16S-AGA sensor (2 $\mu$ M)	2,00
Enzyme (tp10x)	2,00
Matrice	2,00
Vol final	20,00

Les géotypes mutants ont été séquencés pour confirmer le type de mutation associé à la résistance à la tétracycline.

### IV.3.2.2. Amplification de gène *ARNr 16S*

Avant de passer au séquençage, une étape d'amplification classique est nécessaire. Le gène de *l'ARNr 16S d'H. pylori* a été amplifié avant d'être séquencé en utilisant les mêmes amorces employées dans la PCR en temps réel. La réaction de PCR a été faite dans un volume final de 40  $\mu$ l contenant du PCR buffer 5X (MgCl<sub>2</sub>), dNTP (10mM), les amorces 16S-880fw et 16S-999rv (25 $\mu$ M), Taq (5U/ $\mu$ l) et ADN matrice (tableau 09).

Les conditions de la PCR étaient les suivantes : Dénaturation initiale à 94°C pour 5min; 35 cycles de 94°C pour 30 sec, 56°C pour 30sec et 72°C pour 20sec; et une extension finale de 72°C pendant 7 min. La taille attendue est de 120 pb. Une migration sur gel à 2 % été réalisée après PCR afin de confirmer la présence des bandes, suivie d'une purification de l'ADN.

## Matériel et méthodes

**Tableau 09.** Réactifs utilisés dans la réaction d'amplification d'une séquence de 120pb du gène *ARNr 16S*.

Réactifs	Volume ( $\mu$ l) pour un échantillon
Eau	25,30
Buffer (5X) Promega	8,00
dNTP (10 mM)	0,80
16S-880fw (25 $\mu$ M)	0,80
16S-999rv (25 $\mu$ M)	0,80
GoTaq	0,30
Matrice	4
Vol final	40

### IV.3.2.3. Purification de l'ADN

La purification de l'ADN était réalisée par chromatographie d'exclusion en gel de Séphacryl S200 de la manière suivante (protocole du fabricant):

- Reconstituer le Séphacryl (déjà préparé dans l'éthanol) par retournement ;
- Déposer 700 $\mu$ l de Séphacryl dans une colonne propre adaptée sur un tube Eppendorf sans casquette ;
- Centrifuger 1 min à 3000 tr/min ;
- Jeter l'éluât et déposer la colonne sur 1 nouveau tube Eppendorf;
- Déposer le produit de PCR au milieu de la résine sans la toucher ;
- Centrifuger 2 min à 3000 tr/min ;
- Récupérer l'éluât ;
- Jeter le Sephacryl et recycler la colonne.

## Matériel et méthodes

---

Après purification, une migration sur gel d'agarose à 3% a été réalisée ou un dosage par NanoDrop. Cette étape va nous renseigner sur la pureté et la qualité de l'ADN avant de passer au séquençage.

### IV.3.2.4. Séquençage du gène *ARNr 16S*

La réaction de séquence a été faite en utilisant les mêmes amorces utilisées dans la PCR standard et le kit BigDye terminator cycle sequencing (Beckman Coulter, USA). La réaction de séquence a été effectuée pour l'amorce sens et l'amorce anti-sens dans les mêmes conditions dans un volume final de 20µl contenant : 13µl H<sub>2</sub>O, 4µl BigDye® Terminator v1,1, v1,3 - 5X sequencing buffer (Applied Réf: 4336697), 1µl BigDye® Terminator v3,1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystem Réf : 4336774), 1µl Amorce (3,2 µM) 3,2 pmol, 1µl ADN S200.

Les conditions de la PCR étaient les suivantes : Dénaturation initiale à 96°C pour 1min; 25 cycles de 96°C pour 10 sec, 50°C pour 5sec et 60°C pour 4min; et refroidissement à 4°C. L'analyse des chromatogrammes a été réalisée par le logiciel Finch TV, et les séquences consensus ont été comparées avec une séquence de génotype sauvage.

### IV.3.3. Détermination des mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones

La technique décrite par Rimbara *et al.* (2012) a été utilisée. Pour amplifier la région QRDR du gène *gyrA*, la paire des amorces F-QRDR-Hpylo (5-GCGTATTTT GTATGCGATGC-3) et R-QRDR-Hpylo (5-ACAAAATCAATGGTGTCTTTATCA-3) a été utilisée.

#### IV.3.3.1. Amplification de la région QRDR du gène *gyrA*

La région QRDR du gène *gyrA* d'*H. pylori* a été amplifiée avant d'être séquencée en utilisant les amorces F-QRDR-Hpylo et R-QRDR-Hpylo. La réaction de PCR a été faite dans un volume final de 30 µl contenant du PCR buffer 5X (MgCl<sub>2</sub>), dNTP (10mM), les amorces F-QRDR-Hpylo et R-QRDR-Hpylo (10µM), Taq polymérase (5U/µl) et l'ADN matrice (tableau 10).

Les conditions de la PCR étaient les suivantes : Dénaturation initiale à 94°C pour 2min; 40 cycles de 94°C pour 30 sec, 55°C pour 30sec et 72°C pour 30sec; et une extension finale de 72°C pendant 5 min. La taille attendue est de 300 pb. Une migration sur gel à 2 % a été

## Matériel et méthodes

réalisée après PCR afin de confirmer la présence de bandes, suivie d'une purification de l'ADN.

**Tableau 10.** Réactifs utilisés dans la réaction d'amplification de la région QRDR du gène *gyrA*.

Réactifs	Volume ( $\mu$ l) pour un échantillon
Eau	30,65
Tp 5X (MgCl <sub>2</sub> )	10,00
dNTP (10mM)	1,00
F-QRDR (10 $\mu$ M)	1,00
R-QRDR (10 $\mu$ M)	1,00
Taq (5U/ $\mu$ l)	0,35
matrice	6,00
Vol final	50,00

### IV.3.3.2. Purification de l'ADN

La purification de l'ADN était réalisée par chromatographie d'exclusion en gel de Séphacryl S400 de la manière suivante :

- Reconstituer le Séphacryl (déjà préparé) par retournement ;
- Déposer 700 $\mu$ l de Séphacryl dans une colonne propre adaptée sur un tube Eppendorf sans casquette ;
- Centrifuger 1 min à 3000 tr/min ;
- Jeter l'éluât et déposer la colonne sur 1 nouveau tube Eppendorf;
- Déposer le produit de PCR au milieu de la résine sans la toucher ;
- Centrifuger 2 min à 3000 tr/min ;
- Récupérer l'éluât ;

- Jeter le Sephacryl et recycler la colonne ;

Après purification, une migration sur gel d'agarose à 3% a été réalisée ; ou un dosage par NanoDrop. Cette étape va nous renseigner sur la pureté et la qualité de l'ADN avant de passer au séquençage.

### IV.3.3.3. Séquençage de la région QRDR du gène *gyrA*

La réaction de séquence a été faite en utilisant les mêmes amorces utilisées dans la PCR standard et le kit BigDye terminator cycle sequencing (Beckman Coulter, USA). La réaction de séquence a été effectuée pour l'amorce sens et l'amorce anti-sens dans les mêmes conditions dans un volume final de 20µl contenant : 13µl H<sub>2</sub>O, 4µl BigDye Terminator v1,1, v1,3 - 5X sequencing buffer (Applied Réf: 4336697), 1µl BigDye Terminator v3,1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystem Réf : 4336774), 1µl Amorce (3,2 µM) 3,2 pmol, 1µl ADN S400.

Les conditions de la PCR ont été les suivantes : Dénaturation initiale à 96°C pour 1min; 25 cycles de 96°C pour 10 sec, 50°C pour 5sec et 60°C pour 4min; et refroidissement à 4°C. L'analyse des chromatogrammes a été réalisée par le logiciel Finch TV, les séquences consensus ont été obtenues grâce à MultAnlin. La séquence en acides aminés a été obtenue à l'aide du logiciel ORF finder. Les séquences d'acides aminés obtenues étaient comparées avec une séquence de génotype sauvage (...PYFQIAYKKSARIVGDVIGKYHPHG **D**NAVY**D**ALVRMAQDFSMRLELVGQGNFGSIDGDNAAMRYTEAR...). La présence de l'asparagine N (en position 87) et de l'aspartate (D) en position 91 permettait de déterminer un génotype sensible (Rimbara *et al.*, 2012 ; Mégraud *et al.*, 2015).

### IV.3.4. Détermination des mutations associées à la résistance au MTZ

#### IV.3.4.1. PCR standard

Le gène *rdxA* d'*H. pylori* a été amplifiée avant d'être séquencée en utilisant les amorces rdx1 :(5'-GTTAGGGATTTTATTGTATG-3') rdx2 :(5'-ACGCCAAGCATTGAGCAAA-3') donnant un fragment de 427pb et rdx3 :(5'-AAAGTTAGAGTGATCCCCTC-3') rdx4 :(5'-TAATTTAGGTTTGATTATAG-3') donnant un fragment de 351pb. La réaction de PCR a été faite dans un volume final de 50 µl contenant du PCR buffer 5X (MgCl<sub>2</sub>), dNTP (10mM), les amorces rdx1, rdx2, rdx3 et rdx4 (25µM), Taq polymérase (5U/µl) et ADN matrice (tableau 11).

## Matériel et méthodes

Les conditions de la PCR été les suivantes : Dénaturation initiale à 94°C pour 3min; 30 cycles de 94°C pour 30sec, 50°C pour 1min et 72°C pour 1min; et une extension finale de 72°C pendant 5 min. Une migration sur gel à 1.5 % a été réalisée après PCR afin de confirmer la présence de bandes, suivie d'une purification de l'ADN (Kwon *et al.*, 2001 ; Han *et al.*, 2007).

**Tableau 11.** Réactifs utilisés dans la réaction d'amplification de du gène *rdxA*.

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon
Eau	30,65
Buffer Tp 5X (MgCl <sub>2</sub> )	10,00
dNTP (10mM)	1,00
rdx1 (25µM)	1,00
rdx 2 (25µM)	1,00
Taq (5U/µl)	0,35
matrice	6,00
Vol final	50,00

### IV.3.4.2. Purification de l'ADN

La purification de l'ADN était réalisée par chromatographie d'exclusion en gel de Séphacryl S300 de la manière suivante :

- Reconstituer le Séphacryl (déjà préparé) par retournement ;
- Déposer 700µl de Séphacryl dans une colonne propre adaptée sur un tube Eppendorf sans casquette ;
- Centrifuger 1 min à 3000 tr/min ;
- Jeter l'éluât et déposer la colonne sur 1 nouveau tube Eppendorf;
- Déposer le produit de PCR au milieu de la résine sans la toucher ;

## Matériel et méthodes

---

- Centrifuger 2 min à 3000 tr/min ;
- Récupérer l'éluât ;
- Jeter le Sephacryl et recycler la colonne.

Après purification, une migration sur gel d'agarose à 3% a été réalisée ou dosage par NanoDrop. Cette migration va nous renseigner sur la pureté et la qualité de l'ADN avant de passer au séquençage.

### IV.3.4.3. Séquençage du gène *rdxA*

La réaction de séquence a été faite en utilisant les mêmes amorces utilisées dans la PCR standard et le kit BigDye terminator cycle sequencing (Beckman Coulter, USA). La réaction de séquence a été effectuée pour l'amorce sens et l'amorce anti-sens dans les mêmes conditions dans un volume final de 20µl contenant : 13µl H<sub>2</sub>O, 4µl BigDye Terminator v1,1, v1,3 - 5X sequencing buffer (Applied Réf: 4336697), 1µl BigDye Terminator v3,1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystem Réf : 4336774), 1µl Amorce (3,2 µM) 3,2 pmol, 1µl ADN S500.

Les conditions de la PCR étaient les suivantes : Dénaturation initiale à 96°C pour 1min; 25 cycles de 96°C pour 10 sec, 55°C pour 5sec et 60°C pour 5min; et refroidissement à 4°C. L'analyse des chromatogrammes a été réalisée par le logiciel Finch TV, les séquences consensus ont été obtenues grâce à MultAnlin. La séquence en acides aminés a été obtenue à l'aide du logiciel ORF finder. Les séquences d'acides aminés obtenues étaient comparées avec une séquence de génotype sauvage.

### IV.3.5. Détermination de la présence de mutations associées à la résistance à la RIF

Selon les résultats de la sensibilité à la rifampicine, deux isolats ont montré une CMI de 0.75 mg/L. Cette CMI proche de la valeur seuil proposée par l'EUCAST nous a poussés à rechercher d'éventuelles mutations responsables de cette sensibilité modérée à la rifampicine chez ces trois isolats.

#### IV.3.5.1. Amplification de la région RRDR du gène *rpoB*

Le gène *rpoB* d'*H. pylori* a été amplifiée avant d'être séquencée en utilisant les amorces Frpob : TTTGATTCGCTCATGCCCAT et RrpoB : CACAACCTTTTATAAGGGGC. La réaction de PCR a été faite dans un volume final de 40 µl contenant du PCR buffer 5X

## Matériel et méthodes

(MgCl<sub>2</sub>), dNTP (10mM), les amorces FrpoB et RrpoB (10μM), Taq polymérase (5U/μl) et ADN matrice (tableau 12) (Nishizawa et *al.*, 2011).

Les conditions de la PCR étaient les suivantes : Dénaturation initiale à 94°C pour 5min; 40 cycles de 94°C pour 30 sec, 58°C pour 30sec et 72°C pour 30sec; et une extension finale de 72°C pendant 7 min. La taille attendue est de 336 pb. Une migration sur gel à 2 % a été réalisée après PCR afin de confirmer la présence de bandes, suivie d'une purification de l'ADN.

**Tableau 12.** Réactifs utilisés dans la réaction d'amplification de du gène *rpoB*.

Réactifs	Volume (μl) pour un échantillon
Eau	24,95
Tp 5X (MgCl <sub>2</sub> )	8
dNTP (10mM)	0,8
FrpoB (10 μM)	1
RrpoB (10 μM)	1
GoTaq	0,25
Matrice	4
Vol final	40

### IV.3.5.2. Purification de l'ADN

La purification de l'ADN était réalisée par chromatographie d'exclusion en gel de Séphacryl S400 de la manière suivante :

- Reconstituer le Séphacryl (déjà préparé) par retournement ;
- Déposer 700μl de Séphacryl dans une colonne propre adaptée sur un tube Eppendorf sans casquette ;
- Centrifuger 1 min à 3000 tr/min ;
- Jeter l'éluât et déposer la colonne sur 1 nouveau tube Eppendorf;

## Matériel et méthodes

---

- Déposer le produit de PCR au milieu de la résine sans la toucher ;
- Centrifuger 2 min à 3000 tr/min ;
- Récupérer l'éluât ;
- Jeter le Sephacryl et recycler la colonne.

Après purification, une migration sur gel d'agarose à 3% a été réalisée ; ou un dosage par NanoDrop. Cette étape va nous renseigner sur la pureté et la qualité de l'ADN avant de passer au séquençage.

### IV.3.5.3. Séquençage de la région RRDR du gène *rpoB*

La réaction de séquence a été faite en utilisant les mêmes amorces utilisées dans la PCR standard et le kit BigDye terminator cycle sequencing (Beckman Coulter, USA). La réaction de séquence a été effectuée pour l'amorce sens et l'amorce anti-sens dans les mêmes conditions dans un volume final de 20µl contenant : 13µl H<sub>2</sub>O, 4µl BigDye Terminator v1,1, v1,3 - 5X sequencing buffer (Applied Réf: 4336697), 1µl BigDye Terminator v3,1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystem Réf : 4336774), 1µl Amorce (3,2 µM) 3,2 pmol, 1µl ADN S400.

Les conditions de la PCR étaient les suivantes : Dénaturation initiale à 96°C pour 1min; 25 cycles de 96°C pour 10 sec, 50°C pour 5sec et 60°C pour 4min; et refroidissement à 4°C. L'analyse des chromatogrammes a été réalisée par le logiciel Finch TV, les séquences consensus ont été obtenues grâce à MultAnlin. La séquence en acides aminés a été obtenue à l'aide du logiciel ORF finder. Les séquences d'acides aminés obtenues étaient comparées avec une séquence de génotype sauvage.

## IV.4. Etude des populations multiples

### IV.4.1. Criblage des populations sensibles et résistantes à la CLA colonisant le même patient

A partir des résultats de la PCR en temps réel et selon les résultats de la susceptibilité aux antibiotiques, 10 patients ont été choisis. Ces 10 patients possédaient une double population d'*H. pylori* ; une population sensible et une autre résistante à la CLA. Les résultats de la susceptibilité aux antibiotiques ont montré que les isolats résistant issus de ces patients étaient

## Matériel et méthodes

---

résistants à au moins trois antibiotiques différents. Cette partie de la thèse est consacrée à l'étude de l'hétéro-résistance, la quasi-espèce et l'infection mixte chez le même hôte.

Les isolats choisis ont subi un screening en suivant le protocole décrit par Teh *et al.* (2014). Des suspensions équivalentes à l'indice de McFarland 03 ont été préparées à partir des isolats conservés de chacun des 10 patients. Les suspensions ont été inoculées sur gélose Muller- Hinton additionnée de 7% de sang de cheval par inondation. Les bandelettes des E-tests (CH) de la CLA ont été déposées sur la surface des boîtes qui étaient incubées par la suite à 37°C sous micro aérobie pour 48h.

Les colonies qui ont poussé dans des zones claires ont été isolées et inoculées sur le même milieu de culture précédant additionné de CLA (01mg/L) pour confirmer la résistance. Les colonies qui ont poussé dans des zones opaques (voiles de colonies) ont été isolées et inoculées aussi sur le même milieu de culture précédant, et le même milieu exempt de CLA pour confirmer la susceptibilité. Les isolats résistants et sensibles du screening issus du même patient ont été sélectionnés pour l'étude de l'hétéro-résistance, la quasi-espèce et l'infection mixte chez le même hôte.

L'ADN génomique de ces isolats a été extrait et a fait l'objet d'une amplification, séquençage (*gyrA*, *rdxA*), PCR en temps réel pour détecter les mutations de l'*ARNr 23S* et étude de polymorphisme (RAPD-PCR et PCR-RFLP).

### **IV.4.2. Amplification aléatoire d'AND polymorphe (RAPD-PCR)**

La méthode de typage (RAPD-PCR) décrite par Akopyanz *et al.* (1992) a été employée en utilisant les amorces 1254 et 1281 avec quelques modifications. Le mix réactionnel a consisté 1 × PCR buffer, 0.4mM of de chaque dNTP, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq DNA polymérase, 0.2μM amorce RAPD, 10ng AND génomique pour obtenir un volume final de 25μl.

Les conditions d' amplification sont : dénaturation à 95°C pendant 3 min, 35 cycles de 95°C pendant 1 min, 38°C (pour l'amorce 1254) ou 32°C (pour l'amorce 1281) pendant 1 min, 72°C pendant 2 min; et à la fin, une extension finale à 72°C pendant 5 min. Une migration sur gel d'agarose à 1.2 % a été réalisée (d'une durée de 4h et d'un voltage de 55V). Un marqueur de taille 1Kb a été utilisé. Les profils électrophorétiques ont été analysés.

### **IV.4.3. restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)**

## Matériel et méthodes

---

La PCR-RFLP a été effectuée sur la séquence des gènes *ureA* et *ureB* en utilisant les amorces ureAB-F: 5'AGGAGAATGAGATGA3' et ureAB-R: 5'ACTTTATTGGCTGGT3', (Akopyanz *et al.*, 1992). La réaction de PCR a été faite dans un volume final de 50 µl contenant, 1.25 µl AND matrice from, 1µl de chaque amorce (10mM), 1 µl dNTP (10 mM each), 1 µl hot-start taq-polymerase (1 U / µl), 4µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5 µl buffer (25 mM) et 71.5 µl H<sub>2</sub>O (Promega).

Les conditions de la PCR ont été les suivantes : Dénaturation initiale à 95°C pour 5min; 35 cycles de 94°C pour 1min, 50°C pour 1min et 72°C pour 2.5min; et une extension finale de 72°C pendant 10min. La taille attendue est de 2.4Kb.

Après l'amplification, les produits de la PCR ont été précipités avec 2.5 volume d'éthanol. Les culots lavés deux fois à l'éthanol puis ont été dissous dans le tampon Tris-EDTA. Après purification, l'AND amplifié a été digéré par 0,5 µl des enzymes de restriction *HaeIII* et *MobII* (Promega), pendant 3h à 37°C. Une migration, d'une durée de 4h et d'un voltage de 55V, sur gel d'agarose à 3 % a été réalisée après digestion. Un marqueur de taille 1Kb a été utilisé. Les profils électrophorétiques ont été analysés.

### **IV.5. Analyse statistique**

Les données ont été analysées par SPSS software (Version 17.SPSS Inc, United States) et la valeur p a été calculée par le Chi-square test pour déterminer toute relation significative entre les variables.

## *Résultats et discussion*

## Résultats et discussion

### V. Résultats et discussion

#### V.1. Etude de la prévalence de la résistance d'*H. pylori* aux antibiotiques

L'implication d'*H. pylori* dans les maladies gastriques et la résistance aux antibiotiques ont été mises en évidence par l'isolement de cette bactérie à partir de fragments de biopsies gastriques, prélevés chez des patients souffrant d'une douleur abdominale haute.

##### V.1.1. Caractéristiques des patients

Au total, 270 patients ont été inclus dans l'étude. 113 patients (41.8%) étaient de sexe masculin et 157 (58.1%) de sexe féminin. L'âge des patients se situait entre 18 et 83 ans, soit un âge moyen de 50.5 ans. La demande de l'endoscopie était motivée par plusieurs symptômes (tableau 13) et les résultats de l'endoscopie sont indiqués dans le (tableau 14).

Les patients ont présenté plusieurs symptômes associés à l'infection à *H. pylori*. Les epigastralgies ont été présente chez 62.9% des cas, suivis par les nausées (44.4%), les pyrosis (38.8%), les dyspepsies (33.3%), les vomissements (22.2%) et les hémorragies digestives (18.5%). Les Odynophagies ont été moins fréquentes (3.7%) (tableau 13).

**Tableau 13.** Distribution des patients selon les symptômes cliniques.

symptômes	Nombre de patients (No.)	(%)
Epigastralgie	170	62.9
Nausée	120	44.4
Pyrosis	105	38.8
Dyspepsie	90	33.3
Vomissement	60	22.2
Hémorragie digestive	50	18.5
Odynophagie	10	3.7

Note: Plus de deux symptômes peuvent être présents simultanément chez le même patient.

## Résultats et discussion

La gravité de l'infection dépend de la pathogénicité de la bactérie et d'autres facteurs propre au patient. Un patient infecté par *H. pylori* peut présenter de manifestations cliniques et différents symptômes. L'infection aiguë à *H. pylori* est souvent associée à des symptômes dyspeptiques, mais il n'a pas été démontré que l'infection chronique puisse causer des symptômes (Schubert et *al.*, 1992).

Dans notre étude, Les patients ont présenté plusieurs symptômes (epigastralgie, nausée, pyrosis, dyspepsies, vomissements et hémorragie digestive), ce ci concorde avec les résultats de Schubert et ces partenaires (1992). Zhao *et al.* (2014) ont montré que l'éradication d'*H. pylori* est associée à une amélioration des symptômes dyspeptiques et d'autres symptômes dans les populations asiatiques, européennes et américaines.

Concernant la pathologie associée à l'infection à *H. pylori*, Les gastrites (47.7%) sont les plus fréquentes suivis par l'ulcère (30%) gastrique et l'ulcère duodénale (22.2%) (tableau 14).

**Tableau 14.** Distribution des patients selon les résultats de l'endoscopie et les hôpitaux.

Hopital	No. Gastrite	No. Ulcère gastrique	No. Ulcère Duodénale	Totale No.
CHU Mustapha Pacha (Algiers)	44	32	22	98
Clinique of Gastroenterologie Halouche (Chlef),	35	24	13	72
EHU Premier November 1954 (Oran)	26	12	14	52
CHU Hassani Abdelkader (Sidi Bel Abbes)	24	13	11	48
Proportion (%)	47.7	30	22.2	100

La cause la plus fréquente de gastrites chroniques est l'infection à *H. pylori*. Elle est considérée comme jouant un rôle causal dans un certain nombre de maladies, y compris l'ulcère gastrique, l'ulcère duodénal et le cancer gastrique (Malfertheiner et *al.*, 2012 ; Fock et *al.*, 2013).

## Résultats et discussion

---

En effet, la gastrite induite par *H. pylori* est considérée comme le facteur de risque le plus important pour l'ulcère gastroduodéal, ainsi que pour le cancer gastrique (Malfertheiner et al., 2012).

### V.1.2. Isolement d'*H. pylori*

L'isolement d'*H. pylori* a été effectué à partir de broyat de biopsies gastriques, sur un milieu enrichi par 10% de sang humain, additionné d'antibiotiques. L'incubation de l'inoculum a été faite sous atmosphère micro aérobie. A partir de 270 biopsies, l'isolement a permis d'obtenir 212 (78.5%) isolats d'*H. pylori*. Ces isolats ont été identifiés selon leur aspect macroscopique. Les colonies caractéristiques ont subi une identification phénotypique et moléculaire.

La culture est la méthode de diagnostic la plus spécifique et constitue le test de référence le plus fiable pour confirmer la présence d'*H. pylori* et effectuer l'antibiogramme (Ozbey et Hanafiah, 2017). Cependant, *H. pylori* est une bactérie fragile et difficile à isoler. Elle est micro aérophile, sensible à la dessiccation et exigeante sur le plan métabolique (Mégraud et Lehours, 2007). Selon Hachem et al. (1996), la croissance d'*H.pylori* est favorisée par le sang.

Les résultats de ce travail montrent une fréquence élevée de l'infection à *H. pylori* dans la population concernée. Cette fréquence se situe dans les limites des valeurs observées dans les populations africaines, sud américaines et asiatiques qui varient de 56,4% à 91,3% (Hooi et al., 2017), excepté le Niger (36.6%) et la Chine (34.4%) où deux études ont montré que le taux de l'infection est très inférieur (Harrison et al. 2017 ; Liu et al., 2017). En Turquie le taux de prévalence était surprenant chez les enfants âgés de 4 à 18 ans (66.3%) (Ozbey et al., 2015). Cette fréquence de l'infection reste supérieure aux données européennes où elle est généralement autour de 45% (Hooi et al., 2017 ; Macías-García et al., 2017).

L'infection à *H. pylori* est contractée durant l'enfance et plusieurs facteurs influencent l'acquisition de cette bactérie. Le statut socioéconomique est le facteur majeur de risque. Le taux de l'infection est élevé chez les gens à statut socioéconomique bas. Cependant, dans les pays développés, ce facteur de risque n'a pas de rôle significatif sur l'acquisition d'*H. pylori* (Jafri et al., 2010).

## Résultats et discussion

---

D'autres facteurs de risque peuvent être impliqués, comme la source d'eau potable, le type d'habitation et la présence ou l'absence d'assainissement, ces facteurs sont reliés généralement au statut socioéconomique de la famille. Ceci indique que les facteurs de risque influençant l'acquisition de la bactérie, varient considérablement selon la population et reflètent l'exposition à ce germe durant les premières années de la vie d'un individu (Ozbey et Hanafiah, 2017).

Plusieurs études ont montré l'intervention de certains facteurs autres que le statut socioéconomique dans l'infection à *H. pylori*. Certaines n'ont trouvé aucune relation entre l'infection et la consommation du café, d'alcool ou du tabac, mais d'autres ont trouvé que ces variables avaient une relation positive avec la progression de l'infection (Amaral *et al.*, 2017).

### V.1.3. Identification des isolats d'*H. pylori*

#### V.1.3.1. Examen macroscopique

La culture du broyat des biopsies, sur le milieu sélectif utilisé, a révélé l'apparition de petites colonies de 1mm de diamètre, grisâtres, transparentes, luisantes, légèrement bombées, rondes et à contour régulier. L'apparition d'un voile peut parfois être observée.

*H. pylori* ne peut pas croître dans un milieu liquide et en tenant compte de la charge initiale suffisante dans la biopsie gastrique, il a été proposé de passer directement à l'isolement sur milieu gélosé, sans passer par une étape d'enrichissement (Mégraud, 2007). La composition du milieu inclue une base gélosée, des facteurs de croissance et des suppléments sélectifs.

La plus part des bases gélosées permettent la croissance d'*H. pylori* (gélose cœur cervelle, gélose Columbia et gélose Wilkins Chalgren). Concernant les facteurs de croissance, il est important de procurer des vitamines et des oligoéléments nécessaires pour la croissance d'*H. pylori* et qui peuvent être fournis par l'ajout du sang. Cellini *et al.* (1992) ont proposé aussi l'ajout d'isovitalax (2%).

Les suppléments sélectifs sont aussi très importants pour l'isolement d'*H. pylori* à cause de la présence de la flore de contamination: la flore buccale qui contient un très grand nombre de cocci à gram-positif, la flore intestinale dans le cas de reflux duodénale ... etc. Différents suppléments sélectifs peuvent être ajoutés, des suppléments contenant des molécules antimicrobiennes ont été proposés: la vancomycine ou la teicoplanine pour inhiber les cocci

## Résultats et discussion

---

gram-positifs; polymyxine, acide nalidixique, colistine, triméthoprime ou céfsulodin pour inhiber les gram-négatifs; l'amphotéricin B pour inhiber les champignons (Mégraud et Lehours, 2007).

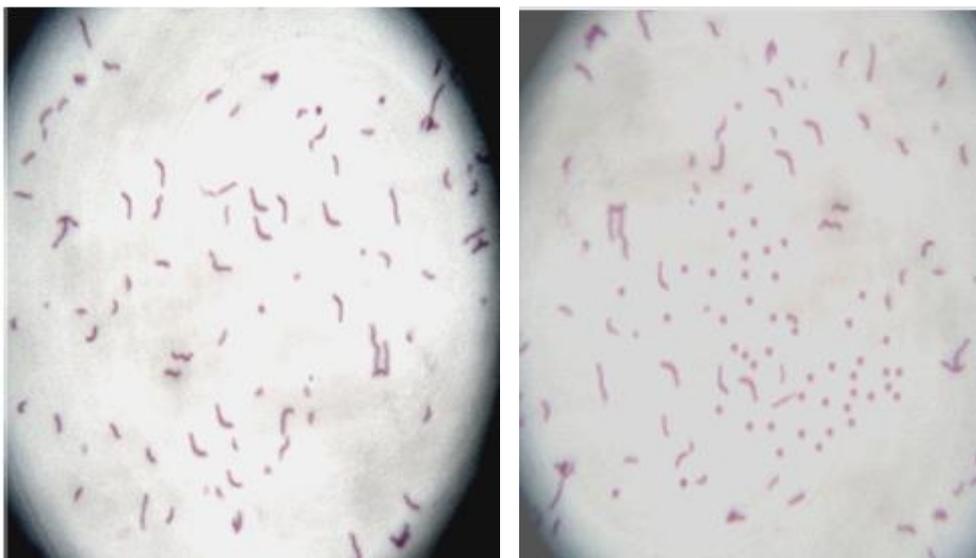
Le milieu sélectif, contenant tout les composants permettant la croissance d'*H. pylori*, et les conditions optimales de température et de micro aérobiose sont nécessaires pour l'isolement et le maintien des formes viables.

### V.1.3.2. Examen microscopique

L'observation microscopique des frottis préparés et colorés, a montré la présence de bacilles à Gram négatif qui peuvent être droits, incurvés en virgule, en forme C, V ou O (figure 05). Après plusieurs repiquages ces formes sont remplacées par une forme coccoïde. Selon Mégraud et Lehours (2007), *H. pylori* change de forme dans les vieilles cultures, perd sa forme bacillaire et devient coccoïde (figure 05).

Les cultures vieilles, de plus de 72h, peuvent se consister que de ces formes coccoïdes viables (figure 05), plus résistantes mais non cultivables. Ces formes d' *H. pylori* reflètent une adaptation temporaire aux conditions hostiles de l'environnement, au stress causé par la privation des nutriments, à l'exposition aux antibiotiques ou les longues durées d'incubation.

Il a été supposé que cette forme coccoïde peut redevenir bacille sous des conditions appropriées, mais aucune étude n'a pu prouver ce phénomène (Mégraud et Lehours, 2007).



**Figure 05:** Observation sous microscope photonique d'un frottis après coloration de Gram. A gauche frottis jeune de 48h et à droite un frottis de 72h.

## Résultats et discussion

---

### V.1.3.3. tests biochimiques

Si *H. pylori* est isolé à partir d'échantillons de biopsies, les tests phénotypiques sont suffisants pour une identification précise (Mégraud et Lehours, 2007). Chez les 212 Isolats, l'identification biochimique a révélé la présence d'une oxydase, d'une catalase et d'une activité uréasique très puissante chez tous les isolats. *H. pylori* est inactive dans la plupart des tests biochimiques conventionnels, elle n'utilise pas Les glucides.

#### A. L'oxydase

Dans cette étude, tous les isolats ont été oxydase positifs. La Cytochrome oxydase est présente chez tous les membres des *Epsilonproteobacteria*. Les enzymes de la chaîne respiratoire des bactéries micro aérophiles, jouent un rôle majeur dans leur adaptation pour se multiplier à de basses concentrations en oxygène.

Des études ont montré que la structure primaire de la plupart des sous unités du cytochrome, forment un groupe séparé des protéines de la famille *cbb3* des autres bactéries, ce qui explique la fonction de l'enzyme et son adaptation à l'atmosphère micro aérobie (Smith *et al.* 2000).

#### B. La catalase

La catalase est aussi présente chez tous les Helicobacters et est détectée facilement en mettant en contact de quelques colonies une goutte de peroxyde d'hydrogène. *H. pylori* est un pathogène gastrique exposé tout le temps au stress oxydatif de l'hôte, ce qui explique le rôle important de cette enzyme (Mégraud et Lehours, 2007).

Cette catalase contient un résidu méthionine (Met) oxydable. Le rôle du résidu méthionine est plus important que le rôle catalytique bien connu de l'enzyme. Après 100 ans de la découverte de la catalase, Benoit et Maie, (2016) proposent pour la première fois un rôle non enzymatique de la catalase ayant un mécanisme protecteur chez les bactéries.

#### C. L'uréase

L'uréase est définitivement l'enzyme la plus importante pour l'identification d'*H. pylori* (Mégraud et Lehours, 2007). L'acidité est le premier obstacle que la bactérie doit surmonter pour vivre dans l'estomac. *H. pylori* est capable de survivre à un pH approximatif à 5, ce qui

## Résultats et discussion

---

peut tuer plusieurs organismes dans quelques minutes d'exposition. L'uréase est la clé de la capacité d'*H. pylori* à éviter l'acidité gastrique.

*H. pylori* sécrète de grandes quantités d'uréase cytosolique, associée à la surface membranaire. Cependant, l'hydrolyse de l'urée (dans la lumière gastrique) produit de grandes quantités d'ammoniac, qui sont ensuite protonées pour créer de l'ammonium (figure 06), créant ainsi une micro niche bactérienne neutre. En revanche, en absence d'urée, *H. pylori* peut se développer dans une gamme de pH de 6 à 8. L'urée est importée par un canal spécifique, et avec l'uréase, l'ammoniac remplira tout le cytosol et même le périplasma bactérien (Mégraud et Lehours, 2007).



**Figure 06.** Recherche de l'uréase, positive après quelques minutes seulement, en utilisant le milieu urée-indole.

La viscosité de la muqueuse dépend fortement de l'acidité. En général, dans un pH plus acide, la muqueuse gastrique est plus épaisse qu'à pH 4. L'activité enzymatique employée par *H. pylori* facilite la pénétration bactérienne dans le mucus agrégé. La diffusion subséquente de l'ammoniac, dans l'estomac, permet à *H. pylori* de pénétrer profondément en utilisant la propulsion du tire-bouchon grâce à ses flagelles. La libération de grandes quantités d'uréase est une stratégie intelligente adoptée par *H. pylori* pour affaiblir l'intégrité du mucus, afin de faciliter la pénétration profonde pour atteindre des régions plus riches en nutriments (Abdi, 2017).

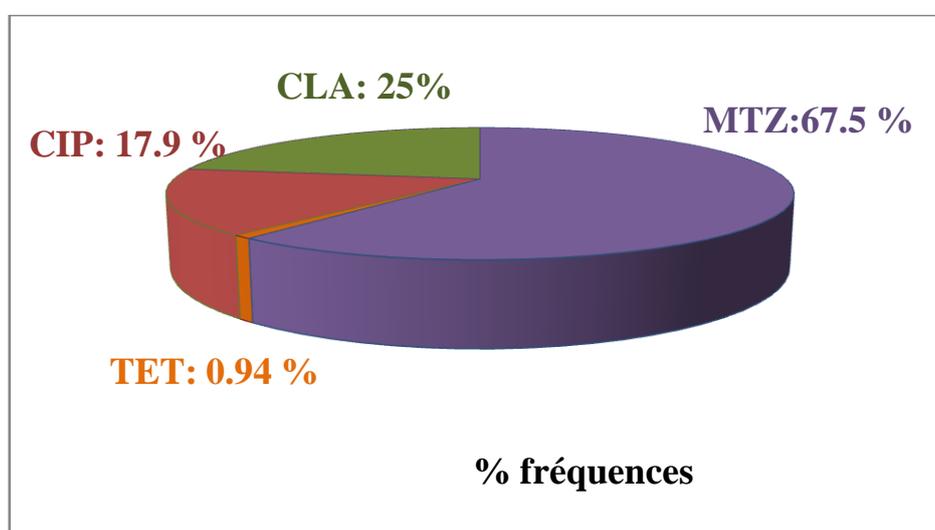
## Résultats et discussion

### V.1.4. Etude de la susceptibilité aux antibiotiques

En Algérie, la résistance aux antibiotiques semble être le plus important facteur responsable de l'échec de l'éradication d'*H. pylori*. La surveillance de la résistance d'*H. pylori* aux antibiotiques est nécessaire dans le but d'adapter une combinaison d'antibiotiques adéquate aux schémas locaux de la résistance.

Le traitement d'une infection à *H. pylori* inclut un inhibiteur des IPP et au moins deux antibiotiques. Parmi les différentes molécules antibactériennes proposées, les macrolides (CLA), les nitro-imidazoles (MTZ), les bêta lactamines (AMX), les tétracyclines (TET) et les fluoroquinolones (CIP) sont utilisés dans le traitement d'éradication.

Un total de 212 isolats d'*H. pylori* ont fait l'objet de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques proposés. Selon les recommandations de l'EUCAST (2017), seulement 12,26% des isolats ont été sensibles à tous les antibiotiques testés. Tous les isolats ont été sensibles à la RIF et à l'AMX. Les taux de résistance à la CLA (pour des CMI allant de 1 à 32 mg/L), la CIP (pour des CMI allant de 1 à 32 mg/L) et la TET (pour une CMI égale à 1.5 mg/L) ont été respectivement de 25%, 17.9% et 0.94%. Les isolats ont été caractérisés par un taux très élevé de résistance au MTZ (pour des CMI allant de 8 à 256 mg/L) (67.5%) (figure07).



**Figure07.** Fréquence des isolats résistants aux antibiotiques.

## Résultats et discussion

---

Trente six isolats ont été résistants en même temps au MTZ et à la CLA (16.98%). Parmi les isolats résistants à la CIP, 31.57% ont été aussi résistants au MTZ et un isolat a été résistant à la CLA. Les isolats résistants au MTZ ont été plus fréquents chez les femmes que chez les hommes (43,05% versus 24,4%,  $p < 0,05$ ) mais aucune relation possible n'a été trouvée entre le sexe ou l'âge et la résistance aux autres antibiotiques ( $p > 0,5$ ).

Il est bien connu que l'utilisation répandue des antibiotiques a conduit à une augmentation de la résistance d'*H. pylori* aux antibiotiques, cette résistance est en hausse dans le monde entier (Mégraud, 2010).

### A. Résistance à la clarithromycine

Dans les pays en voie de développement, la résistance à la CLA et les réinfections sont les facteurs qui contribuent à l'échec de l'éradication d'*H. pylori*. Dans notre étude, le taux de la résistance à la CLA est de 25% (figure 12); Ce résultat est inférieur à celui trouvé dans une étude faite au CHU Mustapha Pacha (Alger) (33%) (Djennane-Hadibi *et al.*, 2016), et plus élevé que celui trouvé dans une autre étude conduite dans trois différents hôpitaux à Alger (23%) (Raaf *et al.*, 2017).

Au Maroc (29%) (Bouihat *et al.*, 2017), en Egypte (57.7%) (Ghaith *et al.*, 2016) et en France (22.2%) (Ducournau *et al.*, 2016), le taux de résistance à la CLA est aussi élevé. Toutefois, en Tunisie (14.6%) (Ben Mansour *et al.*, 2016), au Niger (14.4%) (Harrison *et al.*, 2017), au Congo (1.7%) (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015) et au Sénégal (1%) (Seck *et al.*, 2013), le taux de résistance est beaucoup plus inférieur.

Une étude, sur la relation des taux de résistance d'*H. pylori* et les antécédents ethniques des patients, effectuée en Europe a montré des taux plus élevés de résistance à la CLA chez les patients originaires d'Europe (Miendje *et al.*, 2011). Ceci est probablement lié à la consommation de macrolides en Europe.

Cette différence dans les taux de résistance à la CLA entre les pays et les régions peut être due à la prescription de cet antibiotique. Depuis que cet antibiotique est devenu un traitement courant pour plusieurs maladies infectieuses, comme les infections du système respiratoire et les antécédents d'utilisation d'autres molécules appartenant à la famille des macrolides (cross résistance), la prévalence de la résistance à la CLA ne cesse d'augmenter (Mégraud *et al.*, 2013).

### B. Résistance au métronidazole

Le taux de la résistance au MTZ est très élevé dans les pays en voie de développement (50-80%), Nos résultats confirment cette information. Le taux de résistance au MTZ trouvé dans notre étude est de 67.5%. Ce résultat est plus élevé que celui trouvé par Raaf *et al.* (2017) (45%). Le taux de résistance aux MTZ, rapporté en Algérie, reste plus élevé que ceux trouvés dans d'autres études en Europe, en Espagne (27%) (Macías-García *et al.*, 2017), au Pays-Bas (23.2%) (Ruiter *et al.*, 2017) et en Islande (1%) (Gunnarsdottir *et al.*, 2017).

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés en Chine (>63%) (Liu *et al.*, 2017a ; Hu *et al.*, 2017) et très inférieurs à ceux trouvés au Niger (99.1%) (Harrison *et al.*, 2017).

La différence de ces résultats explique le profile de la prescription de cet antibiotique. Le MTZ est largement utilisé en Afrique et en Asie comme traitement antiparasitaire (Ndip *et al.*, 2008). La famille des nitro-imidazolés dont fait partie le MTZ est la plus ancienne famille d'antibiotiques utilisée pour l'éradication d'*H. pylori* (Marshall *et al.*, 1984). Par conséquent, il s'en est suivi une explosion de la résistance à cet antibiotique (Miendje *et al.*, 2011).

La résistance au MTZ est supérieure à 50% dans la majeure partie du monde, mais il semble qu'elle soit en baisse dans le nord de l'Europe (Ierardi *et al.*, 2013). Selon le rapport du consensus de Maastricht III (Delchier, 2006), le MTZ ne devrait pas être utilisé avant le test de sensibilité aux antibiotiques des patients originaires d'Asie et d'Afrique.

### C. Résistance aux fluoroquinolones

Les FLU sont les antibiotiques de choix pour le traitement séquentiel, surtout dans les régions à haute prévalence de résistance à la CLA. Cependant, la résistance d'*H. pylori* aux FLU est en augmentation ces dernières années.

Dans cette étude, le taux de résistance à la CIP est de 17.9%. Ce résultat est plus élevé que celui trouvé au Maroc (11%) (Bouihat *et al.*, 2017), au Sénégal (15%) (Seck *et al.*, 2013), en France (15.4%) (Ducournau *et al.*, 2016), en Europe (14.1%) (Megraud *et al.*, 2013), et inférieur que celui trouvé en Espagne (38.7%) (Macías-García *et al.*, 2017) au Congo (50%) (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015) et en Chine (28%) (Hu *et al.*, 2017a).

Le taux de la résistance d'*H. pylori* au CIP est élevé en Italie (44.28%) (Di Giulio *et al.*, 2016) et en Chine (43.20%) (Shao *et al.*, 2017). Toutefois, en Suède un taux très inférieur a été reporté (3.3%) (Doorakkers *et al.*, 2017).

## Résultats et discussion

---

Cette augmentation du taux de résistance peut être expliquée par l'utilisation des FLU pour le traitement des infections urinaires et d'autres maladies infectieuses en Algérie et à travers le monde. Le rapport du Consensus de Maastricht IV/Florence recommande que l'utilisation empirique du levofloxacin, doit être abandonnée quand la prévalence de la résistance atteint 15% (Malfertheiner *et al.*, 2017).

### D. Résistance aux tétracyclines

L'utilisation fréquente des TET semble être associée à l'apparition d'un nombre croissant d'isolats résistants d'*H. pylori*. En conséquence, il est très important d'évaluer la perte potentielle de son efficacité. Dans notre étude, nous n'avons trouvé que deux isolats résistants à la TET.

Dans d'autres études, ils ont aussi trouvé un nombre réduit d'isolats résistants à cet antibiotique, au Niger (4.5%) (Harrison *et al.*, 2017), au Congo (2.5%) (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015) et en Chine (1.9%) (Liu *et al.*, 2017). Par contre, au Maroc et en Island, ils n'ont trouvé aucun isolat résistants à cet même antibiotique (Bouihat *et al.*, 2017 ; Gunnarsdottir *et al.*, 2017).

### E. Résistance à l'amoxicilline et à la rifampicine

Aucune résistance à l'AMX ou à la RIF n'a été observée au sein de la population étudiée. Les résultats de la résistance à l'AMX que nous avons trouvé, sont similaires à ceux publiés par Raaf *et al.* (2017) en Algérie et par Ferenc *et al.* (2017) en Pologne. En Chine et en Asie pacifique, ils ont confirmé que la prévalence de la résistance à l'AMX ne dépasse pas les 4% (Kuo *et al.*, 2017 ; Liu *et al.*, 2017). Par contre, des taux de résistance très élevés ont été enregistrés en Afrique (33.3%) (Harrison *et al.*, 2017).

L'AMX est couramment utilisée en Algérie mais l'absence de résistance peut être expliquée par la complexité des mécanismes associés à la résistance à l'AMX (mutations du gène *pbp*, l'altération de la perméabilité membranaire, pompes efflux, etc...).

Les souches résistantes à la RIF sont rares; ceci fut confirmé par plusieurs études, montrant qu'aucune résistance à la RIF n'existe à Alger (Raaf *et al.*, 2017). Juste 17 isolats sur 1117 patients ont été résistants en Chine (1.5%) (Liu *et al.*, 2017). Par ailleurs, une étude en Allemagne a montré que le taux de résistance à la RIF avait augmenté de 3.9% à 18.8% entre 2002 et 2015 (Regnath *et al.*, 2017). Cet antibiotique est rarement utilisé pour le

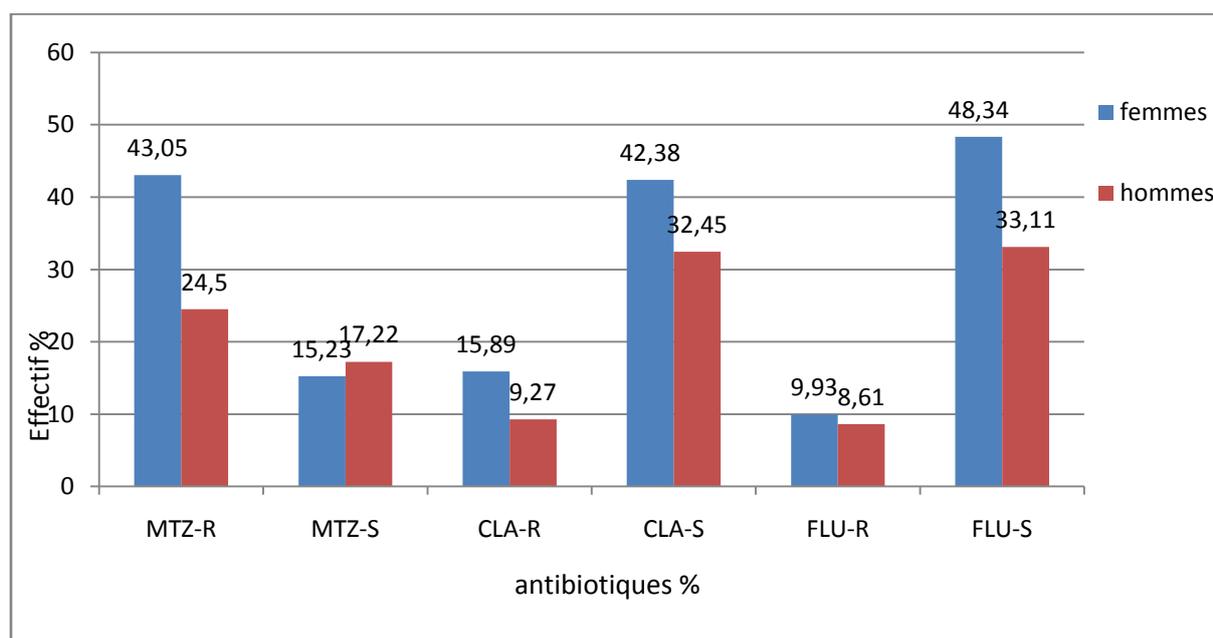
## Résultats et discussion

traitement d'éradication d'*H. pylori* ce qui explique l'absence de souches résistantes en Algérie.

### V.1.4.1. Résistance aux antibiotiques et sexe

Dans cette étude, aucune différence significative de la prévalence de la résistance d'*H.pylori* aux antibiotiques n'a été mise en évidence selon le sexe ( $p > 0.05$ ) (annexe 04). Le taux de la résistance à la CLA a été de 15.9% chez les femmes et de 9.3% chez les hommes. Le taux de la résistance aux FLU a été de 9,3% chez les femmes et de 8,6% chez les hommes. La prévalence de la résistance à ces deux antibiotiques est indépendante du sexe des patients ( $p > 0.05$ ) (figure 08).

Dans le cas du MTZ, le taux de la résistance a été plus élevé chez les femmes (43.05%) que chez les hommes (24.5%) ( $p = 0.05$ ) (figure 08). L'utilisation de cet antibiotique pour le traitement des infections gynécologiques peut être en relation avec ce taux élevé de la résistance chez les femmes.



**Figure 08.** Le taux de la résistance aux antibiotiques en fonction du sexe des patients.

Glupczynski (1992) et Banatvala *et al.* (1994) ont confirmé que les isolats résistants au MTZ sont rencontrés plus fréquemment chez les femmes que chez les hommes et chez les patients non originaires de l'Europe. L'étude de Koletzko *et al.* (2006) confirme aussi que le MTZ est plus fréquemment prescrit pour les infections gynécologiques et parasitaires en Afrique et en Asie.

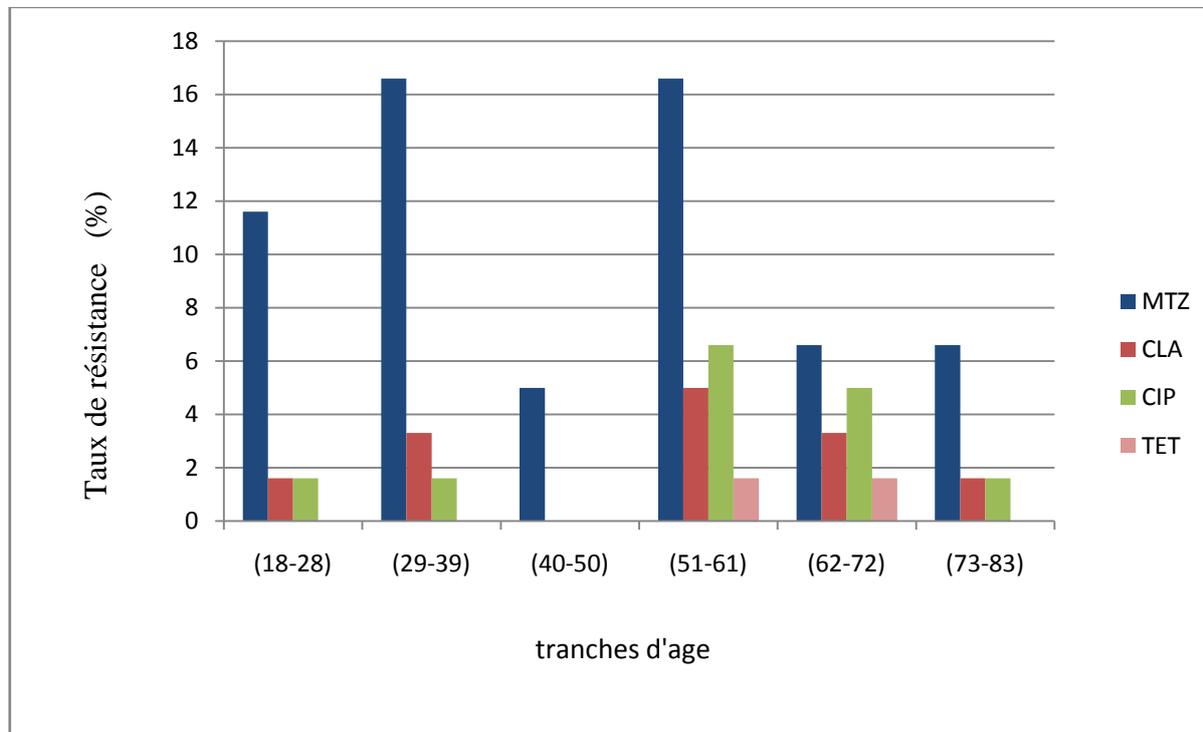
## Résultats et discussion

### V.1.4.2. Résistance aux antibiotiques et âge des patients

La prévalence de la résistance d'*H.pylori* aux antibiotiques augmente dans la tranche d'âge allant de 18 à 39 ans puis régresse dans la tranche d'âge allant de 40 à 50 ans et augmente à nouveau dans la tranche d'âge allant de 51 à 61 ans (figure 09).

La répartition de la résistance aux antibiotiques n'est pas uniforme, pour certains antibiotiques, comme la TET, nous remarquons que la résistance à cet antibiotique apparaît dans les tranches d'âge allant de 51 à 72 ans (figure 09). Pour la CLA et la CIP, nous constatons que le taux de résistance à ces deux antibiotiques est plus élevé dans les tranches d'âge allant de 51 à 72 ans (figure 09). En Algérie, ces familles d'antibiotiques sont largement utilisées pour traiter les problèmes respiratoires.

Nous n'avons pas trouvé de différence significative entre la prévalence de la résistance d'*H.pylori* aux antibiotiques et l'âge des patients ( $P>0.05$ ) (annexe 04), ce qui est identique aux résultats de nombreuses études montrant que la résistance d'*H. pylori* aux antibiotiques est indépendante du sexe et de l'âge (Wüppenhorst *et al.*, 2014 ; Ji *et al.* 2016 ; Park *et al.* 2017 ; Regnath *et al.*, 2017).



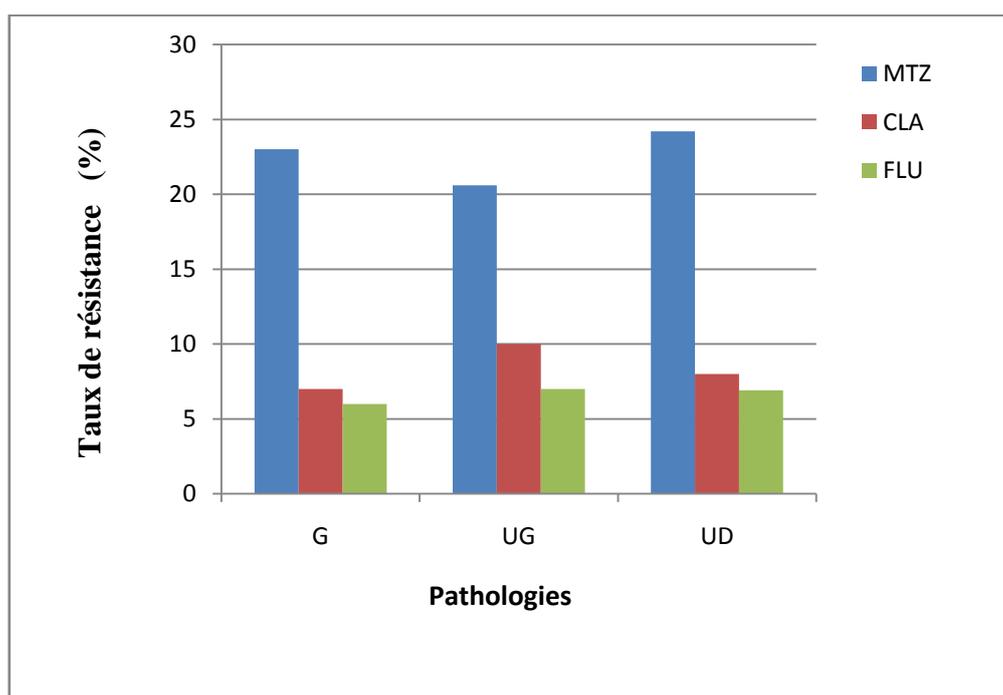
**Figure 09.** Le taux de la résistance aux antibiotiques en fonction de l'âge des patients.

## Résultats et discussion

### V.1.4.3. Résistance aux antibiotiques et pathologie

Plusieurs études ont montré que l'ulcère duodéal et les dyspepsies non ulcéreuses doivent être traités et pris en charge différemment à cause de la relation possible entre la pathologie gastrique et la résistance aux antibiotiques.

Aucune différence significative n'a été trouvée entre les pathologies gastroduodénales et la résistance aux antibiotiques ( $p > 0.05$ ) (annexe 04). Les taux de la résistance au MTZ, à la CLA et aux FLU sont presque similaires quelque soit la pathologie (figure 10). Les taux de la résistance au MTZ ont été de 23% parmi les gastrites, de 20.6% parmi les ulcères gastriques et de 24.2 parmi les ulcères duodénaux. Les taux de la résistance à la CLA ont été de 7% parmi les gastrites, de 10% parmi les ulcères gastriques et de 8% parmi les ulcères duodénaux. Les taux de la résistance aux FLU ont été les plus faibles (6% parmi les gastrites, de 7% parmi les ulcères gastriques et de 6.9% parmi les ulcères duodénaux).



**Figure 10.** Le taux de la résistance aux antibiotiques en fonction des pathologies.

G : gastrite, UG : ulcère gastrique et UD : ulcère duodéal.

La majorité des études ont mentionné que la prévalence de la résistance d'*H. pylori* aux antibiotiques est indépendante des pathologies gastroduodénales (Ben Mansour *et al.* 2010 ; Ji *et al.* 2016).

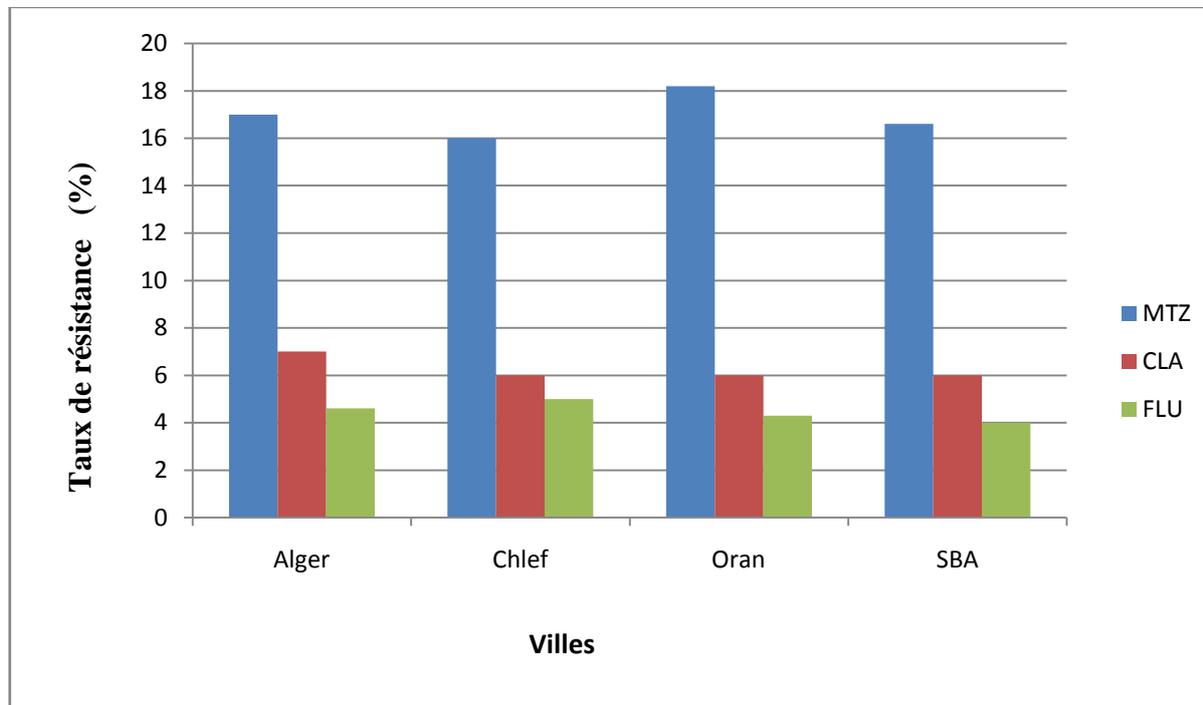
## Résultats et discussion

### V.1.4.4. Résistance aux antibiotiques et provenance des patients

Notre étude a été menée dans 4 différentes villes de l'Algérie pour déceler les différences possible dans la prise en charge et le traitement d'éradication d'*H. pylori*. Les résultats n'ont montré aucune différence significative entre la prévalence de la résistance d'*H. pylori* et les différentes villes ( $p > 0.05$ ) (annexe 04) (figure 11).

Les taux de résistance des différents antibiotiques sont presque similaires dans toutes les villes. La résistance au MTZ est plus élevée à Oran (18.2%), la résistance à la CLA est plus élevée à Alger (7%) et la résistance aux FLU est plus élevée à Chlef (5%). Ces résultats confirment que le profil d'utilisation des antibiotiques dans le traitement d'éradication d'*H. pylori* est similaire dans les quatre villes. Ces quatre villes sont proches et ne représentent que deux régions de l'Algérie ; de plus l'effectif de l'échantillonnage était peut être insuffisant pour détecter des différences significatives entre ces villes.

Ben Mansour et ces collègues (2010) ont trouvé le même résultat en Tunisie sur un effectif égal au notre. Par contre, les résultats d'une autre étude en Chine, effectuée sur 1117 patients, ont été hautement significatifs (Liu *et al.*, 2017).



**Figure 11.** Le taux de la résistance aux antibiotiques en fonction de la provenance des patients.

## Résultats et discussion

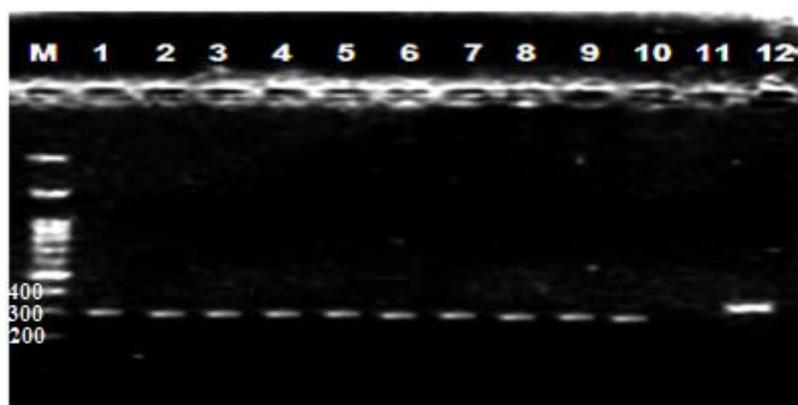
### V.1.5. La détection moléculaire d'*H. pylori*

L'isolement d'*H. pylori* nécessaire pour la mise en œuvre des antibiogrammes est très difficile. Par ailleurs, les méthodes moléculaires, grâce à leur sensibilité, sont les méthodes de choix pour la détection bactérienne et la détermination de la résistance aux antibiotiques.

En utilisant la PCR, *H. pylori* a été détecté dans 228 cas (84.4%). Les deux gènes *ARNr 16S* et *glmM* ont été détectés dans tous les échantillons *H.pylori*-positifs et dans 20 biopsies négatives en culture (figure 12 et 13). Le taux de prévalence trouvé, en utilisant la PCR (84.4%), est plus élevé que celui trouvé en culture (78.5 %). Ceci est dû à la sensibilité et la spécificité de la PCR.

L'infection à *H. pylori* représente la maladie infectieuse chronique la plus répandue dans le monde, affectant plus de la moitié de la population mondiale. La prévalence d'*H. pylori* diffère d'une manière significative entre les pays, et en utilisant la culture ou la PCR. Dans de nombreuses études, le taux de la prévalence de cette infection détecté par PCR, a été plus élevé qu'en culture (Sugimoto *et al.*, 2009 ; Raaf *et al.*, 2017).

Nous avons pu amplifier un fragment de 294pb de taille, correspondant au gène *glmM*, à partir de tous les isolats (puit 1-10 ; figure 12). En parallèle, nous avons aussi pu amplifier ce fragment à partir de 20 biopsies négatives en culture, ce qui confirme la présence d'*H. pylori* dans ces biopsies. Durant toute la période de l'expérimentation, les contrôles négatifs n'ont jamais abouti à une amplification de ce fragment du gène *glmM* (figure 12).



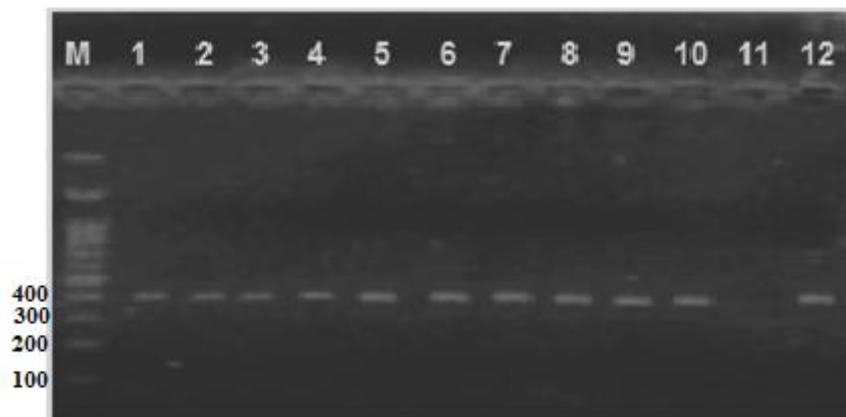
**Figure 12.** Profil électrophorétique de la PCR du gène *glmM*.

Puit M, 100 bp marqueur de taille; puit 1 à 10 isolats S1, S5, S14, C2, C3, C4, R1, R2, R3, R4, A1, A3, A4, A8, A9; puit 11 contrôle négatif, puit 12 contrôle positive.

## Résultats et discussion

Le gène *glmM* est hautement conservé et a été largement utilisé pour l'identification d'*H. pylori*. (Contreras *et al.*, 2017). L'un des avantages de l'utilisation de ce gène pour l'identification d'*H. pylori*, directement à partir des biopsies gastriques, est sa sensibilité et sa spécificité avec un taux de détection de 10 à 100 cellule d'*H. pylori* dans un échantillon de biopsie, ce qui est bien meilleur que l'histopathologie et la culture (Linpisarn *et al.*, 2005; Diouf *et al.*, 2009).

Nous avons pu amplifier un fragment de 399pb de taille, correspondant à une région du gène *ARNr 16S* hautement conservée chez *H. pylori* (puit 1-10 ; figure 13). En parallèle, nous avons aussi pu amplifier ce fragment à partir de 19 biopsies négatives en culture, ce qui confirme la présence d'*H. pylori* dans ces biopsies. Durant toute la période de l'expérimentation, les contrôles négatifs n'ont jamais abouti à une amplification de ce fragment (figure 13).



**Figure 13.** Profil électrophorétique du gène *ARNr 16S*.

Puit M, 100 bp marqueur moléculaire; puit 1 à 10 isolats S1, S5, S14, C2, C3, C4, R1, R2, R3, R4, A1, A3, A4, A8, A9; puit 11 contrôle négatif, puit 12 contrôle positif.

Dans notre étude, la détection du gène *ARNr 16S* a été d'une même sensibilité que du gène *glmM* (figure 12 et 13). Hoshina *et al.* (1990) ont aussi utilisé ce gène pour la détection spécifique d'*H. pylori*. La spécificité de la détection d'*H. pylori* rapportée par Hoshina et ses collègues est similaire à notre résultat.

## Résultats et discussion

### V.1.6. La détection moléculaire des facteurs de virulence

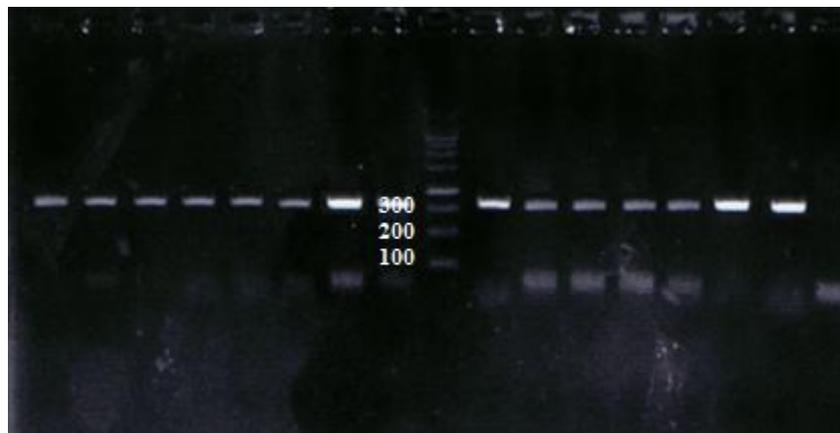
Aujourd'hui, la présence des gènes de virulence chez *H. pylori* est devenue une évidence. La combinaison des différents génotypes chez une souche colonisant un patient, affecte considérablement le développement de la maladie gastrique.

Certaines caractéristiques de souches *H. pylori* ont été associées avec la progression de l'infection vers des pathologies très sévères. Quelques génotypes, comme les allèles *s1* et *m1* du gène *vacA* et la présence du gène *cagA*, sont considérés comme des marqueurs de pathogénicité depuis leur association avec la production de cytotoxines et l'induction de lésions épithéliales et des réactions inflammatoires sévères.

#### V.1.6.1. La détection du gène *cagA*

En effet, nous notons que plus de la moitié des souches ont le gène *cagA*. Ce gène est associé aux pathologies les plus sévères. Nos résultats montrent que les sujets, infectés par *H. pylori* en Algérie, risquent de développer des pathologies gastriques graves.

Le *CagA* a été identifié chez 58% des patients. Un fragment de 439pb de taille a été amplifié à partir des échantillons *cagA*- positifs (figure 14),



**Figure 14.** Profil électrophorétique de la PCR du gène *cagA*.

Ce résultat est similaire à celui obtenu en Thaïlande (56.8%) (Subsomwong *et al.* 2017), supérieur à celui obtenu en Italie (48%) (Fasciana *et al.*, 2015) et inférieur à celui obtenu en Tunisie (61.6%) (Ben Mansour *et al.*, 2010) et en Inde (77.27%) (Pandya *et al.*, 2017). Le taux de souches *cagA*-positives est très élevé au Japon (73.3 %), ce qui est en relation avec le taux élevé du cancer gastrique dans ce pays (Fujiya *et al.*, 2014).

## Résultats et discussion

### V.1.6.2. La détection du *vacA*

Parmi les isolats d'*H. pylori* obtenus, dans cette étude, 98% étaient *vacA*-positifs dont 59.88% étaient *vacA s1m1*, 17.96% étaient *s1m2* et 22.15% étaient *s2m2*. La virulence de l'isolat a une forte relation avec la combinaison mosaïque des régions alléliques *s* et *m* du gène *vacA*. Le type de combinaison est responsable de la production de la cytotoxine vacuolisante.

La figure 15 représente les différentes combinaisons alléliques du gène *vacA* trouvées. Dans les puits 2, 3 et 8, l'allèle *vacA s1m1* a été amplifié donnant un fragment de 259pb (*s1*) et un autre fragment de 567pb (*m1*). Dans les puits 4 et 5, l'allèle *s2m2* a été amplifié donnant un fragment de 285pb (*s2*) et un autre fragment de 642pb (*m2*). En fin, dans les puits 6 et 7 l'allèle *s1m2* a été amplifié donnant un fragment de 259pb (*s1*) et un autre fragment de 642pb (*m2*).



**Figure 15.** La détection des alleles du gène *vacA* par PCR.

Puits 1, 100 bp marqueur de taille; puits 2 et 3 et 8 *vacA s1m1*; puits 4 et 5 *s2m2*; puits 6 et 7 *vacA s1m2* et puits 8 control positif *vacA s1m1* (souche J99). Taille des alleles (*s1*: 259pb, *s2*:285pb, *m1*:567pb et *m2*:642pb)

Dans cette étude, la combinaison allélique prédominante a été *s1/m1* (59.88%). Ce résultat est en accord avec d'autres études. En Italie, au Brésil, et au Mexique, *vacA s1/m1* étaient le génotype prédominant (Fasciana *et al.*, 2015 ; Vinagre *et al.*, 2015 ; Román-Román *et al.*, 2017) .

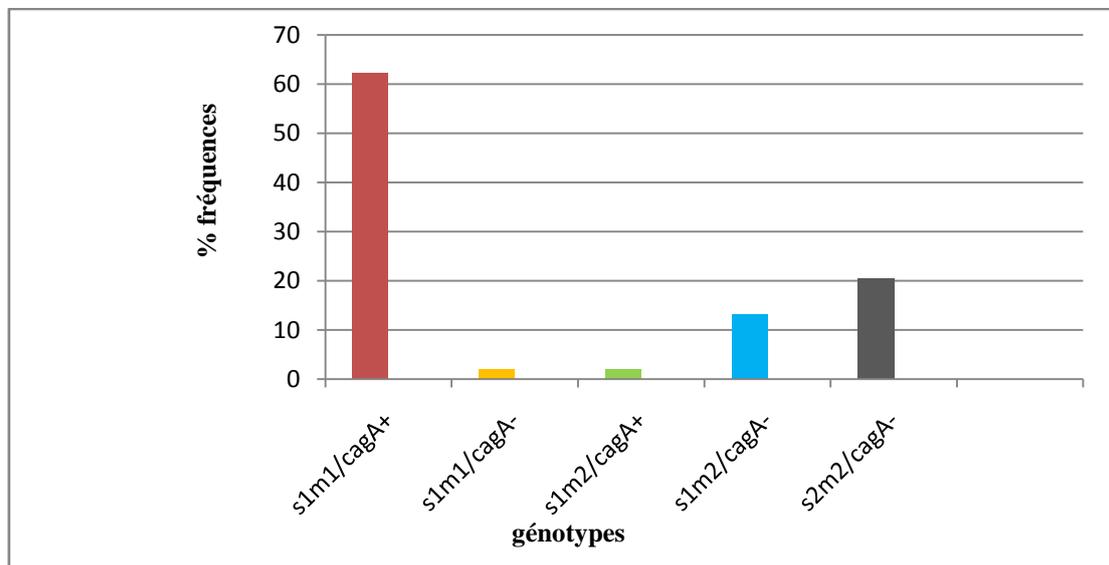
De nombreuses études ont prouvé qu'il y a une forte association entre la présence de souches *H. pylori* possédant un génotype *vacA* actif (*s1/m1*) chez des individus et le développement de pathologies gastriques sévères. Par contre, chez des individus infectés par

## Résultats et discussion

des souches possédant un génotype *vacA* moins ou non actif, les pathologies gastriques sont moins sévères (Memon *et al.*, 2014 ; Thi Huyen Trang *et al.*, 2016).

### V.1.6.3. La combinaison des génotypes *cagA* et *vacA* des isolats

Pour la combinaison des deux facteurs de pathogénicité *cagA* et *vacA*, nous avons trouvé que le génotype prédominant est le génotype *s1m1/ cagA+* (62.22%) suivi par le génotype *s1m1/ cagA-* (1.96%) et le génotype *s1m2/ cagA+* (1.96%), puis par le génotype *s1m2/ cagA-* (13.23%) et en fin par le génotype *s2m2/ cagA-* (20.44%) (figure16). Les pourcentages ont été calculés à partir du nombre total des biopsies. Aucune relation entre les facteurs de virulence n'a été décrite ( $p > 0,05$ ) (annexe 04).



**Figure16.** Fréquences des combinaisons des génotypes *vacA* et *cagA*.

Ces résultats concordent avec ceux publiés en Amérique Latine, où les souches *cagA+/s1m1* sont plus fréquentes chez les patients brésiliens et mexicains (Wang *et al.*, 2015 ; Thi Huyen Trang *et al.*, 2016). En plus, cette combinaison est la plus prévalente en Asie (Memon *et al.*, 2014).

*CagA* est le plus souvent associé au génotype *vacA s1*, particulièrement chez les patients atteints d'ulcère peptique ou de cancer gastrique. D'autre part, le génotype *cagA+ vacA s1* est présent chez les patients montrant une haute expression du tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 (TRAF1), du tumor necrosis factor receptor superfamily member 9 (4-1BB) et du B-cell lymphoma-extra-large (Bcl-xL). Ces facteurs sont associés aux mécanismes de carcinogénèse (Wang *et al.*, 2015).

## Résultats et discussion

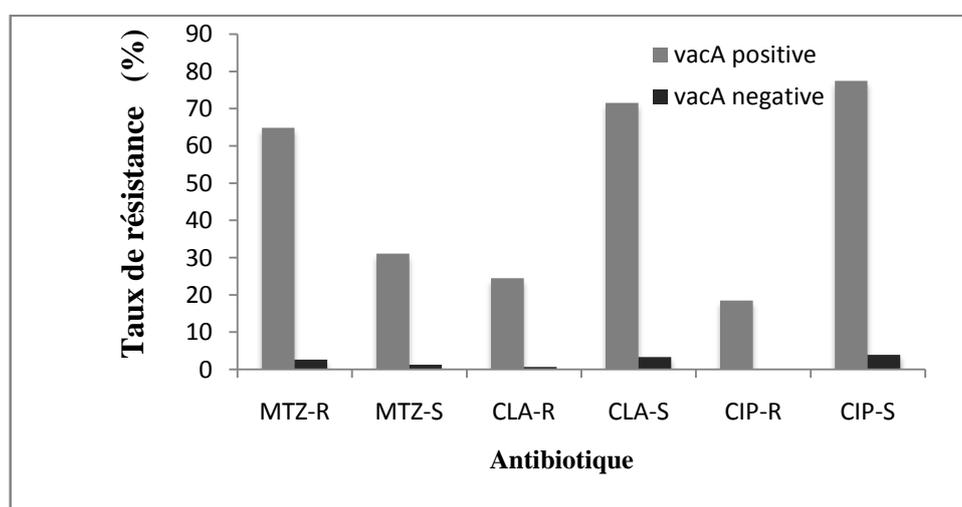
Dans cette étude, nous avons sélectionné des patients souffrants de douleurs abdominales hautes ; ce qui explique les taux bas de *cagA* (58%) et de *s1/m1* (59.88%). Selon Vinagre et *al.*, (2015), dans les pays où la prévalence de ces génotypes est très élevée, le taux des pathologies sévères comme le cancer augmente considérablement.

### V.1.6.4. La relation de la résistance aux antibiotiques avec la présence des facteurs de virulence.

La résistance d'*H. pylori* aux antibiotiques ne cesse d'augmenter. Les cliniciens cherchent toujours à prédire le comportement d'*H. pylori* vis-à-vis des antibiotiques. Certaines recherches ont été menées pour déterminer la relation possible entre la résistance aux antibiotiques et les facteurs génétiques bactériens.

Dans notre étude, aucune relation statistiquement significative n'a été trouvée entre la présence du génotype *vacA* ou le génotype *cagA* et la résistance aux antibiotiques ( $P > 0.5$ ).

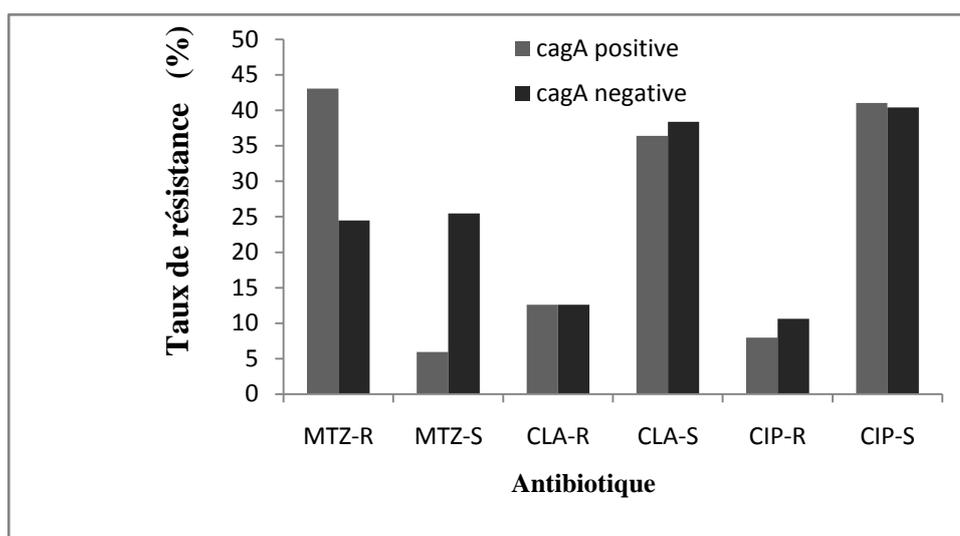
Les fréquences de la résistance à la CIP, à la CLA et au MTZ chez les souches *H. pylori* - *vacA* positives sont respectivement, 18.54%, 24.5% et 64.9%. Alors que, les fréquences de la résistance à ces antibiotiques chez les souches *H. pylori* - *vacA* négatives sont respectivement, 0.66%, 2.65% et 0% (figure 17). Ces résultats ne décrivent aucune relation possible entre la présence du *vacA* et la résistance aux antibiotiques étudiés.



**Figure 17.** Prévalence de l'antibio-résistance chez les isolats *vacA* positifs et *vacA* négatifs. (MTZ-R) metronidazole résistant; (MTZ-S) metronidazole sensible; (CLA-R) clarithromycine résistant; (CLA-S) clarithromycine sensible; (CIP-R) ciprofloxacine résistant; (CIP-S) ciprofloxacine sensible.

## Résultats et discussion

Les fréquences de la résistance à la CIP, à la CLA et au MTZ chez les souches *H. pylori* - *cagA* positives sont respectivement, 7.95%, 12.58% et 43.05%. Alors que, les fréquences de la résistance à ces antibiotiques chez les souches *H. pylori* - *cagA* négatives sont respectivement, 12.58%, 24.5% et 10.06% (figure 18). Ces résultats ne décrivent aucune relation possible entre la présence du *cagA* et la résistance aux antibiotiques étudiés ; sauf dans le cas du MTZ, pour lequel nous avons trouvé que la résistance à cette antibiotique est associée à la présence du génotype *cagA* ( $P=0,001$ ) (annexe 04).



**Figure 18.** Prevalence de l'antibio-résistance chez les isolats *cagA* positifs et *cagA* négatifs. (MTZ-R) metronidazole résistant; (MTZ-S) metronidazole sensible; (CLA-R) clarithromycine résistant; (CLA-S) clarithromycin sensible; (CIP-R) ciprofloxacine résistant; (CIP-S) ciprofloxacine sensible.

Dans notre étude, la relation des facteurs de virulence et la résistance aux antibiotiques n'a décrit aucun rôle direct des gènes *vacA* et *cagA*. Ces résultats concordent avec les résultats de Ghotaslou *et al.* (2013).

Le génotype *vacA s1m1/cagA+* est associé aux pathologies gastriques les plus sévères. Ceci est due au fait que les souches possédant ce génotype, causent une sévère inflammation avec une augmentation de la production de  $IL-1\beta$  et  $TNF-\alpha$ , induisant l'inhibition de la sécrétion de l'acide hydrochlorique et une élévation du pH gastrique. Ces conditions favorisent l'action des antibiotiques.

Dans notre étude, la résistance au MTZ est en relation avec la présence du génotype *cagA* (tableau 15), ce résultat est en désaccord avec celui publié par Khan *et al.* (2012), Maev *et*

## Résultats et discussion

---

Andreev (2017) ; ils ont trouvé que l'absence du gène *cagA* contribue à l'acquisition de résistance aux antibiotiques.

Apparemment, les patients infectés par des souches résistantes *vacA s1m1/cagA+* sont susceptibles de devenir plus difficiles à éradiquer ce qui va contribuer à la progression vers des lésions plus sévères. Ainsi, dans cette population, les patients infectés avec des souches résistantes *vacA s1m1 / cagA +* sont exposés à un risque accru de pathologies sévères par rapport aux patients infectés par des souches *vacA s1m1 / cagA-* ou *vacA s2m2 / cagA-*, mais tous doivent être étroitement surveillés.

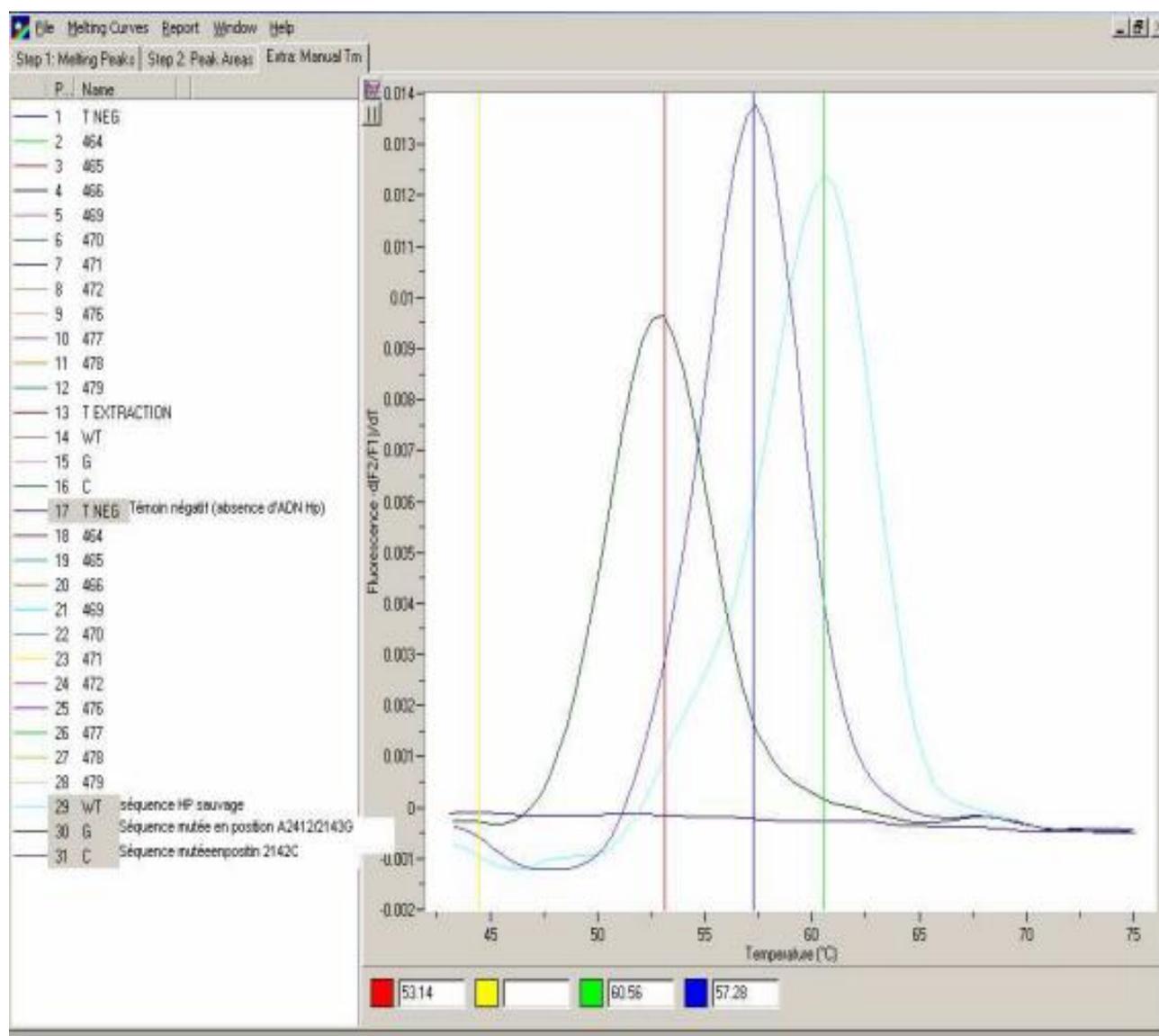
### **V.2. La détection moléculaire des mutations associées à la résistance aux antibiotiques**

#### **V.2.1. Détermination de la présence d'*H. pylori* et les mutations associées à la résistance aux macrolides**

La PCR en temps réel est une innovation dans le diagnostic d'*H. pylori* car elle permet non seulement la détection rapide et précise de la bactérie, mais également la détection d'éventuelles mutations associées à la résistance aux macrolides (Mégraud et al., 2015). Dans notre étude, La PCR en temps réel, effectuée en utilisant l'ADN total des biopsies, a détecté la présence d'*H.pylori* dans 232 cas (86%) incluant les 212 biopsies positives en culture.

L'analyse des courbes de fusion de l'ADN des contrôles positifs ont produit trois différentes courbes, avec des températures de fusion ( $T_m$ ) proches de 60, 56 et 52°C correspondantes au génotype sauvage (wild-type), mutant A2142C et mutant A2143G, respectivement (figure 19).

## Résultats et discussion

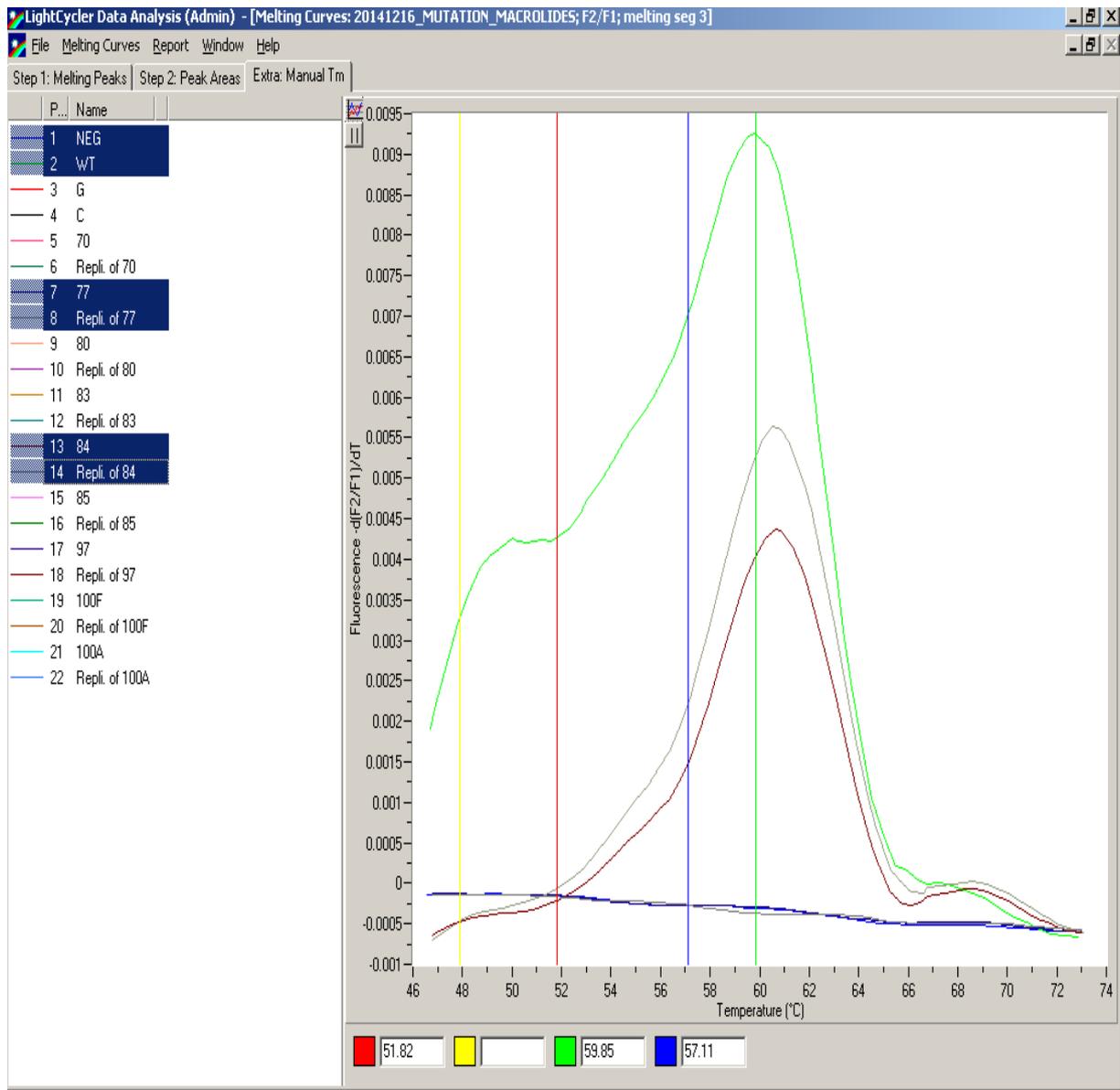


**Figure 19.** Courbes de fusion de la PCR en temps réel pour détecter les mutations associées à la résistance à la CLA. NEG : contrôle négatif ; WT : contrôle génotype sauvage ; G : contrôle génotype A2143G ; C : contrôle génotype A2142C.

Concernant, les échantillons de biopsies, cette PCR en temps réel a été capable de détecter les mutations associées à la résistance à la CLA chez 69 biopsies des 232 *H.pylori* positives (29.7%). Dans 53 cas correspondant à un phénotype résistant, les résultats de cette PCR concordent parfaitement avec le phénotype trouvé en utilisant l'E-test.

## Résultats et discussion

A partir des 212 biopsies positives en culture, 159 pics de fusion caractéristiques du génotype sauvage ont été trouvés (figure 20), à une température de fusion égale à 60°C. Ce résultat correspond parfaitement aux phénotypes sensibles trouvés par E-test (tableau 16).

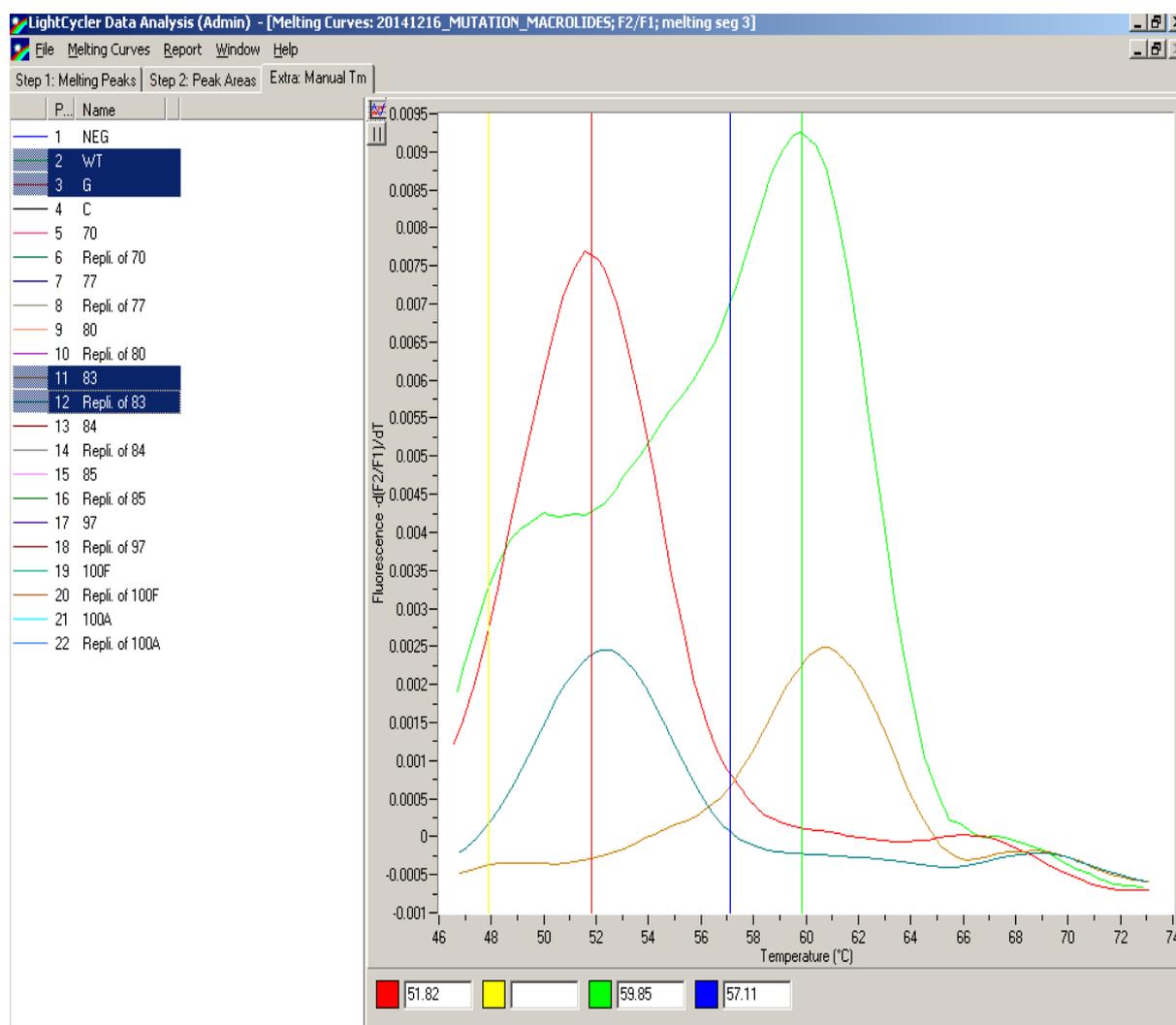


**Figure20.** Courbes de fusion de la PCR en temps réel pour détecter les mutations associées à la résistance à la CLA (génotypes sauvages). NEG : contrôle négatif ; WT : contrôle génotype sauvage ; 77, 84 : biopsies à analyser génotypes sauvages.

## Résultats et discussion

La transition adénine en guanine, que ce soit en position 2142 ou 2143, a été détecté dans 69 biopsies, La transition adénine en cytosine en position 2142 n'a pas été détecté (figure 20) et chez 20 d'autres cas, la PCR en temps réel a détecté 16 génotypes résistants et 4 sauvages, bien que la culture soit négative.

Dans 42 biopsies de patients infectés par des isolats résistants, un génotype sauvage a été présent simultanément avec le génotype résistant. Dans le cas de la biopsie 83, nous avons obtenu deux températures de fusion différentes, 60°C correspondante au génotype sauvage et 52°C correspondante au génotype mutant A2143G (figure 21) (Tableau 16).



**Figure 21.** Courbes de fusion de la PCR en temps réel pour détecter les mutations associées à la résistance à la CLA dans le cas de doubles populations. WT : contrôle génotype sauvage ; G : contrôle génotype A2143G ; 83 : biopsies à analyser génotype sauvage + génotype A2143G.

## Résultats et discussion

**Tableau 16.** Mutations de l'ARNr 23S associées à la résistance à la CLA.

Phenotype genotype	No. & (%) of biopsies (n: 232)	sauvage	A2142/43G	A2142C
Susceptible	163 (70.3)	+	-	-
Resistant	69(29.7)*	-	+	-

\* inclus 42 cas avec une double population de génotype sauvage et mutant.

La mutation A2143G est la plus fréquente dans notre étude. Plusieurs travaux soutiennent que cette mutation joue un rôle majeur dans la résistance à la CLA (Mégraud, 2004 ; Seck *et al.*, 2013 ; Miftahussurur *et al.*, 2016; Miftahussurur *et al.* 2017).

La mutation A2142C n'a pas été détectée dans les échantillons de biopsies. Ce résultat est similaire à celui publié en Tunisie (Ben Mansour *et al.*, 2010), mais en U.S.A et au Brésil, ils ont trouvé que cette mutation est rare (Sanchez *et al.*, 2016 ; Chen *et al.*, 2017).

L'un des mécanismes de la résistance des macrolides (CLA) est la modification du site de fixation du ribosome, ce qui peut consister en un changement de la séquence des bases azotées de la sous unité 23S de l'ARNr. D'autre part, Tamayo *et al.* (2017) et Zerbetto De Palma *et al.* (2017) ont montré que la présence de la mutation ponctuelle A2143G, plutôt que les mutations A2142G et A2142C, réduit le taux d'éradication d'*H. pylori*.

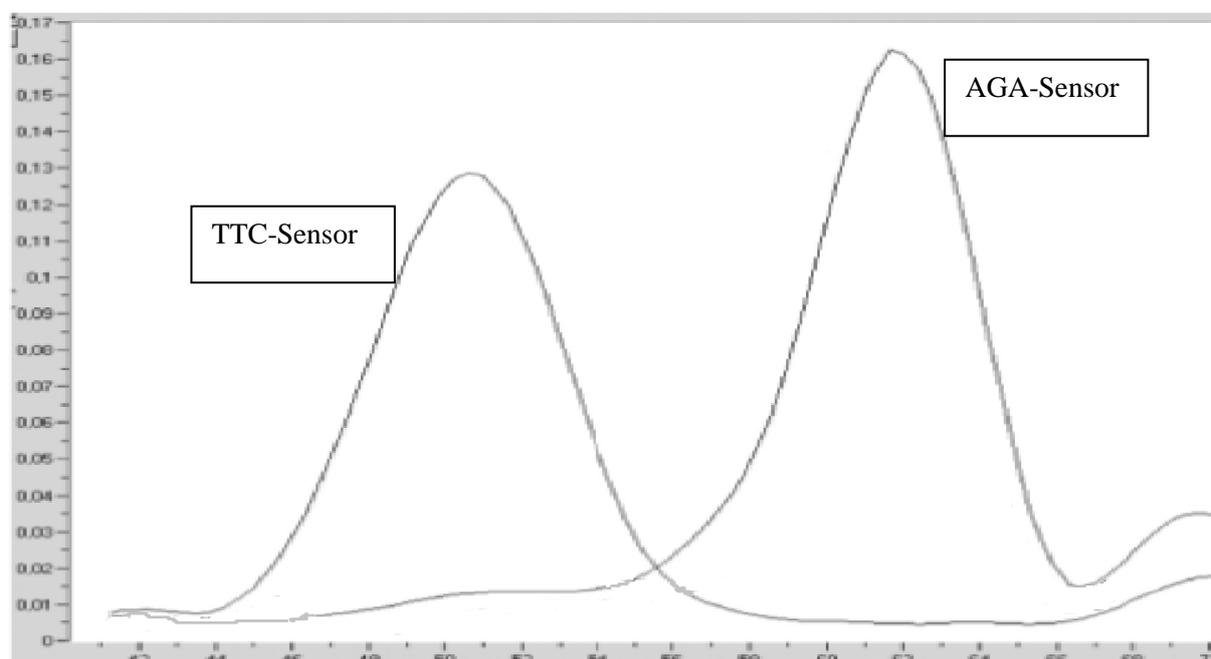
Les macrolides ciblent l'ARN ribosomique 23S. Une modification d'un nucléotide au niveau du domaine V de la boucle de la peptidyl-transférase, peut conduire à une résistance, car ils induisent une modification de la conformation du ribosome et diminue l'affinité des macrolides à l'ARN ribosomique 23S (Mégraud *et al.*, 2015). Il a été suggéré que la présence de la mutation *in vitro*, n'explique pas forcément l'acquisition d'une résistance *in vivo* (Ateka *et al.*, 2009).

### V.2.2. Détermination des mutations associées à la résistance à la tétracycline

Dans le cas des TET, la PCR en temps réel est capable aussi de détecter les mutations associées à la résistance à cette famille d'antibiotiques. Parmi les 212 isolats d'*H. pylori*, juste deux ont été résistants à la tétracycline avec une CMI de 1.5µg/ml. L'analyse des courbes de fusion, de la PCR en temps réel, de tous les échantillons, a montré deux températures de fusion correspondantes à deux différents génotypes. Les 230 échantillons de biopsies, possédant le génotype sauvage, ont montré une température de 61°C correspondante aux

## Résultats et discussion

nucléotides AGA926-928 (figure 22). Par contre, les deux biopsies correspondantes aux isolats résistants, ont montré une température de fusion de 50.8°C (figure 22).



**Figure 22.** Courbes de fusion de 16S-AGA-Sensor et 16S-TTC-Sensor de la PCR en temps réel pour détecter les mutations associées à la résistance à la tétracycline.

Le séquençage du fragment du gène de l'ARNr 16S a révélé une mutation A926G chez les deux mutants. La mutation détectée est une substitution de l'adénine par une guanine en position 926 (figure 23).

```

16S-880FW/999RV-Souche03A   TATAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGATACACGAAGA
16S-880FW/999RV-Souche38C   TATAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGATACACGAAGA
16S-880FW/999RV-souche14S   TATAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGATACACGAAGA
*****|*****

16S-880FW/999RV-Souche03A   ACCTTACCTAG
16S-880FW/999RV-Souche38C   ACCTACCT---
16S-880FW/999RV-souche14S   AC-----
**

```

**Figure 23.** Alignement multiple de la séquence 880-999 de l'ARNr 16S (Clustal Omega).

**16S-880FW/999RV-Souche03A** : génotype AGA sensible ; **16S-880FW/999RV-Souche38C** et **16S-880FW/999RV-souche 14S**: génotypes GGA résistants.

## Résultats et discussion

---

Dans cette étude, nous avons montré qu'à partir de 232 biopsies *H. pylori* positives, deux souches ont présenté la mutation A926G dans le gène *16S ARNr*. Cette mutation peut être à l'origine de la résistance aux TET. Ceci a été démontré par de nombreuses études, au Congo (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015), en Iran (Dadashzadeh *et al.*, 2014), et en Angleterre (sept isolats avec CMI de 0.75 à 4µg/ml) (Lawson *et al.*, 2005).

Selon Gerrits *et al.* (2002), Nishizawa et Suzuki (2014), Maev et Andreev (2017), la résistance aux TET est associée aux mutations du gène *16S ARNr*. Ils ont trouvé que la transformation de la souche *H. pylori* 26695 (CMI, 0.19µg/ml) avec l'ADN génomique de la souche 181 (CMI, 8µg/ml) abouti à l'apparition de colonies résistantes.

Les TET interfèrent dans la synthèse protéique au niveau du ribosome en se liant à la sous-unité 30S ; un changement dans le triplet de nucléotides (AGA 926) du gène de l'*ARNr 16S* a été associé à la résistance à cette famille d'antibiotique en raison d'un manque de liaison à la boucle h1, qui est le site de liaison des TET (Mégraud *et al.* 2015).

Le polymorphisme du gène codant pour la sous unité *16S* de l'*ARNr*, est une excellente cible pour la PCR en temps réel et permet de détecter les résistances aux antibiotiques, directement à partir de la biopsie gastrique sans culture. Cette méthode peut être utile surtout dans le cas des patients qui ont présenté un échec au traitement d'éradication (Mégraud *et al.* 2015).

### V.2.3. Détermination des mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones

#### V.2.3.1. Séquençage de la région QRDR du gène *gyrA*

Le séquençage de la région QRDR du gène *gyrA*, nous a permis de déterminer les mutations en positions 87 et 91 (figure 24). Nous avons obtenu une parfaite concordance entre les deux tests phénotypiques (E-test) et génotypiques (séquençage).

La région QRDR présente un motif caractéristique en acides aminés « NAVYDAL ». Les deux acides aminés concernés dans ce cas sont l'asparagine « N » et l'acide aspartique « D ». Nos résultats ont montré que deux mutations sont impliquées, la substitution de l'asparagine « N » par la lysine « K » ou l'isoleucine « I » et la substitution de l'acide aspartique « D » par l'asparagine « N » ou la glycine « G » (figure 24).

## Résultats et discussion

```

Modèle-sauvage_QRDR  -----LTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELVDGQGN
dna36R-qrdr          ---MHEIGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDIAVYDALVRMAQDFSMRLELVDGQGN
dna63A-qrdr          ---MHEIGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDKAVYDALVRMAQDFSMRLELVDGQGN
dna42C-qrdr          ---MHEIGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYNALVRMAQDFSMRLELVDGQGN
dna43A-qrdr          LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDIAVYDALVRMAQDFSMRLELVDGQGN
dna25S-qrdr          LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDIAVYNALVRMAQDFSMRLELVDGQGN
dna14C-qrdr          LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDIAVYGALVRMAQDFSMRLELVDGQGN
*****

Modèle-sauvage_QRDR  FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIDKDTIDFVPNYDDLK
dna36R-qrdr          FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDID-----
dna63A-qrdr          FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDID-----
dna42C-qrdr          FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDID-----
dna43A-qrdr          FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIDKDTIDF-----
dna25S-qrdr          FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIDKDTIDF-----
dna14C-qrdr          FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIDKDTIDF-----
*****

```

**Figure 24.** Alignement multiple d'une partie de la séquence protéique du gène *gyrA*(Clustal Omega).

Modèle-sauvage\_QRDR modèle : sauvage contient le motif NAVYDAL ; **dna36R-qrdr** : substitution de l'asparagine par l'isoleucine en position 87, mutant résistant ; **dna63A-qrdr** : substitution de l'asparagine par la lysine en position 87, mutant résistant; **dna42C-qrdr** : substitution de l'acide aspartique par l'asparagine en position 91, mutant résistant ; **dna43A-qrdr** : substitution de l'asparagine par la thréonine en position 87, sauvage sensible ; **dna25S-qrdr** : substitution de l'asparagine par la thréonine en position 87 et l'acide aspartique par l'asparagine en position 91, mutant résistant ; **dna14C-qrdr** substitution de l'asparagine par la thréonine en position 87 et l'acide aspartique par la glycine en position 91, mutant résistant.

Dans notre étude, la mutation la plus fréquente a été la substitution N87K, présente chez 44.73% de cas, suivie par la substitution D91N présente chez 23.68% de cas puis la substitution N87I présente chez 18.42% de cas. La mutation la moins fréquente a été la substitution D91G présente chez 7.89% de cas (tableau 17).

Deux isolats résistants (CMI 1.5 et 2µg/mL) n'ont présenté aucune mutation dans la région QRDR. Les isolats présentant les mutations en position 87 ont été caractérisés par des CMI élevées (CMI >8µg/ml) (Tableau 17). Les isolats sensibles n'ont présenté aucune mutation dans la région QRDR, mais nous avons trouvé 42 isolats sensibles avec une séquence N87T (ACC), caractéristique d'un génotype sauvage.

## Résultats et discussion

**Tableau 17.** Les mutations dans la région QRDR du gène *gyrA* des isolats résistants.

Patients N/total (%)	CMI (µg/mL)	Nucleotides	<i>gyrA</i> mutation
7/38 (18.42)	8-32	AAC - <b>ATC</b>	N87I
17/38 (44.73)	8-32	AAC - <b>AAA</b>	N87K
9/38 (23.68)	2-8	GAT- <b>AAT</b>	D91N
3/38 (7.89)	2	GAT- <b>GGT</b>	D91G

Dans cette étude, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre la présence d'une mutation donnée et le degré de résistance. Les 34 isolats résistants aux FLU portent une mutation de la région QRDR du gène *gyrA*, déjà décrite dans la bibliographie (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015 ; Sanches *et al.*, 2016 ; Miftahussurur *et al.* 2017).

Les mutations N87K et D91N ont été les plus fréquentes, ceci concorde avec les résultats d'autres études (Trespacios-Rangél *et al.*, 2016 ; Zerbetto De Palma *et al.*, 2017). Comme les deux isolats, résistants à la ciprofloxacine, n'ont montré aucune mutation dans la région QRDR, nous supposons qu'une autre mutation ou un autre mécanisme peuvent être impliqués.

D'autre part, les degrés les plus élevés de résistance ont été observés dans les mutations N87I et D91G (CMI de 32µg/ml). D'autres études en Afrique, en Asie et en Europe confirment ce résultat (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015 ; Miftahussurur *et al.* 2017 ; Zamani *et al.* 2017).

Les FLU ont une très bonne activité contre les bactéries Gram-négative et Gram-positive (Cammarota *et al.*, 2000 ; Bogaerts *et al.*, 2006). Leur mode d'action est l'inhibition de la topo isomérase bactérienne type II, nommée ADN gyrase.

Le mécanisme le plus fréquent de résistance aux FLU est la survenue de mutations ponctuelles des gènes codants pour l'ADN gyrase (*gyrA*). L'absence d'une cible secondaire pour les FLU implique que de petites modifications touchant le gène *gyrA*, peuvent être suffisantes pour rendre *H.pylori* résistante à cette famille d'antibiotiques (Miyachi *et al.*, 2006 ; Cattoir *et al.*, 2007 ; Liou *et al.*, 2015 ; Mégraud *et al.*, 2015).

## Résultats et discussion

### V.2.4. Détermination des mutations associées à la résistance au MTZ

Dans cette étude nous avons évalué les variations dans le gène *rdxA* et les altérations en acides aminés de la chaîne peptidique correspondante.

Parmi les souches résistantes aux MTZ étudiées, 14.1% ont montré la présence d'un peptide RdxA tronqué (figure 25). La cause de cette terminaison prématurée est due à l'introduction d'un codon stop en substitution d'un seul acide aminé.

```
dna28C-rdxA      MKFLDQEKRKQLLNERHSCKMFDSHYEFSSTELEEIAEIALRSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna01C-rdxA      MKFLDQEKRKQLLNERHSCKMFDSHYEFSSTELEEIAEIALRSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna14C-rdxA      MKFLDQEKRKQLLNERHSCKMFDSHYEFSSTELEEIAEIALRSPSSYNT-----
dna07A-rdxA      MKFLDQEKRK-----
dna12R-rdxA      MKFLDQEKRKQLLNER-----
dna21C-rdxA      MKFLDQEKRKQLLNERHSCKMFDSHYEFSSTELEEIAEIALRSPSSYNTQPWHFVMVDKD
***** ;

dna28C-rdxA      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQNLYPESYKVRVISFAQMLG
dna01C-rdxA      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQNLYPESYKVRVISFAQMLG
dna14C-rdxA      -----
dna07A-rdxA      -----
dna12R-rdxA      -----
dna21C-rdxA      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQNLYPESYKVRVISFAQMLG

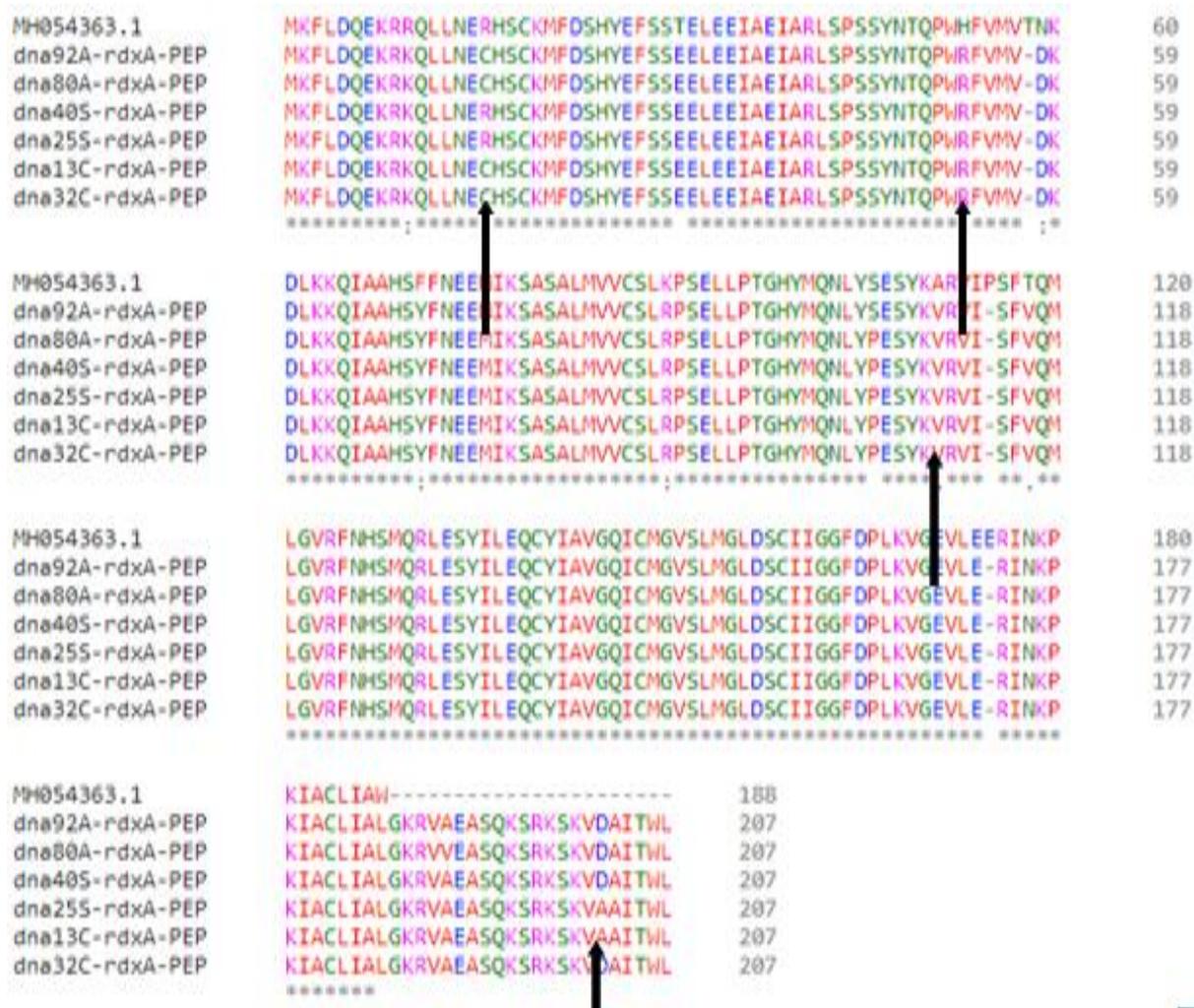
dna28C-rdxA      VRF-----
dna01C-rdxA      VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPLKVGEVLERINKPKIA
dna14C-rdxA      -----
dna07A-rdxA      -----
dna12R-rdxA      -----
dna21C-rdxA      VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMG-----

dna28C-rdxA      -----
dna01C-rdxA      CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna14C-rdxA      -----
dna07A-rdxA      -----
dna12R-rdxA      -----
dna21C-rdxA      -----
```

**Figure 25.** Alignement multiple de séquences RdxA des isolats résistants avec un arrêt prématuré de la traduction de la séquence protéique(Clustal Omega).

En plus des peptides tronqués, 8.9% des échantillons ont montré des insertions/délétions de nucléotides, codant pour un peptide RdxA complet. Alors que, le reste des isolats (13%) n'ont montré aucune modification de la séquence *rdxA*. Les mutations les plus fréquentes ont été trouvées dans les positions A111V (53.3%), H53R (23.7%), R16C (11%) et A202D (4%) (figure26).

## Résultats et discussion



**Figure 26.** Alignement multiple de séquences RdxA des isolats résistants avec différentes mutations (Clustal Omega).

Nous n'avons pu déterminer aucune corrélation entre le degré de résistance au MTZ et le type ou le nombre des mutations trouvées. La corrélation entre les mutations du gène *rdxA* et la résistance au MTZ chez *H. pylori* a été démontrée dans de nombreuses études et ce particulièrement par Min et al. (2017). Beaucoup de mutations ponctuelles existent dans le gène *rdxA* mais leurs positions ne sont pas uniformes à travers les différentes régions géographiques. En Egypte (Ramzy et al. 2016), en Colombie (Acosta et al. 2017) et en Chine (Yue et al. 2014), plusieurs mutations ont été décrites.

Dans une autre étude effectuée par Butlop et al. (2016), Ils ont trouvé que d'autres mutations sont impliquées (D59N, T31E et R131K). En particulier, les mutations nonsense ont été plus fréquentes chez les isolats avec des CMI élevées (32 g/ml), ce phénomène a été aussi décrit par Secka et al. (2013) en Gambie.

## Résultats et discussion

Comme prévu, dans cette étude nous avons pu démontrer que les isolats résistants possèdent des mutations aléatoires et très variées. Par ailleurs, quelques isolats n'ont présenté aucune modification de la séquence de ce gène, ce qui peut être expliqué par le fait que d'autres enzymes redox sont impliqués dans la résistance. Ces observations ont été décrites par nombreuses études ; l'inactivation du *rdxA* ne conduit pas essentiellement à la résistance au MTZ, ceci peut être due à une augmentation du taux d'expression du gène *frxA* nitroreductase (Secka *et al.*, 2013 ; Ramzy *et al.* 2016).

L'action antimicrobienne du MTZ est dépendante de l'activation réductive de ce dernier par le system redox de la cellule cible. Toute molécule cellulaire ayant un potentiel d'oxydoréduction plus négative que celui du MTZ, va donner un électron à ce dernier, ce qui va conduire à une activation réductive. La RdxA nitroréductase convertit le MTZ pro drogue en un mutagène et un hydroxylamine endommageant l'ADN (Martínez-Júlvez *et al.* 2012 ; Mégraud *et al.*, 2015). Tous les facteurs influençant l'activité de cette enzyme peuvent contribuer à la résistance au MTZ.

### V.2.5. Détermination des mutations associées à la résistance à la rifampicine

Dans cette étude, nous n'avons trouvé aucune résistance à la RIF sauf que deux isolats ont montré une CMI (0.75 mg/L) proche de la limite de la résistance. Pour évaluer les changements possibles à l'origine du changement de l'affinité de la RIF et l'ARN polymérase ADN-dépendante, nous avons procédé par un séquençage de la région RRDR du gène *rpoB*. La comparaison de la séquence peptidique des deux isolats et la séquence d'une souche de référence sensible, n'a révélé aucune modification (figure 27).

```
NP_207989.1      VKMQKTIKDKLTTMSGAFDSLMPHDLVNSKMITSTIMEFFMGGQLSQFMDQTNPLSEVTH
A12-FrpoB-RrpoB-PEP  -----MGGQLSQFMDQTNPLSEVTH
C08-FrpoB-RrpoB-PEP  -----MGGQLSQFMDQTNPLSEVTH
                                     *****

NP_207989.1      KRRLSALGEGGLVKDRVGF EARDVHPHYGRICPIETPEGQNI GLINTLSTFTRVNDLGF
A12-FrpoB-RrpoB-PEP  KRRLSALGEGGLVKDRVGF EARDVHPHYGRICPIETPEGQNI GLINTLSTFTRVN----
C08-FrpoB-RrpoB-PEP  KRRLSALGEGGLVKDRVGF EARDVHPHYGRICPIETPEGQNI GLINTLSTFTRVN----
                                     *****
```

**Figure 27.** Alignement multiple des séquences RRDR (Clustal Omega).

## Résultats et discussion

---

La résistance à la RIF est rare. Dans une étude au Japon, Sur 414 patients, ils ont trouvé un seul isolat résistant à la RIF avec des mutations ponctuelles (Nishizawa *et al.* 2011 ; Mégraud *et al.*, 2015). Généralement, les codons impliqués dans la résistance d'*H.pylori* à la RIF sont : le codon 149 (V149F) (Heep *et al.*, 2000) ou les codons 530, 538, 540, 525 (Hays *et al.*, 2017).

La rifabutine et les autres dérivés de la RIF sont des inhibiteurs d'*H.pylori* à de très basses concentrations *in vitro*. La triple thérapie incluant la rifampicine, l'amoxicilline, et un inhibiteur de la pompe à protons est très efficace pour l'éradication d'*H. pylori* après l'échec des autres thérapies ; spécialement dans le cas de la résistance aux autres antibiotiques.

La résistance à la RIF est due à un changement dans la séquence en acides aminés de la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase (*RpoB*). Les mutations des codons 146, 507 à 533, 563 à 572 et 687 du gène *rpoB* d'*Escherichia coli* ou des codons 507 à 533 du gène *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis*, sont la cause de la résistance (Nishizawa *et al.* 2011 ; Mégraud *et al.* 2015).

### V.3. Etude des populations multiples

#### V.3.1. Criblage des populations sensibles et résistantes à la CLA colonisant le même patient

Plusieurs méthodes ont été employées pour confirmer que *H. pylori* possède une très grande diversité. Ce polymorphisme est non seulement trouvé dans le génome d'*H. pylori* isolée de différents patients, mais aussi chez un même patient infecté par plusieurs populations d'*H. pylori*. Les facteurs de virulence et la résistance aux antibiotiques de cette bactérie ont été largement étudiés pour identifier la multiple colonisation chez le même individu. Mais ces deux variables sont insuffisantes pour déceler de minimes variations entre les souches présentes chez un même patient.

A partir des résultats de la PCR en temps réel et selon les résultats de la susceptibilité aux antibiotiques, 10 patients ont fait l'objet d'un criblage des populations d'*H. pylori* présentes chez chacun de ces patients.

Les colonies isolées à partir de l'échantillon de biopsie de chaque patient ont poussé soit sur le milieu de culture additionné de CLA (01mg/L), ce qui confirme leur résistance à cet antibiotique ou sur le même milieu exempt de CLA mais pas sur le milieu additionné de CLA, ce qui confirme leur sensibilité.

## Résultats et discussion

Les isolats résistants et sensibles du criblage issus du même patient ont été sélectionnés pour l'étude des populations multiples, étude de la susceptibilité aux antibiotiques, séquençage des gènes *gyrA* et *rdxA*, PCR en temps réel pour détecter les mutations du *ARNr 23S* et étude de polymorphisme par PCR-RAPD et PCR-RFLP.

Au total, 200 colonies ont été isolées, d'où 20 colonies pour chaque patient, 10 colonies sensibles et 10 colonies résistantes à la CLA. La sensibilité à la CLA a été testée pour déterminer la CMI exacte correspondante à chaque isolat. Tous les patients ont présenté au moins deux isolats avec des CMI différentes (tableau 18).

**Tableau18.** Nombre d'isolats et CMI correspondante à chaque isolat par patient après criblage des populations.

Patients	Résistants à CLA		Sensibles à CLA	
	Isolat	(CMI)	Isolat	(CMI)
Patient 1	14C-1	1.5 mg/L	14C-11	0.5 mg/L
	14C-2	1.5mg/L	14C-12	0.5 mg/L
	14C-3	1.5mg/L	14C-13	0.5 mg/L
	14C-4	1.5mg/L	14C-14	0.5 mg/L
	14C-5	4mg/L	14C-15	0.5 mg/L
	14C-6	4mg/L	14C-16	0.5 mg/L
	14C-7	4mg/L	14C-17	0.5 mg/L
	14C-8	4mg/L	14C-18	0.5 mg/L
	14C-9	4mg/L	14C-19	0.5 mg/L
	14C-10	4mg/L	14C-20	0.5 mg/L
Patient 2	25C-1	2mg/L	25C-11	0.75 mg/L
	25C-2	2mg/L	25C-12	0.75 mg/L
	25C-3	2mg/L	25C-13	0.75 mg/L
	25C-4	2mg/L	25C-14	0.75 mg/L
	25C-5	2mg/L	25C-15	0.75 mg/L
	25C-6	2mg/L	25C-16	0.75 mg/L
	25C-7	2mg/L	25C-17	0.75 mg/L
	25C-8	2mg/L	25C-18	0.75 mg/L
	25C-9	2mg/L	25C-19	0.75 mg/L
	25C-10	2mg/L	25C-20	0.75 mg/L
Patient 3	46C-1	1.5 mg/L	46C-11	0.032 mg/L
	46C-2	1.5 mg/L	46C-12	0.032 mg/L
	46C-3	1.5 mg/L	46C-13	0.032 mg/L
	46C-4	1.5 mg/L	46C-14	0.032 mg/L
	46C-5	1.5 mg/L	46C-15	0.032 mg/L
	46C-6	1.5 mg/L	46C-16	0.032 mg/L
	46C-7	1.5 mg/L	46C-17	0.032 mg/L
	46C-8	1.5 mg/L	46C-18	0.032 mg/L
	46C-9	1.5 mg/L	46C-19	0.032 mg/L
	46C-10	1.5 mg/L	46C-20	0.032 mg/L

## Résultats et discussion

Patient 4	03S-1	1.5 mg/L	03S-11	0.064 mg/L
	03S-2	1.5 mg/L	03S-12	0.064 mg/L
	03S-3	1.5 mg/L	03S-13	0.064 mg/L
	03S-4	1.5 mg/L	03S-14	0.064 mg/L
	03S-5	1.5 mg/L	03S-15	0.064 mg/L
	03S-6	1.5 mg/L	03S-16	0.064 mg/L
	03S-7	1.5 mg/L	03S-17	0.064 mg/L
	03S-8	1.5 mg/L	03S-18	0.064 mg/L
	03S-9	1.5 mg/L	03S-19	0.064 mg/L
	03S-10	1.5 mg/L	03S-20	0.064 mg/L
Patient 5	19S-1	8mg/L	19S-11	0.75 mg/L
	19S -2	8mg/L	19S -12	0.75 mg/L
	19S-3	8mg/L	19S-13	0.75 mg/L
	19S-4	8mg/L	19S-14	0.75 mg/L
	19S-5	8mg/L	19S-15	0.75 mg/L
	19S-6	8mg/L	19S-16	0.75 mg/L
	19S-7	8mg/L	19S-17	0.75 mg/L
	19S-8	8mg/L	19S-18	0.75 mg/L
	19S-9	8mg/L	19S-19	0.75 mg/L
	19S-10	8mg/L	19S-10	0.75 mg/L
Patient 6	07S-1	32 mg/L	07S-11	0.75 mg/L
	07S-2	32mg/L	07S-12	0.75 mg/L
	07S-3	32mg/L	07S-13	0.75 mg/L
	07S-4	32mg/L	07S-14	0.75 mg/L
	07S-5	32mg/L	07S-15	0.75 mg/L
	07S-6	32mg/L	07S-16	0.75 mg/L
	07S-7	32mg/L	07S-17	0.75 mg/L
	07S-8	32mg/L	07S-18	0.75 mg/L
	07S-9	32mg/L	07S-19	0.75 mg/L
	07S-10	32mg/L	07S-20	0.75 mg/L
Patient 7	22R-1	3 mg/L	22R-11	0.016 mg/L
	22R-2	3 mg/L	22R-12	0.016 mg/L
	22R-3	3 mg/L	22R-13	0.016 mg/L
	22R-4	3 mg/L	22R-14	0.016 mg/L
	22R-5	3 mg/L	22R-15	0.016 mg/L
	22R-6	3 mg/L	22R-16	0.016 mg/L
	22R-7	3 mg/L	22R-17	0.016 mg/L
	22R-8	3 mg/L	22R-18	0.016 mg/L
	22R-9	3 mg/L	22R-19	0.016 mg/L
	22R-10	3 mg/L	22R-20	0.016 mg/L
Patient 8	05S-1	4mg/L	05S-11	0.032 mg/L
	05S-2	4mg/L	05S-12	0.032 mg/L
	05S-3	4mg/L	05S-13	0.032 mg/L
	05S-4	4mg/L	05S-14	0.032 mg/L
	05S-5	4mg/L	05S-15	0.032 mg/L
	05S-6	4mg/L	05S-16	0.032 mg/L
	05S-7	4mg/L	05S-17	0.032 mg/L
	05S-8	4mg/L	05S-18	0.032 mg/L

## Résultats et discussion

	05S-9	4mg/L	05S-19	0.032 mg/L
	05S-10	4mg/L	05S-20	0.032 mg/L
Patient 9	16R-1	132 mg/L	16R-11	0.75 mg/L
	16R-2	132 mg/L	16R-12	0.75 mg/L
	16R-3	132 mg/L	16R-13	0.75 mg/L
	16R-4	132 mg/L	16R-14	0.75 mg/L
	16R-5	132 mg/L	16R-15	0.75 mg/L
	16R-6	132 mg/L	16R-16	0.75 mg/L
	16R-7	132 mg/L	16R-17	0.75 mg/L
	16R-8	132 mg/L	16R-18	0.75 mg/L
	16R-9	132 mg/L	16R-19	0.75 mg/L
	16R-10	132 mg/L	16R-20	0.75 mg/L
Patient 10	28R-1	1.5 mg/L	28R-11	0.016 mg/L
	28R-2	1.5 mg/L	28R-12	0.016 mg/L
	28R-3	1.5 mg/L	28R-13	0.016 mg/L
	28R-4	1.5 mg/L	28R-14	0.016 mg/L
	28R-5	1.5 mg/L	28R-15	0.016 mg/L
	28R-6	1.5 mg/L	28R-16	0.016 mg/L
	28R-7	1.5 mg/L	28R-17	0.016 mg/L
	28R-8	1.5 mg/L	28R-18	0.016 mg/L
	28R-9	1.5 mg/L	28R-19	0.016 mg/L
	28R-10	1.5 mg/L	28R-20	0.016 mg/L

Les isolats sensibles et résistants à la CLA ont fait l'objet d'une étude de la sensibilité au MTZ et au FLU ainsi que la détermination du génotype virulent (*vacA* et *cagA*).

Les résultats du criblage ont révélé que tous les patients étudiés sont porteurs d'au moins deux génotypes différents. Le patient 01 est colonisé par 5 différents génotypes en se basant sur la résistance ou la sensibilité à la CLA, au FLU et au MTZ ainsi que la présence ou l'absence du *cagA* et *vacA* (tableau 19).

Le patient numéro 06 est colonisé par 3 génotypes différents en se basant sur les mêmes critères, le reste des patients sont colonisés par deux génotypes différents sensibles ou résistants à la CLA seulement et les autres critères sont identiques (tableau 19).

## Résultats et discussion

**Tableau 19.** Résultats de la sensibilité aux antibiotiques et géotypage des isolats issu du criblage des doubles populations de chaque patient.

	Isolats	antibiotiques			Facteurs de virulence	
		CLA	MTZ	FLU	<i>vacA</i>	<i>cagA</i>
Patient 01	14C-1, 14C-2, 14C-3 et 14C-4	R	R	R	+	+
	14C-5, 14C-6, 14C-9 et 14C-10	R	R	S	+	+
	14C-7 et 14C-8	R	R	R	+	-
	14C-11, 14C-12, 14C-13, 14C-14 et 14C-15	S	R	S	+	+
	14C-16, 14C-17, 14C-18, 14C-19 et 14C-20	S	R	S	+	-
Patient 02	De 25C-1 à 25C-10	R	R	S	+	+
	De 25C-11 à 25C-20	S	R	S	+	+
Patient 03	De 46C-1 à 46C-10	R	R	S	+	+
	De 46C-11 à 46C-20	S	R	S	+	+
Patient 04	De 03S-1 à 03S-10	R	R	S	+	+
	De 03S-11 à 03S-20	S	R	S	+	+
Patient 05	De 19S-1 à 19S-10	R	R	S	+	-
	De 19S-11 à 19S-20	S	R	S	+	-
Patient 06	07S-1, 07S-2, 07S-3, 07S-4 et 07S-5	R	R	R	+	+
	07S-6, 07S-7, 07S-8, 07S-9 et 07S-10	R	S	R	+	+
	De 07S-11 à 07S-20	S	S	S	+	-
Patient 07	De 22R-10 à 22R-10	R	S	S	+	-
	De 22R-11 à 22R-20	S	S	S	+	-
Patient 08	De 05S-11 à 05S-20	R	R	S	+	+
	De 05S-11 à 05S-20	S	R	S	+	+
Patient 09	De 16R-1 à 16R-10	R	R	S	+	+
	De 16R-11 à 16R-20	S	R	S	+	+
Patient 10	De 28R-1 à 28R-10	R	S	S	+	-
	De 28R-11 à 28R-20	S	S	S	+	-

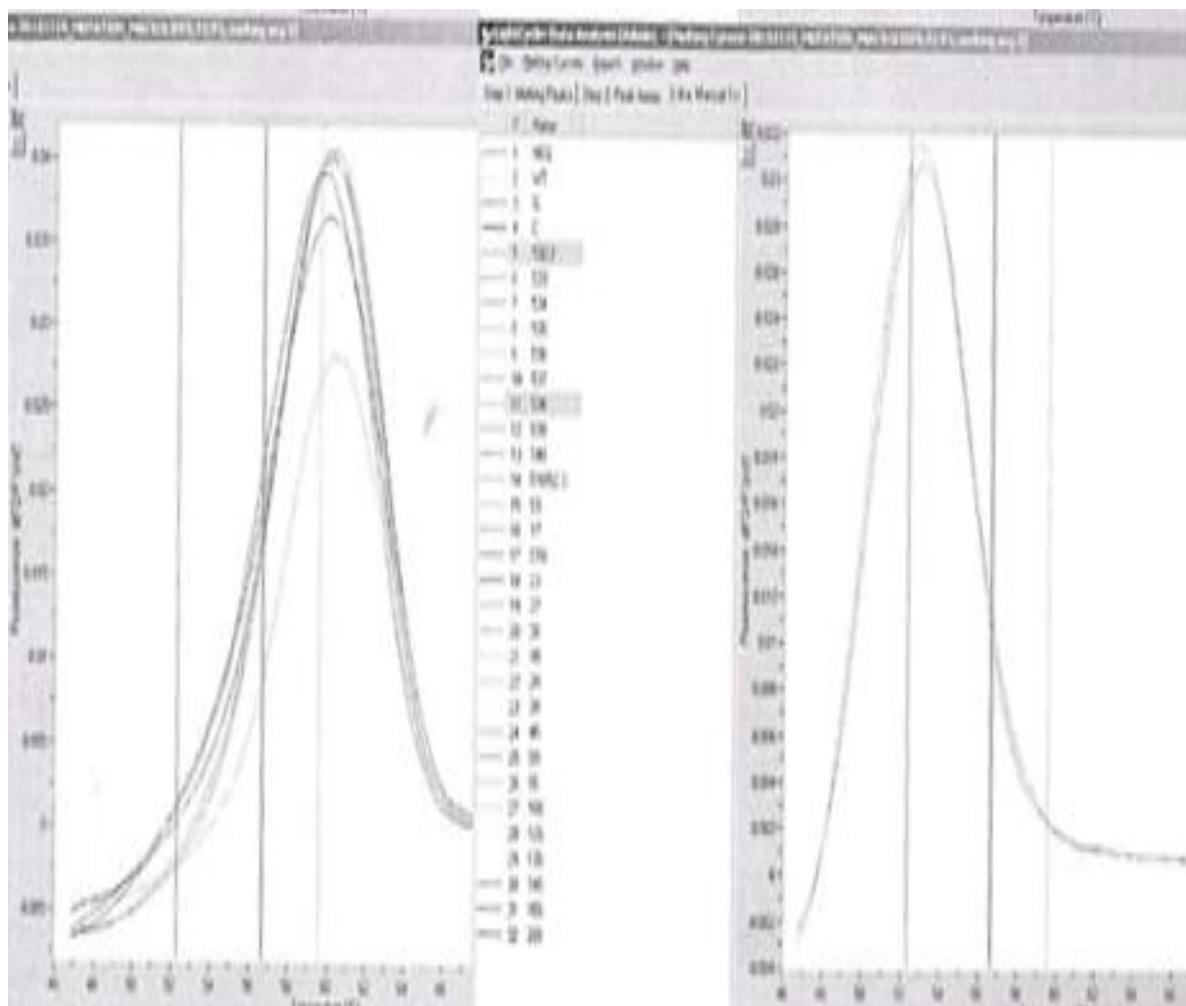
### V.3.1.1. Hétéro- résistance

#### A. Hétéro- résistance et mécanismes moléculaires associés à la résistance à la CLA

Les résultats de la PCR en temps réel, mise au point pour la détermination des mutations associées à la résistance aux macrolides après criblage ont montré que chaque isolat possède un seul géotype soit sauvage (isolat sensible) ou mutant A2143G (isolat résistant). Le phénomène observé, sur les courbes de fusion de la FRET-PCR, avant le criblage des isolats

## Résultats et discussion

(apparition de deux pics) (figure 28) a disparu ce qui prouve que l'opération a abouti à la séparation des deux génotypes sauvage et mutant.



**Figure 28.** Courbes de fusion de la PCR en temps réel pour détecter les mutations associées à la résistance à la CLA chez les isolats après criblage des doubles populations.

Plusieurs études ont montré que chez un même hôte, il peut exister deux différents génotypes, un sauvage sensible à la CLA et un autre mutant résistant (Kao *et al.*, 2014 ; Farzi *et al.* 2015). Ce phénomène est appelé hétéro-résistance.

### **B. Hétéro- résistance et mécanismes moléculaires associés à la résistance aux FLU**

Le séquençage de la région QRDR du gène *gyrA* des isolats sensibles et résistants à la CLA, après criblage, a montré que les isolats sensibles au FLU ne possédaient aucune mutation.

## Résultats et discussion

Par contre, les isolats résistants possédaient les mêmes mutations, trouvées avant le criblage, et ceux issus du même patient présentaient la même mutation. La comparaison de la séquence d'ADN et la séquence peptidique des isolats sensibles et résistants issus du même patient, n'a montré aucune différence notable (annexe03).

Ce résultat indique qu'il peut s'agir d'une même souche qui a développé une résistance à la CLA et a abouti à deux population : une sensible à la CLA et l'autre résistante. Ce phénomène a été déjà décrit dans d'autres travaux (Kao *et al.*, 2014 ; Farzi *et al.*, 2015 ; Hanafi *et al.*, 2016).

### C. Hétéro- résistance et mécanismes moléculaires associés à la résistance au MTZ

En ce qui concerne le MTZ, Le séquençage du gène *rdxA*, après criblage des isolats sensibles et résistants à la CLA, a montré que tous les isolats sensibles ou résistants au MTZ issus du même patient présentaient les mêmes mutations, sauf pour le patient 01 ou nous avons trouvé quelques variations entre les isolats résistants au MTZ. Les Isolats de C14-3 à C14-20 sont résistants au MTZ par terminaison prématurée de la traduction (apparition de codon stop) conduisant à un peptide tronqué. Alors que les isolats C14-1 et C14-2 sont résistants au MTZ par substitution d'acides aminés due à une mutation ponctuelle (figure 29).

```
dna14C-1-rdxA-PEP      MKFLDQEKRKQLLNECHSCKMFD SHYEFSSSEEEIEAEIARLSPSSYNTQPWRFVMDKD
dna14C-2-rdxA-PEP      MKFLDQEKRKQLLNECHSCKMFD SHYEFSSSEEEIEAEIARLSPSSYNTQPWRFVMDKD
dna14C-3-rdxA-PEP      MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-4-rdxA-PEP      MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-5-rdxA-PEP      MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-6-rdxA-PEP      MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-7-rdxA-PEP      MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-8-rdxA-PEP      MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-9-rdxA-PEP      MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-10-rdxA-PEP     MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-11-rdxA-PEP     MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-12-rdxA-PEP     MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-13-rdxA-PEP     MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-14-rdxA-PEP     MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-15-rdxA-PEP     MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-16-rdxA-PEP     MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-17-rdxA-PEP     MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-18-rdxA-PEP     MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-19-rdxA-PEP     MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-20-rdxA-PEP     MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFD SHYEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
*****

dna14C-1-rdxA-PEP      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPTGHYMQNLYSESYKVRVISFVQMLG
dna14C-2-rdxA-PEP      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPTGHYMQNLYSESYKVRVISFVQMLG
dna14C-3-rdxA-PEP      -----
dna14C-4-rdxA-PEP      -----
dna14C-5-rdxA-PEP      -----
dna14C-6-rdxA-PEP      -----
dna14C-7-rdxA-PEP      -----
dna14C-8-rdxA-PEP      -----
dna14C-9-rdxA-PEP      -----
dna14C-10-rdxA-PEP     -----
dna14C-11-rdxA-PEP     -----
dna14C-12-rdxA-PEP     -----
dna14C-13-rdxA-PEP     -----
dna14C-14-rdxA-PEP     -----
dna14C-15-rdxA-PEP     -----
dna14C-16-rdxA-PEP     -----
```

## Résultats et discussion

```
dna14C-17-rdxA-PEP -----
dna14C-18-rdxA-PEP -----
dna14C-19-rdxA-PEP -----
dna14C-20-rdxA-PEP -----

dna14C-1-rdxA-PEP VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDP LKVGEVLERINKPKIA
dna14C-2-rdxA-PEP VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDP LKVGEVLERINKPKIA
dna14C-3-rdxA-PEP -----
dna14C-4-rdxA-PEP -----
dna14C-5-rdxA-PEP -----
dna14C-6-rdxA-PEP -----
dna14C-7-rdxA-PEP -----
dna14C-8-rdxA-PEP -----
dna14C-9-rdxA-PEP -----
dna14C-10-rdxA-PEP -----
dna14C-11-rdxA-PEP -----
dna14C-12-rdxA-PEP -----
dna14C-13-rdxA-PEP -----
dna14C-14-rdxA-PEP -----
dna14C-15-rdxA-PEP -----
dna14C-16-rdxA-PEP -----
dna14C-17-rdxA-PEP -----
dna14C-18-rdxA-PEP -----
dna14C-19-rdxA-PEP -----
dna14C-20-rdxA-PEP -----

dna14C-1-rdxA-PEP CLIALGKRVAEASQSRKSKVDAITWL
dna14C-2-rdxA-PEP CLIALGKRVAEASQSRKSKVDAITWL
dna14C-3-rdxA-PEP -----
dna14C-4-rdxA-PEP -----
dna14C-5-rdxA-PEP -----
dna14C-6-rdxA-PEP -----
dna14C-7-rdxA-PEP -----
dna14C-8-rdxA-PEP -----
dna14C-9-rdxA-PEP -----
dna14C-10-rdxA-PEP -----
dna14C-11-rdxA-PEP -----
dna14C-12-rdxA-PEP -----
dna14C-13-rdxA-PEP -----
dna14C-14-rdxA-PEP -----
dna14C-15-rdxA-PEP -----
dna14C-16-rdxA-PEP -----
dna14C-17-rdxA-PEP -----
dna14C-18-rdxA-PEP -----
dna14C-19-rdxA-PEP -----
dna14C-20-rdxA-PEP -----
```

**Figure 29.** Alignement multiple des séquences peptidiques codées par le gène *rdxA* des isolats sensibles et résistants à la CLA du Patient 01 (Clustal Omega); Isolats De C14-3 à C14-20 résistants au MTZ par terminaison prématurée de la traduction (apparition de codon stop) ; C14-1 à C14-2 résistants au MTZ par mutations ponctuelles.

Ce résultat a été élucidé par la comparaison des séquences d'ADN et des séquences peptidiques correspondantes des isolats sensibles et résistants issus du même patient. En effet, ce résultat confirme qu'il s'agit des mêmes souches mais qui ont subi des modifications aboutissant à deux populations, une résistante à la CLA et l'autre sensible. Plusieurs travaux ont évoqué ce phénomène (Kao *et al.*, 2014 ; Farzi *et al.*, 2015 ; Hanafi *et al.*, 2016).

L'émergence de bactéries résistantes comme résultats d'adaptation aux antibiotiques, est sans doute un phénomène qui attire la préoccupation des spécialistes veillant sur la santé publique. Chez *H.pylori*, ces mutations jouent un rôle plus important que le transfert de gènes.

## Résultats et discussion

---

Plusieurs études ont montré que la résistance au MTZ chez *H. pylori* résulte de l'inactivation du gène *rdxA*. Les analyses de paires d'isolats MTZ-R et MTZ-S de patients individuels ont indiqué que les isolats MTZ-R nouvellement créés résultaient d'une substitution de bases azotées d'un autre isolat sensible, et non pas d'un transfert d'un déterminant de résistance préexistant dans une autre souche résistante (Goodwin *et al.*, 1998 ; Kao *et al.*, 2014 ; Farzi *et al.*, 2015).

Ces populations ont subi un typage pour voir s'il s'agit vraiment d'un même type d' *H. pylori* qui a développé une mutation, pour modifier la cible de l'antibiotique, ou s'il s'agit d'une infection mixte.

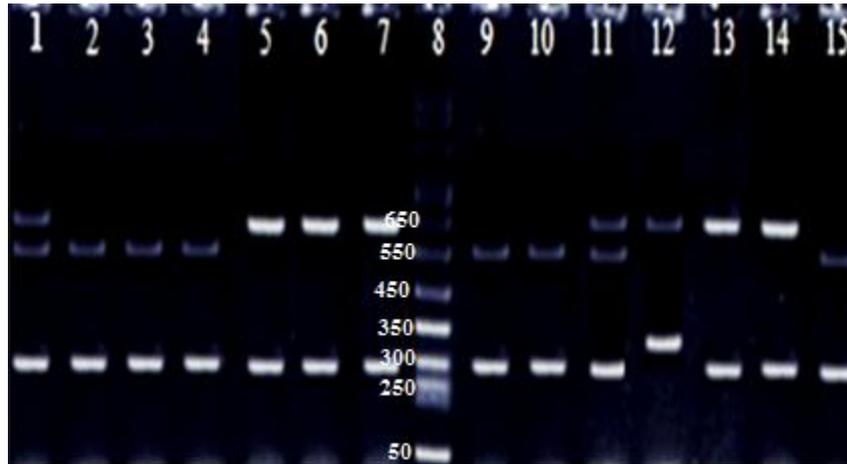
### V.3.1.2. Hétéro-résistance, quasi-espèce et infection mixte

La notion d'hétéro-résistance est définie comme la coexistence d'isolats sensibles et résistants au même antibiotique chez le même hôte. Ceci est un phénomène courant chez les populations d'*H. pylori* et peut être le résultat d'infections multiples (isolats non apparentés) ou de la présence de variants sensibles et résistants de la même souche (isolats apparentés) (De la Obra *et al.*, 2001). La raison pour laquelle, le prélèvement d'un seul fragment de biopsie n'est jamais représentatif dans le cas de l'étude de la sensibilité d'*H. pylori* aux antibiotiques. Surtout que cette bactérie n'est jamais distribuée d'une façon uniforme dans l'estomac. Ceci peut causer une sous-estimation de la résistance aux antibiotiques chez un patient.

Cette partie de ce travail a été consacrée pour l'étude de ce phénomène. La distinction des infections multiples a été faite en se basant sur la présence des facteurs de virulence (*cagA* et *vacA*) et l'étude du polymorphisme.

Concernant la présence du *vacA* et la distribution de ses allèles, avant le criblage des populations multiples, nous avons remarqué qu'en utilisant la PCR, l'un des deux allèles de la région *s* et *m* du gène *vacA* a été amplifié ou, comme le cas pour certains patients, les deux allèles de la région *s* ont été amplifiés pour un même patient (échantillon 1 et 11 ; figure 30).

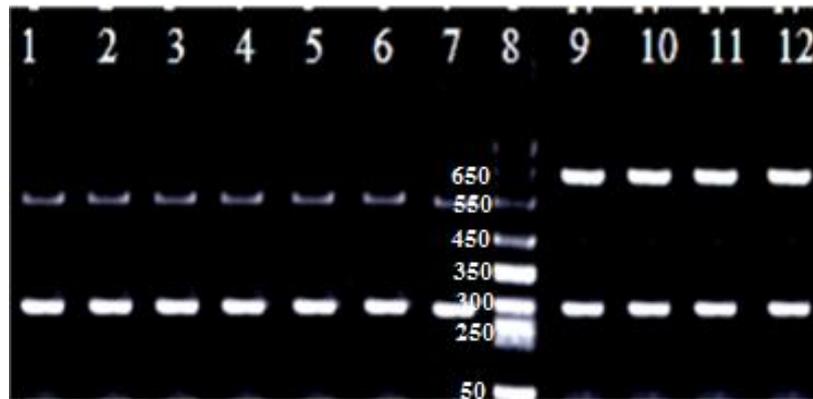
## Résultats et discussion



**Figure 30.** La détection des alleles *vacA* par PCR avant criblage.

Puits 8, 100 bp marqueur de taille; puits 1et 11: double population *vacA s1m1*et *vacA s1m2*; puits 15 : contrôle positif (souche J99). Taille des alleles (s1: 259pb, s2 :285pb, m1:567pb and m2 :642pb) .

Après criblage des populations, nous avons découvert qu'un même patient pouvait être infecté par deux génotypes différents tels que le patient 01. Ce patient possède un génotype *s1m1* et un autre *s1m2* (figure 31), ceci peut être du au fait que ce patient est soit infecté par deux souches différentes ou bien par la même souche qui a subi une recombinaison (Kuipers *et al.*, 2000 ; Blaser, 2012).

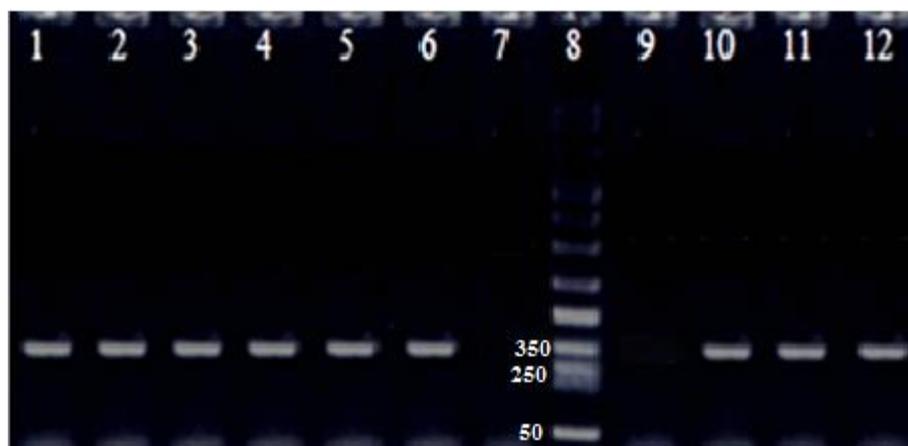


**Figure 31.** La détection des allèles *vacA* par PCR après criblage des populations issues du patient 01.

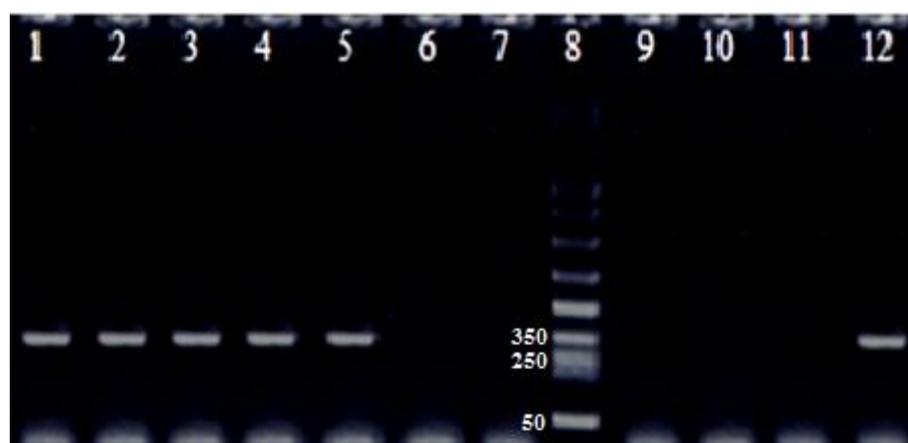
Puits 8, 100 bp marqueur de taille; puits 1à 7: génotype *vacA s1m1*; puits 9 à 11: génotype *vacA s1m1*. Taille des allèles (s1: 259pb, s2 :285pb, m1:567pb and m2 :642pb).

## Résultats et discussion

La recherche de la présence ou l'absence du *cagA*, chez les isolats issus du criblage a montré que chez un même patient, *H. pylori* peut exprimer le *cagA* ou pas (figure 32 et 33).



**Figure 32:** La détection du *cagA* par PCR après criblage de populations issues du patient 01, isolats résistants à la CLA. Puits 8, 100 bp marqueur de taille; puits 1 à 6, 10, 11 et 12: génotype *cagA* positif; Puits 7 et 9 : génotype *cagA* négatif.



**Figure 33:** La détection du *cagA* par PCR après criblage de populations issues du patient 01, isolats sensibles à la CLA. Puits 8, 100 bp marqueur de taille; puits 1 à 5: génotype *cagA* positif; Puits 6, 7, 9 à 12 : génotype *cagA* négatif.

Selon nos résultats, nous présumons que ce facteur de virulence est concerné par les recombinaisons. Plusieurs travaux ont montré que l'acquisition ou la perte de l'îlot de pathogénicité *cag-PAI* est possible (Kersulyte *et al.*, 1999; Jafri *et al.*, 2010). Par ailleurs, la contamination d'un patient par plusieurs souches différentes d'*H. pylori* est très fréquente. Surtout dans les pays en voie de développement où les conditions favorisent le transfert d'*H. pylori* entre les individus (Ozbey et Hanafiah, 2017).

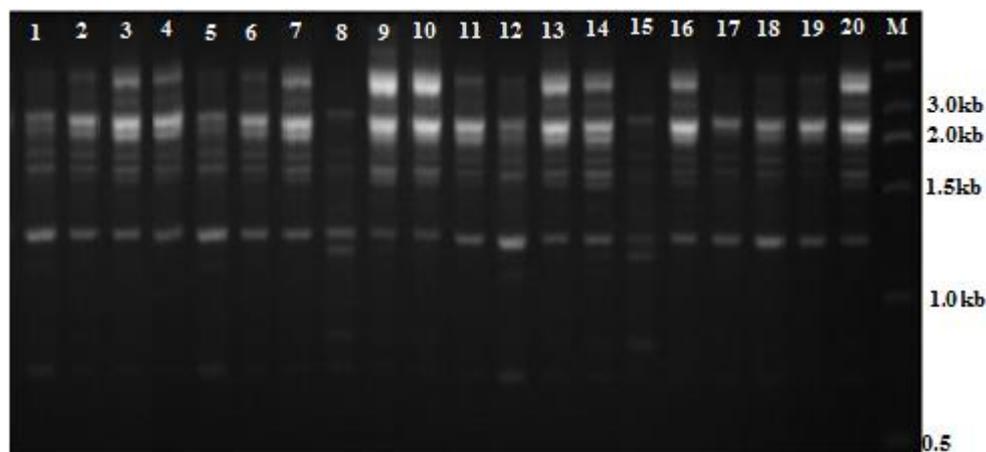
## Résultats et discussion

La PCR-RAPD est une technique qui peut déceler de minimes variations entre les souches bactériennes. Elle donne des profils spécifiques à chaque souche en se basant sur la présence de séquences particulières, en utilisant différentes amorces, dans l'ensemble du génome bactérien.

Les similitudes entre les isolats sensibles et résistants à la CLA du même patient, ont été vérifiées par deux amorces 1254 et 1281. Comme résultat, le taux de colonisation par de multiples génotypes d'*H. pylori* a été de 70%. Les profils RAPD des isolats ont été considérés comme étant du même type et de même génotype chez 3 patients seulement. Les isolats issus de ces patients diffèrent par un seul et unique critère, il s'agit de la résistance à la CLA.

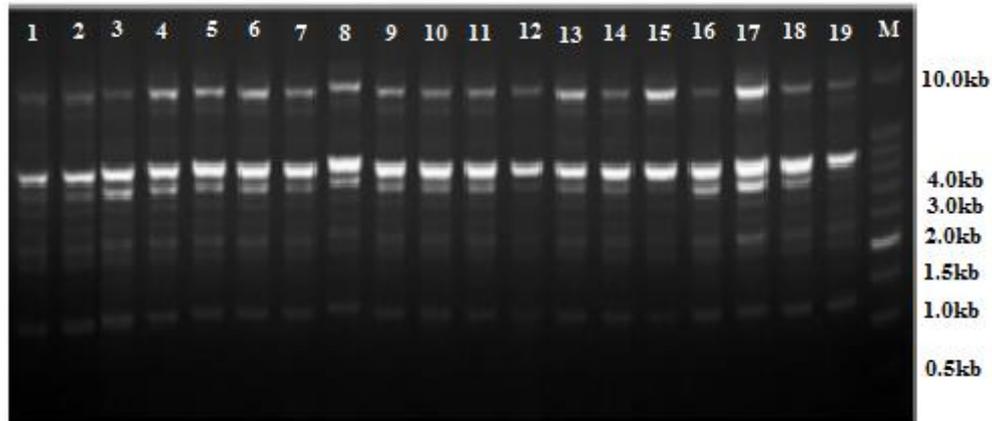
Les 20 isolats sensibles et résistants à la CLA, issus du patient 01, ont produit des profils presque similaires malgré la diversité trouvée parmi les autres critères (*vacA*, *cagA*, résistance à la CLA, MTZ, FLU et mécanismes moléculaires impliqués) (figure 35 et 36) (tableau 20). Ce dernier résultat prouve que ce patient est infecté par un seul type d'*H. pylori* qui a subi des modifications au cours de sa colonisation.

Concernant le reste des patients, nous avons trouvé qu'un individu peut être colonisé par trois populations d'*H. pylori* ou plus (figure 34) (tableau 20). Nous avons réussi à déterminer la diversité d'*H. pylori* au sein d'un même patient en utilisant deux amorces, ces résultats ont été reproductibles.

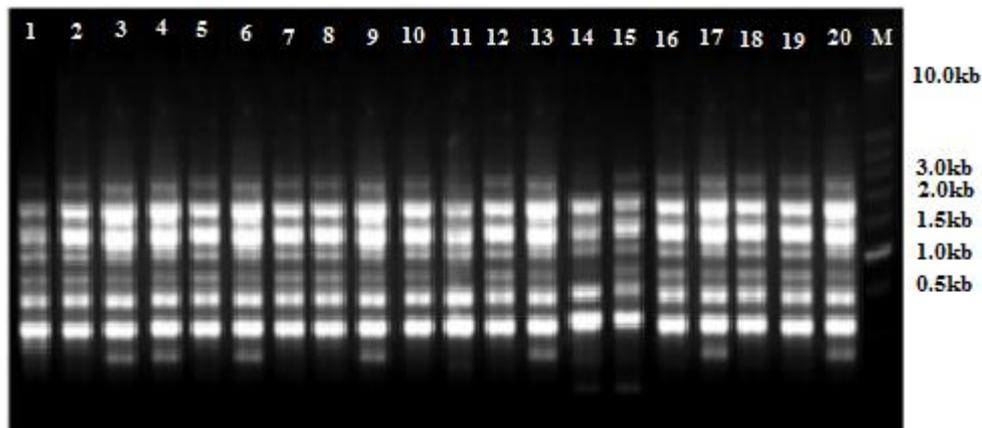


**Figure 34:** Profil RAPD de l'amorce 1254 des isolats sensibles et résistants isolés du Patient 09 (tout les autres critères sont similaires, CLA-R/S, 3 types RAPD)

## Résultats et discussion



**Figure35** : Profil RAPD de l'amorce1254 des isolats sensibles et résistants isolés du patient01 (RAPD TYPE1, CLA-R/S, MTZ-R/S, FLU-S, vacA s1m1, cagA+)



**Figure 36**:Profil RAPD de l'amorce 1281 des isolats sensibles et résistants isolés du patient 01(RAPD TYPE1, CLA-R/S, MTZ-R/S, FLU-S, vacA s1m1, cagA+)

Pour confirmer la diversité trouvée par la technique RAPD-PCR, nous avons pratiqué une PCR-RFLP sur un gène de ménage hautement conservé chez *H. pylori*. Les profils RFLP obtenus ont montré les même résultats que les profils RAPD, mais la PCR-RAPD a été plus sensible aux variations génomiques par rapport à la PCR-RFLP (tableau20). Cette technique nous a permis de voir si les isolats issus d'un même individu et possédant un même type RAPD ou des types rapprochés, sont descendants d'une même souche ancestrale et donc confirmer que la notion de quasi-espèce existe chez les patients étudiés.

## Résultats et discussion

**Tableau 20.** Génotypes présents chez chaque patient étudiés

	CLA	MTZ	FLU	<i>vacA</i>	<i>cagA</i>	Nbre de types RAPD	Nbre de types RFLP
Patient 01	R/S	R	R/S	<i>s1m1, s1m2</i>	+/-	Un seul type	Un seul type
Patient 02	R/S	R	S	<i>s1m1</i>	+	Un seul type	Un seul type
Patient 03	R/S	R	S	<i>s1m2</i>	+	3 types	2types
Patient 04	R/S	R	S	<i>s1m1</i>	+	4 types	2 types
Patient 05	R/S	R	S	<i>s2m2</i>	-	3 types	1 type
Patient 06	R/S	R/S	R	<i>s1m1, s2m2</i>	+/-	5 types	3 types
Patient 07	R/S	S	S	<i>s2m2</i>	-	Un seul type	Un seul type
Patient 08	R/S	R	S	<i>s1m1</i>	+	4 types	2 types
Patient 09	R/S	R	S	<i>s1m1</i>	+	3 types	2 types
Patient 10	R/S	S	S	<i>s2m2</i>	-	Un seul type	Un seul type

Enfin, les résultats de ce travail, ont montré qu'en plus des mutations induisant la résistance aux antibiotiques, *H. pylori* subit de nombreuses modifications génomiques, contribuant à son adaptation durant sa longue colonisation d'un individu.

Plusieurs publications ont fait l'objet de l'étude de ce phénomène. Ben Mansour et ses collègues (2016) ont étudié ce phénomène à grande échelle en distinguant les infections multiples en ce basant sur les facteurs de virulence (*cagA* et *vacA*), la sensibilité aux antibiotiques et le polymorphisme (RAPD).

Il a été rapporté que dans les infections mixtes non multiples, un clone résistant émerge du clone sensible sous pression sélective en raison de la consommation d'antibiotiques. Tandis que dans les infections multiples, l'individu est infecté par deux souches ou plus génétiquement distinctes. Les infections multiples sont plus fréquentes dans des zones en voie de développement tel que Tunis, alors que les infections mixtes non multiples (isolats résistants et sensibles issus d'une même souche) sont plus fréquemment détectées dans les pays développés (Ben Mansour *et al.*, 2016), probablement en raison de la consommation accrue d'antibiotiques dans cette zone (Raymond *et al.*, 2010).

## Résultats et discussion

---

Les infections multiples facilitent le transfert de gènes inter-souches et le maintien de la diversité génétique. Au contraire, dans les infections mixtes non multiples, les gènes de résistance tels que *rdxA* et *frxA* pour le MTZ, *ARNr 23S* pour la CLA et *gyrA* pour les FLU ne sont pas détectés par PCR-RAPD. Ainsi, les souches sensibles et résistantes peuvent exprimer un profil génétique identique principalement chez les patients avec une seule infection (empreinte digitale RAPD unique) (Garcia *et al.*, 2012).

Les infections mixtes peuvent représenter un défi majeur. Lorsque quelques souches résistantes sont présentes dans une population d'isolats sensibles, la détection de ces isolats résistants est difficile à réaliser, en particulier par des tests phénotypiques (Kao *et al.*, 2014). Ce type de problème apparaît plus fréquemment pour le MTZ, probablement en raison de la prévalence élevée de la résistance au MTZ.

Kim JJ et ses collègues (2003) ont examiné 220 paires d'isolats provenant à la fois de l'antré et du fundus. Ils ont trouvé que 41 patients sur 109 (38%) présentaient une hétérorésistance. Donc, le développement d'une résistance est le plus probablement causé par des altérations génomiques d'un *H. pylori* préexistant plutôt que par une co-infection avec des souches différentes.

En outre, il existe une possibilité que l'ADN génomique d'un *H. pylori* résistant puisse transformer une souche sensible en une souche résistante. De la Obra *et al.* (2001) ont trouvé des cultures contenant des isolats mixtes, sensibles au MTZ et résistants au MTZ dans 10% des cas. Compte tenu de l'apparenté génétique des isolats, nous pouvons souligner que la résistance au MTZ peut être due à des mutations *ex novo* (résistance acquise) et non au transfert horizontal de gènes entre souches non apparentées.

D'autre part, la colonisation d'un individu par un seul type d'*H. pylori* existe en Algérie, mais ce phénomène est plus rare qu'une colonisation multiple. Ceci peut être dû au mode de vie. Au nord de l'Algérie, la population ne cesse d'augmenter et les citoyens ont l'habitude de vivre et manger ensemble, par comparaison à la population occidentale; ces habitudes peuvent augmenter le risque de transmission d'*H. pylori* entre les individus de la même famille ou des individus éloignés (Herrera *et al.*, 2008).

Les souches d'*H. pylori* peuvent aussi s'adapter par recombinaisons avec d'autres souches (infection mixte) ou avec des variants de la même souche, conduisant à une très grande diversité de cette bactérie. La diversité d'une souche colonisant un patient doit être

## Résultats et discussion

---

considérée comme appui pour élucider la résistance et la récurrence de l'infection à *H. pylori* (Levine *et al.*, 2007).

La diversité d'*H. pylori* chez un individu peut survenir à cause des changements génétiques affectés par les réponses immunitaires de celui-ci. Durant la colonisation à long terme, *H. pylori* produit des effecteurs protéiques qui stimulent la réponse immunitaire physicochimique de l'hôte, qui à son tour largue des molécules mutagéniques, incluant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives du nitrogène (RNS). Ces molécules augmentent la fréquence des mutants microbiens (Kang et Blaser, 2006).

Parmi les patients étudiés, les profils obtenus par PCR-RFLP sont moins variables que les profils RAPD, le gène *ureAB* était plus ou moins conservés chez les isolats issus d'un même individu. Ce qui démontre que les différents génotypes chez l'hôte peuvent dériver d'une même souche ancestrale et qu'un phénomène de quasi-espèces peut être impliqué. Nos résultats sont en accord avec ceux de Colbeck *et al.* (2006), où de multiples variantes d'une seule souche peuvent survivre dans l'estomac d'un individu, et chacune joue le rôle d'un potentiel réservoir d'éléments génétiques pour ces cohabitants, et le type dominant est sélectionné par les pressions et les changements de l'environnement.

Ce phénomène peut avoir plusieurs résultantes. Premièrement, il permet une adaptation à un nouvel hôte, et donc une meilleure colonisation. Deuxièmement, ces variations permettent aussi une adaptation aux différents compartiments de l'estomac de l'hôte, qui contient différentes pressions sélectives, telle que la production d'acide dans le corpus (estomac) et la non production d'acide dans l'antra. Finalement, elles permettent le développement de résistance aux antibiotiques (Kuipers *et al.* 2000).

### **V.3.1.3. Traitement et variabilités d'*H. pylori***

L'extrême variabilité observée au sein des souches d'*H. pylori* est devenue un important point qui attire l'attention des scientifiques, les investigateurs reconnaissent l'impact que ce phénomène puisse avoir sur les différents domaines de recherche (développement de vaccins, la résistance aux agents antimicrobiens et les interactions pathogène-hôte).

Plusieurs études ont montré que chaque souche d'*H. pylori* est caractérisée par un degré de variabilité très élevée selon les conditions dans les quelles elle se trouve (Ferreira-Menoni *et al.*, 2013). Le plus souvent, l'échec d'éradication est dû à la présence d'hétérorésistance

## Résultats et discussion

---

développée à cause de la variation génomique élevée de souches préexistantes, ou le gain de souches résistantes à partir de personnes rencontrées durant la vie d'un individu.

Le génotypage et la prévalence de la résistance d'*H. pylori* aux antibiotiques son très importants pour caractériser les souches qui causent des lésions les plus sévères et qui résistent le plus au traitement, ces informations peuvent être d'un très grand intérêt pour les cliniciens, et peuvent les orienter pour mieux adapter le traitement d'éradication à une population donnée (Ferreira-Menoni *et al.*, 2013 ; Fallone *et al.*, 2016).

## *Conclusion*

## Conclusion et perspectives

---

### Conclusion et perspectives

L'infection à *H. pylori* représente la maladie infectieuse chronique la plus répandue dans le monde, affectant plus de la moitié de la population mondiale. La prévalence d'*H. pylori* diffère d'une manière significative entre les pays. *H. pylori* joue un rôle direct dans l'apparition d'une gastrite qui peut évoluer à des pathologies bien plus graves tel que le cancer gastrique. Cette infection attire l'attention des chercheurs et des cliniciens, pour mieux comprendre son épidémiologie et améliorer la prise en charge des patients infectés.

Cette étude a montré une forte prévalence de l'infection à *H. pylori*. En utilisant la culture, le taux de l'infection à *H. pylori* est de 78.5%. La culture est la méthode de diagnostic la plus spécifique. Elle constitue le test de référence le plus fiable pour confirmer la présence d'*H. pylori* et pour effectuer l'antibiogramme. *H. pylori* est une bactérie très exigeante en condition de culture, ce qui rend son isolement difficile.

Le taux de prévalence de cette infection détecté par PCR (84.4%), a été plus élevé qu'en culture. L'un des avantages de l'utilisation de la PCR est l'identification d'*H. pylori*, directement à partir des biopsies gastriques, avec une sensibilité et une spécificité très élevées ; ce qui est bien meilleur que l'histopathologie et la culture.

En Algérie, le taux de prévalence de l'infection à *H. pylori* est très élevé, ce qui rend l'investigation sur la sensibilité de cette bactérie aux antibiotiques, très importante. Surtout, dans un pays où la résistance aux antibiotiques est un sérieux problème.

Nos résultats ont montré, une fréquence élevée de la résistance aux MTZ (67.8%) et à la CLA (29.7 %), un taux modéré de résistance à la CIP (17.9 %), une rare résistance à la TET (0.94 %) et pas de résistance à l'AMX et à la RIF.

Ces résultats mentionnent que la résistance aux antibiotiques est indépendante de L'âge, du sexe, des pathologies gastriques et de la provenance des patients. Sauf dans le cas du MTZ, où la fréquence de la résistance était plus élevée chez les femmes.

En Algérie, le MTZ est un antibiotique clé dans la stratégie de traitement d'éradication d'*H. pylori*. Le taux de résistance à cet antibiotique est très élevé et les mécanismes de résistance associés sont très variés. Bien que nos résultats définissent quelques mutations impliquées

## Conclusion et perspectives

---

dans cette résistance, la plus part des isolats n'ont montré aucune mutation dans le gène *rdxA*. Ceci suggère l'implication d'autres gènes ou d'autres mécanismes.

La PCR en temps réel est une technique de choix qui permet non seulement la détection de *H. pylori*, mais également la détection des mutations associées à la résistance aux macrolides. Dans cette étude le taux de l'infection à *H. pylori*, détecté par PCR en temps réel (86 %), est presque similaire à celui détecté par PCR standard (84.4%).

Concernant les mutations associées à la résistance à la CLA, la mutation A2142G est la plus fréquente. Alors que la mutation A2142C n'a pas été trouvée.

Dans le cas des TET, le gène codant pour la sous unité 16S du ribosome, est aussi une excellente cible pour la PCR en temps réel ; il nous a permis de détecter les mutations associées à la résistance de cette famille d'antibiotiques (mutation A926G). Bien que la résistance aux TET s'avère rare, la surveillance de l'évolution de cette résistance au sein de notre société est très importante ; surtout chez les patients présentant un échec thérapeutique.

Les FLU ont une très bonne activité contre *H. pylori*. Nos résultats ont montré que les souches résistantes à la CIP présentent des mutations variées dans le gène *gyrA*. Les mutations N87K et D91N sont les plus fréquentes.

Les souches d'*H. pylori* étudiées, ont montré une forte présence de gènes associés aux pathologies les plus sévères, à savoir *vacA s1m1/cagA+*. Ces résultats suggèrent la nécessité d'éradiquer la bactérie pour traiter les patients infectés, en vue de prévenir l'apparition à long terme de maladies graves comme le cancer gastrique.

D'autre part, grâce à cette étude, nous avons pu évaluer le comportement de la bactérie chez un patient, les interactions moléculaires que subit cette bactérie pour s'adapter à son environnement et résister aux facteurs stressant qu'elle peut rencontrer durant sa longue colonisation de l'homme.

Un même hôte peut être colonisé par plusieurs souches d'*H. pylori* de génotypes différents, comme il peut être colonisé par une seule souche qui subit des transformations le plus souvent des mutations. Cette flexibilité génomique permet à *H. pylori* de survivre lors des différentes modifications de son environnement.

Le génotypage et l'étude de la résistance aux antibiotiques, sont très importants pour caractériser les souches qui causent les lésions les plus sévères et qui résistent le plus au

## Conclusion et perspectives

---

traitement. Ces informations sont très utiles pour les cliniciens et peuvent les orienter pour mieux adapter le traitement d'éradication à une population donnée.

Nous concluons que dans la trithérapie standard, un traitement de première ligne à base de MTZ et de CLA, n'est pas possible en Algérie. La trithérapie incluant la CIP est possible avec une surveillance d'antibiogramme en raison de l'émergence de la résistance à cet antibiotique. Le traitement empirique de seconde ligne utilisant la TET est aussi possible dans la quadri thérapie incluant les sels de bismuth.

L'augmentation de la dose des antibiotiques n'est pas une stratégie à appliquer dans un traitement d'éradication d'*H. pylori*. Les mécanismes de résistances, adoptés par cette bactérie, causent une modification des cibles des antibiotiques. Ceci implique une diminution de l'affinité entre l'antibiotique et sa cible et donc même en augmentant la dose, l'antibiotique ne reconnaîtra pas sa cible dans la cellule bactérienne.

Cette étude montre aussi l'importance des techniques de génétique moléculaire qui permettent la détection d'*H. pylori* et la détermination indirecte de sa sensibilité aux antibiotiques, par comparaison à la mise en culture, d'autant plus que ces méthodes sont faciles à standardiser en comparaison aux méthodes phénotypiques.

Les patients inclus dans cette étude sont infectés par des souches d'*H. pylori* pathogènes, résistantes aux antibiotiques et un même patient peut être colonisé par de multiples souches de génotypes de pathogénicité et de résistance variables. Ces critères rendent la tâche plus difficile aux cliniciens.

Cette étude offre une vision réelle sur l'importance de l'éradication d'*H. pylori* pour prévenir la propagation de pathologies gastriques graves en Algérie.

## Conclusion et perspectives

---

Les résultats obtenus mettent en évidence les mécanismes moléculaires de la résistance d'*H. pylori* aux antibiotiques mais d'autres études plus poussées sont souhaitables. Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- La mise en place d'une étude permettant de déterminer la résistance de *H. pylori* à l'AMX et d'approfondir l'étude de la résistance aux imidazolés pour élucider le mécanisme moléculaire exacte, associé à cette résistance.
- Détermination d'un génotype associé à la résistance et à la pathologie, et le développement d'une technique rapide et sensible capable de le détecter.
- Approfondir les recherches investiguant sur les populations multiples et leurs interactions chez un même patient

## *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

---

### *Références bibliographiques*

#### A

- **Abadi ATB. (2017).** Strategies used by *Helicobacter pylori* to establish persistent infection. *World J Gastroenterol*, **23**(16):2870-2882.
- **Acosta CP, Quiroga AJ, Sierra CH, Trespalacios AA. (2017).** Frequency of *Helicobacter pylori* nitroreductase RdxA mutations for metronidazole activation in a population in the Cauca Department. *Colombia Biomedica*, **37**(2):191-199.
- **Agudo S, Perez-Perez G, Alarcon T, Lopez-Brea M. (2010).** High prevalence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains and risk factors associated with resistance in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol*, **48**:3703-3707.
- **Alarcón T, Domingo D, Prieto N, de la Oña P, López-Brea M. (2002).** In vitro activity of clarithromycin and metronidazole against *Helicobacter pylori* in different incubation atmospheres. *Rev Esp Quimioter*, **15**(4):341-5.
- **Amaral O, Fernandes I, Veiga N, Pereira C, Chaves C, Nelas P, Silva D. (2017).** Living Conditions and *Helicobacter pylori* in Adults. *Biomed Res Int*, 2017: 9082716. doi: 10.1155/2017/9082716. Epub 2017 Oct.
- **Antos D, Crone J, Konstantopoulos N, Antos D, Crone J, Konstantopoulos N, Koletzko S. (2005).** Evaluation of a Novel Rapid One-Step Immunochromatographic Assay for Detection of Monoclonal *Helicobacter pylori* Antigen in Stool Samples from Children. *J Clin Microb*, **43** (6): 2598–2601.
- **Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Berg DE. (1992).** PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res*, **20**:6221-5.
- **Ateka CN, Pitart O, Vila CJ. (2009).** Macrólidos y cetólidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **27** : 412–418.
- **Arslan N, Yılmaz Ö, Demiray-Gürbüz E. (2017).** Importance of antimicrobial susceptibility testing for the management of eradication in *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*, **23**(16):2854-2869. doi: 10.3748/wjg.v23.i16.2854.

## Références bibliographiques

---

### B

- **Backert S et Clyne M. (2011).** Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, **16**: 19-25.
- **Bai P, Zhou LY, Xiao XM, Luo Y et Ding Y. (2015).** Susceptibility of *Helicobacter pylori* to antibiotics in Chinese patients. *J Dig Dis*, **16**: 464–470.
- **Banatvala N, Davies GR, Abdi Y, Clements L, Rampton DS, Hardie JM, Feldman RA. (1994).** High prevalence of *Helicobacter pylori* metronidazole resistance in migrants to east London: relation with previous nitroimidazole exposure and gastroduodenale disease. *Gut*, **35**:1562-1566.
- **Bardhan K, Bayerdörffer E, Veldhuyzen Van Zanten SJ, Lind T, Mégraud F, Delchier JC, Hellblom M, Stubberöd A, Burman CF, Gromark P, Zeijlon L. (2000).** The HOMER Study: the effect of increasing the dose of métronidazole when given with omeprazole and amoxicillin to cure *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, **5**:196-201.
- **Bayerdorffer E, Neubauer A, Rudolph B, Thiede C, Lehn N, Eidt S et Stolte M. (1995).** Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet*, **345**:1591-4.
- **Ben Mansour K, Burucoa C, Zribi M, Masmoudi A, Karoui S, Kallel L, Chouaib S, Matri S, Fekih M, Zarrouk S, Labbene M, Boubaker J, Cheikh I, Hriz MB, Siala N, Ayadi A, Filali A, Mami NB, Najjar T, Maherzi A, Sfar MT, Fendri C. (2010).** Primary resistance to clarithromycin, metronidazole and amoxicillin of *Helicobacter pylori* isolated from Tunisian patients with peptic ulcers and gastritis: a prospective multicentre study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, **9**:22.
- **Ben Mansour K, Fendri C, Battikh H, Garnier M, Zribi M, Jlizi A, Burucoa C. (2016).** Multiple and mixed *Helicobacter pylori* infections: Comparison of two epidemiological situations in Tunisia and France. *Infect Genet Evol*, **37**:43-8.
- **Benoit SL, Maier RJ. (2016).** Helicobacter Catalase Devoid of Catalytic Activity Protects the Bacterium against Oxidative Stress. *J Biol Chem*, **291**(45):23366-23373.

## Références bibliographiques

---

- **Bergonzelli GE, Blum S, Brussow H, Corthésy-Theulaz I. (2005).** Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases Digestion. *Aliment Pharmacol Ther*, **72**:57-68.
- **Bina JE, Alm RA, Uria-Nickelsen M, Thomas SR, Trust TJ et Hancock RE. (2000).** *Helicobacter pylori* uptake and efflux: basis for intrinsic susceptibility to antibiotics in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**:248-254.
- **Bizzozero G. (1892).** Sulle ghiandole tubulari del tube gastroenterico e sui rapporti dell'ero coll epithelo de rivestimento della mucosa. *Atti d R Accad delle Sci di Torino*, **28**:233-251.
- **Blaser MJ. (2012).** Heterogeneity of *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **9**:S3-7.
- **Blomberg B, Manji KP, Urassa WK, Tamim BS, Mwakagile DS, Jureen R, Msangi V, Tellevik MG, Holberg-Petersen M, Harthug S, Maselle SY, Langeland N. (2007).** Antimicrobial resistance predicts death in Tanzanian children with bloodstream infections: a prospective cohort study. *BMC Infectious Diseases*, **7**: 43.
- **Bogaerts P, Berhin C, Nizet H, Glupczynski Y. (2006).** Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* strains from patients living in Belgium. *Helicobacter*, **11**: 441-445.
- **Boudjella MA, Tebaibia A, Lahcene M. (2013).** Traitement de première ligne de l'infection à *Helicobacter pylori*. *Science et Santé (Algérie)*; **8** :14.
- **Bouihat N, Burucoa C, Benkirane A, Seddik H, Sentissi S, Al Bouzidi A, Elouennas M, Benouda A. (2017).** *Helicobacter pylori* Primary Antibiotic Resistance in 2015 in Morocco: A Phenotypic and Genotypic Prospective and Multicenter Study. *Microb Drug Resist*, **23**(6):727-732.
- **Bourzac KM, Guillemin K. (2005).** *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol*, **7**: 911-919.
- **Boyanova L, Mitov I. (2010).** Geographic map and evolution of primary *Helicobacter pylori* resistance to antibacterial agents. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **8**:59-70.
- **Butlop TR, Mungkote NT, Chaichanawongsaroj NT. (2016).** Analysis of allelic variants of rdxA associated with metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*: detection of common genotypes in rdxA by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. *Genet Mol Res*, **15**(3).

## Références bibliographiques

---

### C

- **Calabrese C, Di Febo G, Areni A, Scialpi C, Biasco G, Miglioli M. (2000).** Pantoprazole, azithromycin and tinidazole: short duration triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*, **14**:1613-1617.
- **Camargo MC, Piazuolo MB, Mera RM, Fontham ET, Delgado AG, Yopez MC, Ceron C, Bravo LE, Bravo JC et Correa P. (2007).** Effect of smoking on failure of *H. pylori* therapy and gastric histology in a high gastric cancer risk area of Colombia. *Acta Gastroenterol Latinoma*, **37**(4): 238-45.
- **Cammarota G, Cianci R, Cannizzaro O, Cuoco L, Pirozzi G, Gasbarrini A, Armuzzi A, Zocco MA, Santarelli L, Arancio F, Gasbarrini G. (2000).** Efficacy of two one-week rabeprazole/levofloxacin-based triple therapies for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*, **14**: 1339–1343.
- **Cammarota G, Cianci R, Cannizzaro O, Martino A, Fedeli P, Lecca PG, di Caro S, Cesaro P, Branca G, Gasbarrini G. (2004).** High-dose versus low-dose clarithromycin in 1-week triple therapy, including rabeprazole and levofloxacin, for *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Gastroenterol*, **38**:110-114.
- **Cammarota G, Branca G, Ardito F, Sanguinetti M, Ianiro G, Cianci R, Torelli R, Masala G, Gasbarrini A, Fadda G, Landolfi R, Gasbarrini G. (2010).** Biofilm demolition and antibiotic treatment to eradicate resistant *Helicobacter pylori*: a clinical trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **8**:817-820.
- **Campo SM, Zullo A, Hassan C, Morini S. (2007).** Antibiotic treatment strategies for *Helicobacter pylori* infection. *Recent Pat Anti infect Drug Discov*, **2**:11-17.
- **Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, Corbel C, Lascols C, Deforges L, Soussy CJ, Delchier JC, Megraud F. (2009).** Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, **47**:3600-3607. doi: 10.1128/JCM.00744-09. Epub 2009 Sep 16.
- **Cars O, Högberg LD, Murray M, Nordberg O, Sivaraman S, Lundborg CS, So AD, Tomson G. (2008).** Meeting the challenge of antibiotic resistance. *BMJ (British Medical Journal)*, 726-728.
- **Cattoir V, Nectoux J, Lascols C, Deforges L, Delchier JC, Megraud F, Soussy CJ, Cambau E. (2007).** Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a *gyrA* polymorphism

## Références bibliographiques

---

associated with hypersusceptibility. *International Journal Antimicrobial Agents*, **29**: 389–396.

- **Cellini L, Allocati N, Piccolomini R, Di Campi E et Dainelli B. (1992).** New plate medium for growth and detection of urease activity of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, **30**:1351–1353.
- **Chaput C et Gomperts Boneca I. (2006).** Bases moléculaires de l'interaction de *Helicobacter pylori* avec les cellules épithéliales gastriques. *Hépto-Gastro*, **13** (5) : 379-388.
- **Chen D, Cunningham SA, Cole NC, Kohner PC, Mandrekar JN, Patel R. (2017).** Phenotypic and Molecular Antimicrobial Susceptibility of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, **61**(4). pii: e02530-16.
- **Chisholm SA, Teare EL, Davies K, Owen RJ. (2007).** Surveillance of primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* at centres in England and Wales over a six-year period (2000-2005). *Euro Surveill*, **12**: E3-4.
- **Chmiela M, Karwowska Z, Gonciarz W, Allushi B et Stączek P. (2017).** Host pathogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer. *World J Gastroenterol*, **23**(9):1521-1540. doi: 10.3748/wjg.v23.i9.1521.
- **Colbeck JC, Hansen LM, Fong JM, Solnick JV. (2006).** Genotypic profile of the outer membrane proteins BabA and BabB in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, **74**:4375–8.
- **Contreras M, Fernández-Delgado M, Reyes N, García-Amado MA, Rojas H, Michelangeli F. (2015).** *Helicobacter pylori* Infection in Rural and Urban Dyspeptic Patients from Venezuela. *Am J Trop Med Hyg*, **93**(4):730-2.
- **Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, Tannenbaum S, Collazos T, Ruiz B. (1990).** Gastric precancerous process in a high risk population: cross-sectional studies. *Cancer Res*, **50**: 4731-4736.
- **Cover TL, Blaser MJ. (2009).** *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology*, **136**: 1863-1873.

## Références bibliographiques

---

### D

- **Dadashzadeh K, Milani M, Rahmati M, Akbarzadeh A. (2014).** Real-time PCR detection of *16S rRNA* novel mutations associated with *Helicobacter pylori* tetracycline resistance in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*, **15**(20):8883-6.
- **Dailidienė D, Bertoli MT, Miciuleviciene J, Mukhopadhyay AK, Dailide G, Pascasio A, Kupcinskas L, Berg DE. (2002).** Emergence of tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**:3940-3946.
- **De Francesco V, Bellesia A, Ridola L, Manta R, Zullo A. (2017).** First-line therapies for *Helicobacter pylori* eradication: a critical reappraisal of updated guidelines. *Ann Gastroenterol*, **30**(4):373-379. doi: 10.20524/aog.2017.0166. Epub 2017 Jun 1.
- **De Korwin JD, Lozniewski A. (1996).** Le traitement de l'infection par *Helicobacter pylori*. *Presse Med*, **25**:1917-22.
- **Delchier JC. (1999).** Comment éradiquer *Helicobacter pylori*? Conférence de consensus *Helicobacter pylori* -Révision 1999. Textes des experts- Question 2. *Gastroenterol Clin Biol*, **23**:20-33.
- **Delchier JC. (2006).** Recommendations for the management of *Helicobacter pylori* infection according to Maastricht 3 guidelines. *Gastroenterol Clin Biol*; **30**(12):1361-4.
- **Delchier JC. (2008).** Manifestations digestives de l'infection à *Helicobacter pylori* chez l'adulte : de la gastrite au cancer gastrique. *Presse Med*, **37**: 519-24.
- **De la Obra P, Alarcon T, Domingo D, Garcia J, Lopez-Brea M. (2001).** Heteroresistance to metronidazole and genetic relationship of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Gut*, **49**(4):A4.
- **Dent JC et McNulty CAM. (1988).** Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **7**: 555- 558.
- **Di Giulio M, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Cataldi V, Marzio L, Grossi L, Ciccaglione AF, Nostro A, Cellini L. (2016).** In vitro antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* to nine antibiotics currently used in Central Italy. *Scand J Gastroenterol*, **51**(3):263-9. doi: 10.3109/00365521.2015.1092577. Epub 2015 Oct 7.
- **Diouf A, Martinez-Gomis J, Miquel M, Quesada M, Lario S, Sixou M. (2009).** Comparison of four different primer sets for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies and oral samples by using real-time PCR. *Pathol Biol (Paris)*, **57**(1):30-5.

## Références bibliographiques

---

- **Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. (1996).** Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston. *Am J Surg Pathol*, **20**:1161-1181.
- **Djennane-Hadibi F, Bachtarzi M, Layaida K, Ali Arous N, Nakmouche M, Saadi B, Tazir M, Ramdani-Bouguessa N, Burucoa C. (2016).** High-Level Primary Clarithromycin Resistance of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria: A Prospective Multicenter Molecular Study. *Microb Drug Resist*, **22**(3):223-6.
- **Doenges JL. (1938).** Spirochaetei in gastric glands of macacus rhesus and humans without definite history of related disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, **38**:536-538.
- **Dominici P, Bellentani S, Di Biase AR, Saccoccio G, Le Rose A, Masutti F, Viola L, Balli F, Tiribelli C, Grilli R, Fusillo M, Grossi E. (1999).** Familial clustering of *Helicobacter pylori* infection: population based study. *BMJ*, **319**(7209):537-40.
- **Dong QJ, Wang Q, Xin YN, Li N, Xuan SY. (2009).** Comparative genomics of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*, **15**(32):3984-91.
- **Doorackers E, Lagergren J, Gajulapuri VK, Callens S, Engstrand L, Brusselaers N. (2017).** *Helicobacter pylori* eradication in the Swedish population. *Scand J Gastroenterol*, **52**(6-7):678-685.
- **Dore MP, Leandro G, Realdi G, Sepulveda AR, Graham DY. (2000).** Effect of pretreatment antibiotic resistance to metronidazole and clarithromycin on outcome of *Helicobacter pylori* therapy: a meta-analytical approach. *Dig Dis Sci*, **45**:68-76.
- **Dore MP, Kwon DH, Sepulveda AR, Graham DY et Realdi G. (2001).** Stable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, **6**:79.
- **Dorer MS, Talarico S et Salama NR. (2009).** *Helicobacter pylori*'s unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog*, **5**: e1000544.
- **Duck WM, Sobel J, Pruckler JM, Song Q, Swerdlow D, Friedman C, Sulka A, Swaminathan B, Taylor T, Hoekstra M, Griffin P, Smoot D, Peek R, Metz DC, Bloom PB, Goldschmidt S, Parsonnet J, Triadafilopoulos G, Perez-Perez GI, Vakil N, Ernst P, Czinn S, Dunne D, Gold BD. (2004).** Antimicrobial resistance incidence and risk factors among *Helicobacter pylori*-infected persons, United States. *Emerg Infect Dis*, **10**:1088-1094.
- **Ducournau A, Bénéjat L, Sifré E, Bessède E, Lehours P, Mégraud F. (2016).** *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in 2014 in France detected by phenotypic and genotypic methods. *Clin Microbiol Infect*, **22**(8):715-8.

## Références bibliographiques

---

### E

- **EARSS. (2007).**The European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Available at: <http://www.rivm.nl/earss/>
- **Ecclissato C, Marchioretto MA, Mendonca S, Godoy AP, R. A. Guersoni RA, Deguer M, Piovesan H, Ferraz JG et Pedrazzoli J. (2002).** Increased primary resistance to recommended antibiotics negatively affects *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter*, **7**:53-9.
- **Engstrand L, Lindberg M. (2013).** *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **27**: 39–45.
- **Erah PO, Goddard AF, Barrett DA, Shaw PN, Spiller RC. (1997).** The stability of amoxicillin, clarithromycin and métronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *J Antimicrob Chemother*, **39**:5-12.
- **Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. (2006).** Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA, babA2* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter*, **11**(6):574–80.
- **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2017).** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST Clinical Breakpoint Table Version 7.1, valid from 2017-03-10; [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v7.1\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v7.1_Breakpoint_Tables.pdf).

### F

- **Falk PG, Syder AJ, Guruge JL, Kirschner D, Blaser MJ, Gordon JI. (2000).** Theoretical and experimental approaches for studying factors defining the *Helicobacter pylori*-host relationship. *Trends Microbiol*, **8**(7):321-9.
- **Fallone CA, Chiba N, van Zanten SV, Fischbach L, Gisbert JP, Hunt RH, Jones NL, Render C, Leontiadis GI, Moayyedi P, Marshall JK. (2016).** The Toronto consensus for treatment of *Helicobacter pylori* infection in adults. *Gastroenterology*, **151**(1):51–69.
- **Falush D, Kraft C, Taylor NS, Correa P, Fox JG, Achtman M, Suerbaum S. (2001).** Recombination and mutation during longterm gastric colonization by

## Références bibliographiques

---

*Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 15056- 15061.

- **Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Mégraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitz E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S. (2003).** Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, **299**:1582-1585.
- **Farzi N, Malekian T, Alebouyeh M, Vaziri F, Zali MR. (2015).** Genotype Diversity and Quasispecies Development of *Helicobacter pylori* in a Single Host. *Jpn J Infect Dis*, **68**(4):351.
- **Fasciana T, Calà C, Bonura C, Di Carlo E, Matranga D, Scarpulla G, Manganaro M, Camilleri S, Giammanco A. (2015).** Resistance to clarithromycin and genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated in Sicily. *J Med Microbiol*, **64**(11):1408-14.
- **Ferenc S, Gnus J, Kościelna M, Kinda M, Yarka A, Stewart L, Witkiewicz W. (2017).** High antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* and its effect on tailored and empiric eradication of the organism in Lower Silesia, Poland. *Helicobacter*, **22**(2). doi: 10.1111/hel.12365. Epub 2016 Nov 23.
- **Ferreira-Menoni SM, Bonon SHA, Zeitune JMR et Botelho Costa SC. (2013).** PCR-Based Detection and Genotyping of *Helicobacter pylori* in Endoscopic Biopsy Samples from Brazilian Patients. *Gastroenterology Research and Practice*, 8 pages.
- **Fischbach LA, van Zanten S, Dickason J. (2004).** Meta-analysis: the efficacy, adverse events, and adherence related to first-line anti-*Helicobacter pylori* quadruple therapies. *Aliment Pharmacol Ther*, **20**:1071-1082.
- **Fock KM, Graham DY, Malfertheiner P. (2013).** *Helicobacter pylori* research: histological insights and future detections. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **10**: 495-500.
- **Freedberg AS, Barron LE. (1940).** The presence of spirochaetes in human gastric mucosa. *Am J Dig Dis*, **38**:443-445.
- **Fujiya K, Nagata N, Uchida T, Kobayakawa M, Asayama N, Akiyama J, Shimbo T, Igari T, Banerjee R, Nageshwar Reddy D, Mizokami M, Uemura N. (2014).** Different gastric mucosa and CagA status of patients in India and Japan infected with *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci*, **59**(3):631-7.

## Références bibliographiques

---

- **Furuta T, Shirai N, Xiao F, Ohashi K, Ishizaki T. (2001).** Effect of high-dose lansoprazole on intragastric pH in subjects who are homozygous extensive metabolizers of cytochrome P450C19. *Clin Pharmacol Ther*, **69**:158-168.
- **Furuta Y. (2015).** Diversity in genome and epigenome of *Helicobacter pylori*. *Nihon Saikingaku Zasshi*, **70**(4):383-9. doi: 10.3412/jsb.70.383.

### G

- **Garcia M, Raymond J, Garnier M, Cremniter J, Burucoa C. (2012).** Distribution of spontaneous *gyrA* mutations in 97 fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* isolates collected in France. *Antimicrob Agents Chemother*, **56**:550–551.
- **Garrity G, Bell M, Lilburn JA. (2005).** II. Helicobacteraceae fam. nov. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology New York, *NU Pub Springer*, 1168-1194.
- **Gatta L, Vakil N, Leandro G, Di Mario F et Vaira D. (2009).** Sequential therapy or triple therapy for *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials in adults and children. *Am J Gastroenterol*, **104**: 3069-3079.
- **Genta RM, Puztaszeri M. (2006).** The gastric mucosa in gastric cancer patients in a low-incidence area. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **18**(10):1085-93.
- **Gerrits MM, De Zoete MR, Arents NL, Kuipers EJ, Kusters, JG. (2002).** 16S rRNA mutation-mediated tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**: 2996-3000.
- **Ghaith D, Elzahry M, Mostafa G, Mostafa S, Elsherif R, Ramzy I. (2016).** Mutations affecting domain V of the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* from Cairo, Egypt. *J Chemother*, **28**(5):367-70.
- **Ghotaslou R, Milani M, Akhi MT, Nahaei MR, Hasani A, Hejazi MS, Meshkini M. (2013).** Relationship between drug resistance and *cagA* gene in *Helicobacter pylori*. *Jundishapur J Microbiol*, **6**:84-80.
- **Giannakis M, Chen SL, Karam SM, Engstrand L, Gordon JI. (2008).** *Helicobacter pylori* evolution during progression from chronic atrophic gastritis to gastric cancer and its impact on gastric stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(11):4358-63.

## Références bibliographiques

---

- **Gibson JR, Saunders NA, Burke B et Owen RJ. (1999).** Novel method for rapid determination of clarithromycin sensitivity in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, **37**:3746-8.
- **Gisbert JP, Khorrani S, Calvet X, Gabriel R, Carballo F, Pajares JM. (2003).** Meta-analysis: proton pump inhibitors vs H<sub>2</sub>-receptor antagonists - their efficacy with antibiotics in *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther*, **18**:757-766.
- **Glocker E, Bogdan C, Kist M. (2007).** Characterization of rifampicin resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates from Germany. *J Antimicrob Chemother*, **59**: 874-879.
- **Glupczynski Y. (1992).** European Multicentre Study Group on Antibiotic Susceptibility of *Helicobacter pylori*. Results of a multicentre European survey in 1991 of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **11**:777-781.
- **Gomez-Lus R. (1998).** Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the last three decades. *Int Microbiol*, **1**:279-84.
- **Goodwin CS, Marshal BJ, Blincow ED, Wilson DH, Blackbourn S, Phillips M. (1988).** Prevention of nitroimidazole resistance in *Campylobacter pylori* by coadministration of colloidal bismuth substrate: clinical and in vitro studies. *J Clin Pathol*, **41**: 207-210.
- **Goodwin CS, Bell B, McCullough C, McCullough C, Turner M. (1989).** Sensitivity of *Campylobacter pylori* to colloidal bismuth subcitrate. *J Clin Pathol*, **42**: 216-21.
- **Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Veldhuyzen van Zanten SJ, Berg DE, Hoffman PS. (1998).** Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol*, **28**(2):383-93.
- **Gotteland M, Brunser O, Cruchet S. (2006).** Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? *Aliment Pharmacol Ther*, **23**:1077-1186.
- **Graham DY, Dore MP. (2016).** *Helicobacter pylori* therapy: a paradigm shift. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **14**(6):577-85.
- **Graham DY, Fischbach L. (2010).** *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut*, **59**:1143-1153.

## Références bibliographiques

---

- **Graham DY, Shiotani A. (2008).** New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, **5**:321-31.
- **Graham DY and Yamaoka Y. (2007).** Ethical considerations of comparing sequential and traditional anti *Helicobacter pylori* therapy. *Ann Intern Med*, **147**(6): 434-5.
- **Gressmann H, Linz B, Ghai R, Pleissner KP, Schlapbach R, Yamaoka Y, Kraft C, Suerbaum S, Meyer TF, Achtman M. (2005).** Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. *PLoS Genet*, **1**: e43.
- **Grignon B, Tankovic J, Megraud F, Glupczynski Y, Husson MO, Conroy MC, et al. (2002).** Validation of diffusion methods for macrolide susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *Microb Drug Resist*, **8**:61–6.
- **Gunnarsdottir AI, Gudjonsson H, Hardardottir H, Jonsdottir KD, Bjornsson ES. (2017).** Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in Iceland. *Infect Dis (Lond)* , **25**:1-8.

### H

- **Hachem, C. Y., J. E. Clarridge, R. Reddy, R. Flamm, D. G. Evans, K. Tanaka, and D. Y. Graham. (1996).** Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: comparison of E-test, broth microdilution, and disk diffusion for ampicillin, clarithromycin, and metronidazole. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **24**:37–41.
- **Han YH, Liu WZ, Shi YZ, Lu LQ, Xiao S, Zhang QH, Zhao GP. (2007).** Comparative genomics profiling of clinical isolates of *Helicobacter pylori* in Chinese populations using DNA microarray. *J Microbiol*, **45**: 21-28.
- **Han R, Lu H, Jiang MW, Tan KW, Peng Z, Hu JL, Fang DC, Lan CH, Wu XL. (2016).** Multicenter study of antibiotic resistance profile of *H. pylori* and distribution of CYP2C19 gene polymorphism in rural population of Chongqing, China. *Gastroenterol Res Pract*, 8547-686.
- **Hanafi A, Lee WC, Loke MF, Teh X, Shaari A, Dinarvand M, Lehours P, Mégraud F, Leow AH, Vadivelu J, Goh KL. (2016).** Molecular and Proteomic Analysis of Levofloxacin and Metronidazole Resistant *Helicobacter pylori*. *Front Microbiol*, **7**: 2015.

## Références bibliographiques

---

- **Harris AG, Hazell SL, Netting AG. (2000).** Use of digoxigenin-labelled ampicillin in the identification of penicillin-binding proteins in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother*, **45**:591-598.
- **Harrison U, Fowora MA, Seriki AT, Loell E, Mueller S, Ugo-Ijeh M, Onyekwere CA, Lesi OA, Otegbayo JA, Akere A, Ndububa DA, Adekanle O, Anomneze E, Abdulkareem FB, Adeleye IA, Crispin A, Rieder G, Fischer W, Smith SI, Haas R. (2017).** *Helicobacter pylori* strains from a Nigerian cohort show divergent antibiotic resistance rates and a uniform pathogenicity profile. *PLoS One*, **12**(5): e0176454.
- **Hatakeyama M. (2017).** Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, **93**(4):196-219. doi: 10.2183/pjab.93.013.
- **Hays C, Burucoa C, Lehours P, Tran CT, Leleu A, Raymond J. (2017).** Molecular characterization of *Helicobacter pylori* resistance to rifamycins. *Helicobacter*, doi: 10.1111/hel.12451. [Epub ahead of print]
- **Hazell SL, Evans DJ Jr, Graham DY. (1991).** *Helicobacter pylori* catalase. *J Gen Microbiol*, **137**:57-61.
- **Heep M, Rieger U, Beck D, et Lehn N. (2000).** Mutations in the Beginning of the *rpoB* Gene Can Induce Resistance to Rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**(4): 1075–1077.
- **Herrera PM, Mendez M, Velapatio B, Santivañez L, Balqui J, Finger SA, Sherman J, Zimic M, Cabrera L, Watanabe J, Rodríguez C, Gilman RH, Berg DE. (2008).** DNA-Level diversity and relatedness of *Helicobacter pylori* strains in shantytown families in Peru and transmission in a developing-Country setting. *J Clin Microb*, **46** (12): 3912–3918.
- **Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M. (2002).** SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, **295**: 683-686.
- **Hoshina S, Kahn SM, Jiang W, Green PH, Neu HC, Chin N, Morotomi M, LoGerfo P, Weinstein IB. (1990).** Direct detection and amplification of *Helicobacter pylori* ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies. *Diag Microbiol Infec Dis*, **13**: 473-479.

## Références bibliographiques

---

- **Hoffman PS, Goodwin A, Johnsen J, Magee K, Veldhuyzen van Zanten SJ. (1996).** Metabolic activities of metronidazole-sensitive and -resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. *J Bacteriol*, **178**(16):4822-9.
- **Hong J, Shu X, Liu D, Zhu Y, Xie C, Xie Y, Zhang K, Wang A, Xiong H, Zeng H, Yu H, Ma J, Chen Y, Zhu X, Lu N. (2016).** Antibiotic resistance and CYP2C19 polymorphisms affect the efficacy of concomitant therapies for *Helicobacter pylori* infection: an open-label, randomized, single-centre clinical trial. *J Antimicrob Chemother*, **71**: 2280–2285
- **Hooi JKY, Lai WY, Ng W, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG, Ng SC. (2017).** Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, **153**:420- 429.
- **Houben MH, Van de Beek D, Hensen EF, Craen AJ, Rauws EA, et Tytgat GN. (1999).** A systematic review of *Helicobacter pylori* eradication therapy-the impact of antimicrobial resistance on eradication rates. *Aliment Pharmacol Ther*, **13**:1047-55.
- a) **Hu Y, Zhu Y et Lu NH. (2017).** Primary Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* in China. *Dig Dis Sci*, **62**:1146-1154.
- b) **Hu Y, Zhu Y et Lu NH. (2017).** Novel and Effective Therapeutic Regimens for *Helicobacter pylori* in an Era of Increasing Antibiotic Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*, **7**:168.

### I

- **Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Borén T. (1998).** *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, **279**(5349): 373-7.
- **Ierardi E, Giorgio F, Losurdo G, Di Leo A, Principi M. (2013).** How antibiotic resistances could change *Helicobacter pylori* treatment: A matter of geography? *World J Gastroenterol*. **7**; 19(45):8168-80.
- **Ishijima N, Suzuki M, Ashida H, Ichikawa Y, Kanegae Y, Saito I, Borén T, Haas R, Sasakawa C, Mimuro H. (2011).** BabA-mediated adherence is a potentiator of the

## Références bibliographiques

---

*Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *J Biol Chem*, **286** (28):25256-64.

- **Israel DA, Salama N, Krishna U, Rieger UM, Atherton JC, Falkow S, Peek RM Jr. (2001)** *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 14625-14630.

### J

- **Jafri W, Yakoob J, Abid S, Siddiqui S, Awan S, Nizami SQ. (2010).** *Helicobacter pylori* infection in children: population-based age specific prevalence and risk factors in a developing country. *Acta Paediatr*, **99**(2):279–282.
- **Jaworski W. (1899).** Podrecznik chorób (Handbook of Gastric Diseases). *Wydawnictwa Dzie Lekarskich Polskich*, 30-47.
- **Jenks PJ, Edwards DI. (2002).** Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents*, **19**:1-7.
- **Ji Z, Han F, Meng F, Tu M, Yang N et Zhang J. (2016).** The association of age and antibiotic resistance of *Helicobacter Pylori*: a study in Jiaying City, Zhejiang province, China. *Medicine (Baltimore)*, **95**:e2831.
- **Jiang Q, Hiratsuka K et Taylor DE. (1996).** Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol*, **20**: 833-842.

### K

- **Kafshdooz T, Akbarzadeh A, Majdi Seghinsara A, Pourhassan M, Nasrabadi HT et Milani M. (2017).** Role of Probiotics in Managing of *Helicobacter Pylori* Infection: A Review. *Drug Res (Stuttg)*, **67** (2):88-93.
- **Kang J, Blaser MJ. (2006).** Bacterial populations as perfect gases: genomic integrity and diversification tensions in *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol*, **4**:26–36.
- **Kao CY, Lee AY, Huang AH, Song PY, Yang YJ, Sheu SM, Chang WL, Sheu BS, Wu JJ. (2014).** Heteroresistance of *Helicobacter pylori* from the same patient prior to antibiotic treatment. *Infect Genet Evol*, **23**:196-202.
- **Kennemann L, Didelot X, Aebischer T, Kuhn S, Drescher B, Droege M, Reinhardt R, Correa P, Meyer TF, Josenhans C, Falush D, Suerbaum S. (2011).**

## Références bibliographiques

---

*Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**: 5033-5038.

- **Kersulyte D, Chalkauskas H et Berg DE. (1999).** Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Molecular Microbiology*, **31**(1), 31–43
- **Khan A, Farooqi A, Manzoor H, Akhtar SS, Quraishy MS, Kazmi SU. (2012).** Antibiotic resistance and *cagA* gene correlation: A looming crisis of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*, **18**: 2245-2252.
- **Khosravi Y, Dieye Y, Poh BH, Ng CG, Loke MF, Goh KL, Vadivelu J. (2014).** Culturable bacterial microbiota of the stomach of *Helicobacter pylori* positive and negative gastric disease patients. *Scientif World J*, 610-421.
- **Kim IJ, Blanke SR. (2012).** Remodeling the host environment: modulation of the gastric epithelium by the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA). *Front Cell Infect Microbiol*, **2**: 37.
- **Kim JJ, Kim JG, Known DH. (2003).** Mixed-infection of antibiotics susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolates in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing. *Helicobacter*, **8**(3):202–206.
- **Kim SS, Ruiz VE, Carroll JD et Moss SF. (2011).** *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer Lett*, **305**: 228-238.
- **Kist M et Glocker E. (2004).** ResiNet - a nationwide German sentinel study for surveillance and analysis of antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eurosurveillance*, **9**:44-46.
- **Koletzko S, Richy F, Bontems P, Crone J, Kalach N, Monteiro ML, Gottrand F, Celinska-Cedro D, Roma-Giannikou E, Orderda G, Kolacek S, Urruzuno P, Martínez-Gómez MJ, Casswall T, Ashorn M, Bodanszky H, Mégraud F. (2006).** Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. *Gut*, **55**:1711-1716.
- **Korwin JD. (2008).** Does *Helicobacter pylori* infection play a role in extragastric diseases?. *Presse Med*, **37**(32):525-34.
- **Kreinitz W. (1905).** Ueber das Auftreten von Spirochaetne verschiegner Form in Magen-inhalt bei Carcinoma ventriculi. *Dtsch Med Wschr*, **32**:772.
- **Kuipers EJ, Israel DA, Kusters JG, Gerrits MM, Weel J, van Der Ende A, van Der Hulst RW, Wirth HP, Höök-Nikanne J, Thompson SA, Blaser MJ. (2000).**

## Références bibliographiques

---

Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis*, **181**(1):273-82.

- **Kuo YT, Liou JM, El-Omar EM, Wu JY, Leow AHR, Goh KL, Das R, Lu H, Lin JT, Tu YK, Yamaoka Y, Wu MS; Asian Pacific Alliance on Helicobacter and Microbiota. (2017).** Primary antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* in the Asia-Pacific region: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, **2**(10):707-715.
- **Kwon, DH, El Zaatari FA, Kato M, Osato MS, Reddy R, Yamaoka Y et Graham DY. (2000).** Analysis of *rdxA* and involvement of additional genes encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (FrxA) and ferredoxin-like protein (FdxB) in metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**:2133-2142.
- **Kwon DH, Hulten K, Kato M, Kim JJ, Lee M, El-Zaatari FAK, Osato MS and Graham DY. (2001).** DNA Sequence Analysis of *rdxA* and *frxA* from 12 Pairs of Metronidazole-Sensitive and -Resistant Clinical *Helicobacter pylori* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**(9): 2609–2615.

### L

- **Laheij RJ, Vrossum LG, Jansen JB, Straatman H et Verbeek AL. (1999).** Evaluation of treatment regimens to cure *Helicobacter pylori* infection - a meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther*, **13**:857-864.
- **Lambert T, Megraud E, Gerbaud G et al. (1986).** Susceptibility of *Campylobacter pyloridis* to twenty antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **30**: 510-511.
- **Langenberg M, Tytgat GN, Schipper MES. (1984).** *Campylobacter*-like organism in the stomach of patients and healthy individuals. *Lancet*, **1**:1348-1349.
- **Latham SR, Owen RJ, Elviss NC, Labigne A, Jenks PJ. (2001).** Differentiation of metronidazole-sensitive and -resistant clinical isolates of *Helicobacter pylori* by immunoblotting with antisera to the RdxA protein. *J Clin Microbiol*, **39**(9):3052-5.
- **Laurent J, Mégraud F, Fléjou JF, Caekaert A, Barthélemy P. (2001).** A randomized comparison of four omeprazole-based triple therapy regimens for the eradication of *Helicobacter pylori* in patients with non-ulcer dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther*, **15**:1787-1793.
- **Lawson AJ, Elviss NC, Owen RJ. (2005).** Real-time PCR detection and frequency of

## Références bibliographiques

---

16S rDNA mutations associated with resistance and reduced susceptibility to tetracycline in *Helicobacter pylori* from England and Wales. *Antimicrob Agents Chemother*, **56**: 282-6.

- **Lehours P, Dupouy S, Bergey B, Ruskoné-Foumestaux A, Delchier JC, Rad R, Richy F, Tankovic J, Zerbib F, Mégraud F, Ménard A. (2004).** Identification of a genetic marker of *Helicobacter pylori* strains involved in gastric extranodal marginal zone B cell lymphoma of the MALT-type. *Gut*, **53**: 931-937.
- **Levine SM, Lin EA, Emara W, Kang J, DiBenedetto M, Ando T, Falush D, Blaser MJ. (2007).** Plastic cells and populations: DNA substrate characteristics in *Helicobacter pylori* transformation define a flexible but conservative system for genomic variation. *FASEB J*, **21**:3458–67.
- **Li XX, Wong GL, To KF, Wong VW, Lai LH, Chow DK, Lau JY, Sung JJ, Ding C. (2009).** Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use. *PLoS One*, **4**:e7985.
- **Linpisarn S, Koosirirat C, Prommuangyong K, Suwan W, Lertprasertsuke N, Phornphutkul K. (2005).** Use of different PCR primers and gastric biopsy tissue from CLO test for the detection of *Helicobacter pylori*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **36**(1):135-40.
- **Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M. (2007).** An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*, **445**(7130):915-918. doi: 10.1038/nature05562. Epub 2007 Feb 7.
- **Linz B, Vololonantenainab CR, Seck A, Carod JF, Dia D, Garin B, Ramanampamonjy RM, Thiberge JM, Raymond J, Breurec S. (2014).** Population genetic structure and isolation by distance of *Helicobacter pylori* in Senegal and Madagascar. *PLoS One*, **9**(1):e87355. doi: 10.1371/journal.pone.0087355. eCollection 2014.
- **Liou JM, Chang CY, Chen MJ, Chen CC, Fang YJ, Lee JY, Wu JY, Luo JC, Liou TC, Chang WH, Tseng CH, Wu CY, Yang TH, Chang CC, Wang HP, Sheu BS, Lin JT, Bair MJ, Wu MS; Taiwan Gastrointestinal Disease and Helicobacter Consortium. (2015).** The primary resistance of *Helicobacter*

## Références bibliographiques

---

*pylori* in Taiwan after the national policy to restrict antibiotic consumption and Its relation to virulence factors—A nationwide study. *Plos One*, 10: e0124199.

- **Liu J, Wang Y, Zhao Q, Luo R, Xiao M, Zhang M, Xie W. (2017).** Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in southwest China: a study of health examination participants based on 13C-urea breath test. *Turk J Med Sci*, **47**(5):1456-1462.
- **Liu Q, Qi D, Kang J, Jin Y, Liu W, Gao W, Hou P, Lu J. (2015).** Efficacy of real-time PCR-based detection of *Helicobacter pylori* infection and genotypic resistance guided quadruple therapy as the first-line treatment for functional dyspepsia with *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **27**: 221–225.
- **Liu ZQ, Zheng PY, Yang PC. (2008).** Efflux pump gene *hefA* of *Helicobacter pylori* plays an important role in multidrug resistance. *World J Gastroenterol*, **14**:5217-5222.
- **Liu DS, Wang YH, Zeng ZR, Zhang ZY, Lu H, Xu JM, Du YQ, Li Y, Wang JB, Xu SP, Chen Y, Lan CH, Cheng H, Jiang MD, Zhang LX, Huo LJ, Chen SY, Zhang GX, Wu KC, Zhu X, Chen YX, Zhu Y, Shu X, Xie Y, Lu NH. (2017).** Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Chinese patients: A multi-region prospective 7-year study. *Clin Microbiol Infect*, pii: S1198-743X(17)30640-7. doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.010.
- **Lozniewski A, de Korwin JD, Muhale F, Jehl F. (1998).** Gastric diffusion of antibiotics used against *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agent*, **9**:181–93.
- **Lu H, Yamaoka Y, Graham DY. (2005).** *Helicobacter pylori* virulence factors: facts and fantasies. *Curr Opin Gastroenterol*, **21**: 653-659.
- **Luck JM, Seth TN. (1924).** Gastric urease. *Biochem J*, **18**:1227-1231.

### M

- **Macías-García F, Llovo-Taboada J, Díaz-López M, Bastón-Rey I, Domínguez-Muñoz JE. (2017).** High primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from dyspeptic patients: A prevalence cross-sectional study in Spain. *Helicobacter*, **22**(6). doi: 10.1111/hel.12440. Epub 2017 Sep 15.
- **Maev IV, Andreev DN. (2017).** Molecular genetic predictors of resistance to anti-*Helicobacter pylori* therapy. *Ter Arkh*, **89**(8):5-12.
- **Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadström T, Kersulyte**

## Références bibliographiques

---

- D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarström L, Borén T. (2002). *Helicobacter pylori* SabA adhesion in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, **297**: 573-578.
- Malathum K, Coque TM, Singh KV and Murray BE. (1999). In vitro activities of two ketolides, HMR 3647 and HMR 3004, against gram- positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**(4): 930-936.
  - Maldonado-Contreras A, Goldfarb KC, Godoy-Vitorino F, Karaoz U, Contreras M, Blaser MJ, Brodie EL, Dominguez-Bello MG. (2011). Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. *ISME J*, **5**: 574–579.
  - Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. (2007). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*, **56**: 772-781.
  - Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ; European Helicobacter Study Group. (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*; **61**(5):646-64. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302084.
  - Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain C, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, Bazzoli F, Gasbarrini A, Atherton J, Graham DY, Hunt R, Moayyedi P, Rokkas T, Rugge M, Selgrad M, Suerbaum S, Sugano K, El-Omar EM; European Helicobacter and Microbiota Study Group and Consensus panel. (2017). Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut*; **66**: 6-30. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312288.
  - Marshall BJ, Goodwin CS. (1987). Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int J Systemat Bacteriol*, **37**:68.
  - Marshall BJ, Goodwin CS, Warren JR, Murray R, Blincow ED, Blackbourn SJ, Phillips M, Waters TE, Sanderson CR. (1988). Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet*, 8626-8627.
  - Martínez-Júlvez M, Rojas AL, Olekhnovich I, Espinosa Angarica V, Hoffman PS, Sancho J. (2012). Structure of RdxA an oxygen-insensitive nitroreductase

## Références bibliographiques

---

essential for metronidazole activation in *Helicobacter pylori*. *FEBS J*, **279**(23): 4306–4317.

- **Mascellino MT, Porowska B, De Angelis M, Oliva A. (2017).** Antibiotic susceptibility, heteroresistance, and updated treatment strategies in *Helicobacter pylori* infection. *Drug Des Devel Ther*, **11**:2209-2220.
- **Matsuo Y, Kido Y, Yamaoka Y. (2017).** *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-Related Pathogenesis. *Toxins (Basel)*, **9**(3). pii: E101.doi:10.3390/toxins9030101.
- **Mcclain MS, Shaffer CL, Israel DA, Peek RM Jr, Cover TL. (2009).** Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. *BMC Genomics*, **10**: 3.
- **Mcclain MS, Beckett AC, Cover TL. (2017).** *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin and Gastric Cancer. *Toxins (Basel)*, **9**(10).
- **McNulty C, Owen R, Tompkins D, Hawtin P, McColl K, Price A, Smith G, Teare L; PHLS Helicobacter Working Group. (2002).** *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. *J Antimicrob Chemother*, **49**(4):601-9.
- **Maeda S, Yoshida H, Matsunaga H, Ogura K, Kawamata O, Shiratori Y, Omata M. (2000).** Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains by a preferential homoduplex formation assay. *J Clin Microbiol*, **38**(1):210-4.
- **Medina M, Martín G, Picón SO, Bancalari A, Merino LA. (2010).** Molecular detection of *Helicobacter pylori* in oral samples from patients suffering digestive pathologies. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, **15**:38-42.
- **Mégraud F, Lamouliatte H. (1992).** *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer. Evidence suggesting causation. *Dig Dis Sci*, **37**(5):769-72.
- **Mégraud E, Trimoulet P, Lamouliatte H, Boyanova L. (1991).** Bactericidal effect of amoxicillin on *Helicobacter pylori* in an in vitro model using epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*, **35**:869- 872.
- **Mégraud F. (2004).** *H pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*, **53**: 1374-1384.
- **Mégraud F and the European Helicobacter Study Group. (2007).** Evolution of *Helicobacter pylori* research as observed through the workshops of the European Helicobacter Study Group. *Helicobacter*, **2**:1-5.

## Références bibliographiques

---

- **Mégraud F, Lehours P. (2007).** *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*, **20**:280-322.
- **Mégraud F. (2010).** *Helicobacter pylori* infection: Review and practice. *Presse Med*, **39**(7-8):815-22.
- **Mégraud F, Coenen S, Versporten A, Lopez-Brea M, Hirschl AM, Andersen LP, Goossens H, Glupczynski Y; Study Group participants. (2013).** *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*, **62**(1):34-42.
- **Mégraud F, Bénéjat L, Ontsira Ngoyi EN, Lehours P. (2015).** Molecular Approaches to Identify *Helicobacter pylori* Antimicrobial Resistance. *Gastroenterol Clin North Am*, **44**(3):577-96.
- **Memon AA, Hussein NR, Miendje Deyi VY, Burette A, Atherton JC. (2014).** Vacuolating cytotoxin genotypes are strong markers of gastric cancer and duodenal ulcer-associated *Helicobacter pylori* strains: a matched case-control study. *J Clin Microbiol*, **52**(8):2984-9.
- **Menard A, Santos A, Megraud F et Oleastro M. (2002).** PCR-restriction fragment length polymorphism can also detect point mutation A2142C in the 23S rRNA gene, associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**:1156-7.
- **Mendz GL, Trend MA. (2001).** Intracellular redox status and antibiotic resistance in enterogastric micro-aerophilic bacteria: evidence for the 'scavenging of oxygen' hypothesis. *Redox Rep*, **6**:179-81.
- **Miendje Deyi VY, Vanderpars J, Bontermis P, Van Der Borre C, De Koster E, Cadranel S, Burette A. (2011).** Marching cohort of *Helicobacter pylori* infection over two decades (1988- 2007): combined effects of secular trend and population migration. *Epidemiol Infect*, **139**: 572- 580.
- **Midolo PD, Korman MG, Turnidge JD et Lambert JR. (1996).** *Helicobacter pylori* resistance to tetracycline. *Lancet*, **347**:1194-1195.
- **Miftahussurur M, Syam AF, Nusi IA, Makmun D, Waskito LA, Zein LH, Akil F, Uwan WB, Simanjuntak D, Wibawa ID, Waleleng JB, Saudale AM, Yusuf F, Mustika S, Adi P, Maimunah U, Maulahela H, Rezkitha YA, Subsomwong P, Nasronudin, Rahardjo D, Suzuki R, Akada J, Yamaoka Y. (2016).** Surveillance of

## Références bibliographiques

---

*Helicobacter pylori* Antibiotic Susceptibility in Indonesia: Different Resistance Types among Regions and with Novel Genetic Mutations. *PLoS One*, **11**(12):e0166199.

- **Miftahussurur M, Cruz M, Subsomwong P, Jiménez Abreu JA, Hosking C, Nagashima H, Akada J, Yamaoka Y. (2017).** Clarithromycin-Based Triple Therapy is Still Useful as an Initial Treatment for *Helicobacter pylori* Infection in the Dominican Republic. *Am J Trop Med Hyg*, **96**(5):1050-1059.
- **Min S, Kim N, Kwon YH, Hee R, Kim JM, Youn J, Lee YS, Lee DH. (2017).** RdxA, frxA and efflux pump in metronidazole-resistant *Helicobacter pylori*: their relation to clinical outcomes. *J Gastroenterol Hepatol*, doi: 10.1111/jgh.13906.
- **Mishra S. (2013).** Is *Helicobacter pylori* good or bad? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **32**: 301-304.
- **Miyachi H, Miki I, Aoyama N, Shirasaka D, Matsumoto Y, Toyoda M, Mitani T, Morita Y, Tamura T, Kinoshita S, Okano Y, Kumagai S, Kasuga M. (2006).** Primary levofloxacin resistance and *gyrA/B* mutations among *Helicobacter pylori* in Japan. *Helicobacter*, **11**: 243–249.
- **Moayyedi P. (2005).** Should we test for *Helicobacter pylori* before treating gastroesophageal reflux disease?. *Can J Gastroenterol*, **19**: 425-427.
- **Moore R A, Beckthold B and Bryan LE. (1995).** Metronidazole uptake in *Helicobacter pylori*. *Can J Microbiol*, **41**:746-9.

### N

- **Nagiyev T, Yula E, Abayli B, Koksall F. (2009).** Prevalence and genotypes of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens from patients with gastroduodenal pathologies in the Cukurova region of Turkey. *J Clin Microbiol*, **47**:4150-4153.
- **Nardone G et Compare D. (2015).** The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases?. *United European Gastroenterol J*, **3**(3) 255–260.
- **Ndip RN, Malange Takang AE, Ojongokpoko JE, Luma HN, Malongue A, Akoachere JF, Ndip LM, MacMillan M, Weaver LT. (2008).** *Helicobacter pylori* isolates recovered from gastric biopsies of patients with gastroduodenal pathologies in Cameroon: current status of antibiogram. *Trop Med Int Health*, **13**(6):848-54.

## Références bibliographiques

---

- **Nishizawa T, Suzuki H, Hibi T. (2009).** Quinolone-Based third-Line therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Biochem Nutr*, **44**:119-124.
- **Nishizawa T, Suzuki H, Matsuzaki J, Muraoka H, Tsugawa H, Hirata K, Hibi T. (2011).** *Helicobacter pylori* resistance to rifabutin in the last 7 years. *Antimicrob Agents Chemother*, **55**(11):5374-5.
- **Nishizawa T et Suzuki H. (2014).** Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing. Published online 2014 Oct 24. Doi:10.3389/fmolb.2014.00019.
- **Nishizawa T, Maekawa T, Watanabe N, Harada N, Hosoda Y, Yoshinaga M, Yoshio T, Ohta H, Inoue S, Toyokawa T, Yamashita H, Saito H, Kuwai T, Katayama S, Masuda E, Miyabayashi H, Kimura T, Nishizawa Y, Takahashi M, Suzuki H. (2015).** Clarithromycin versus metronidazole as first-line *Helicobacter pylori* eradication: a multicenter, prospective, randomized controlled study in Japan. *J Clin Gastroenterol*, **49**: 468–471.

### O

- **Occhialini A, Urdaci M, Doucet-Populaire F, Bebear CM, Lamouliatte H et Megraud F. (1997).** Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**:2724-2728.
- **Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T, Hatakeyama M. (2008).** Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**: 1003-1008.
- **Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthelemy P et Megraud F. (2003).** Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, **41**:397-402.
- **Ontsira Ngoyi EN, Atipo Ibara BI, Moyen R, Ahoui Apendi PC, Ibara JR, Obengui O, Ossibi Ibara RB, Nguimbi E, Niama RF, Ouamba JM, Yala F, Abena AA, Vadivelu J, Goh KL, Menard A, Benejat L, Sifre E, Lehours P, Megraud F. (2015).** Molecular Detection of *Helicobacter pylori* and its Antimicrobial Resistance in Brazzaville, Congo. *Helicobacter*, **20**:316-20.

## Références bibliographiques

---

- **Osaki T , Matsuki T, Asahara T, Zaman C, Hanawa T, Yonezawa H, Kurata S, Woo TD, Nomoto K, Kamiya S. (2012).** Comparative analysis of gastric bacterial microbiota in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*. *Microbial path*, **53**:12-18.
- **Ozbey G, Dogan Y, Demiroren K, Ozercan IH. (2015).** Prevalence of *Helicobacter pylori* in children in Eastern Turkey and molecular typing of isolates. *Braz J Microbiol*, **46**(2):505–511.
- **Ozbey G, Hanafiah A. (2017).** Epidemiology, Diagnosis, and Risk Factors of *Helicobacter pylori* Infection in Children. *Euroasian J Hepatogastroenterol*, **7**(1):34-39.

### P

- **Padol S, Yuan Y, Thabane M, Padol IT, Hunt RH. (2006).** The effect of CYP2C19 polymorphisms on *H. pylori* eradication rate in dual and triple first-line PPI therapies: ameta-analysis. *Am J Gastroenterol*, **101**:1467-1475.
- **Palmer ED. (1954).** Investigation of the gastric mucosa spirochaetes of the humans. *Gastroenterology*, **27**:218-220.
- **Pandya HB, Agravat HH, Patel JS. (2017).** Prevalence of Specific *Helicobacter pylori* *cagA*, *vacA*, *iceA*, *ureC* Genotypes and its Clinical Relevance in the Patients with Acid-Peptic Diseases. *J Clin Diagn Res*, **11**(8):DC23-DC26.
- **Park JS, Park JE, Oh BS, Yoon BW, Kim HK, Lee JW, Kim NH, Cho WS, Woo YS, Jahng J, Kim YS. (2017).** Trend in the Eradication Rates of *Helicobacter pylori* Infection Over the Last 10 Years in West Gyeonggi-do, Korea: A Single Center Experience. *Korean J Gastroenterol*, **70**(5):232-238.
- **Pellicano R, Ribaldone DG, Fagoonee S, Astegiano M, Saracco GM, Mégraud F. (2016).** A 2016 panorama of *Helicobacter pylori* infection: key messages for clinicians. *Panminerva Med*, **58**(4):304-317.
- **Perry S, De la Luz Sanchez M, Yang S. (2006).** Gastroenteritis and transmission of Emerg Infect Dis, **12**:1701-1708.
- **Pesci EC, Pickett CL. (1994).** Genetic organization and enzymatic activity of a superoxide dismutase from the microaerophilic human pathogen, *Helicobacter pylori*. *Gene*, **143**:111-116.
- **Petra CV, Rus A, Dumitrașcu DL. (2017).** Gastric microbiota: tracing the culprit. *Clujul Med*, **90**(4):369-376. doi: 10.15386/cjmed-854. Epub 2017 Oct 20.

## Références bibliographiques

---

- **Pina M, Occhialini A, Monteiro L, Doermann HP et Megraud F. (1998).** Detection of point mutations associated with resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin by hybridization in liquid phase. *J Clin Microbiol*, **36**:3285-90.
- **Poehlsgaard J, Pfister P, Böttger EC, Douthwaite S. (2005).** Molecular mechanisms by which *rRNA* mutations confer resistance to clindamycin. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**(4):1553-5.

### R

- **Raaf N, Amhis W, Saoula H, Abid A, Nakmouche M, Balamane A, Ali Arous N, Ouar-Korichi M, Vale FF, Bénéjat L, Mégraud F. (2017).** Prevalence, antibiotic resistance, and MLST typing of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria. *Helicobacter*, doi: 10.1111/hel. 12446. [Epub ahead of print].
- **Ramzy I, Elgarem H, Hamza I, Ghaith D, Elbaz T, Elhosary W, Mostafa G, Elzahry MA. (2016).** Genetic mutations affecting the first line eradication therapy of *Helicobacter pylori*-infected egyptian patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **58**:88.
- **Raymond J, Thiberge JM, Kalach N, Bergeret M, Dupont C, Labigne A, Dauga C. (2008).** Using macro-arrays to study routes of infection of *Helicobacter pylori*. *PloS One*, **3**: e2259.
- **Raymond J, Lamarque D, Kalach N, Chaussade S, Burucoa C. (2010).** High level of antimicrobial resistance in French *Helicobacter pylori* isolates. *Helicobacter*, **15**(1):21–27.
- **Regnath T, Raecke O, Enninger A, Ignatius R. (2017).** Increasing metronidazole and rifampicin resistance of *Helicobacter pylori* isolates obtained from children and adolescents between 2002 and 2015 in southwest Germany. *Helicobacter*. **22**(1). doi: 10.1111/hel.12327. Epub 2016 Jul 11.
- **Reshetnyak VI, Reshetnyak TM. (2017).** Significance of dormant forms of *Helicobacter pylori* in ulcerogenesis. *World J Gastroenterol*, **23**(27):4867-4878. doi:10.3748/ wjg.v23.i27.4867.
- **Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. (2008).** Mutations in penicillin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother*, **61**:995-998.

## Références bibliographiques

---

- **Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. (2012).** Fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: role of mutations at position 87 and 91 of GyrA on the level of resistance and identification of a resistance conferring mutation in GyrB. *Helicobacter*, **17**(1):36-42.
- **Roberts MC. (2003).** Tetracycline therapy: update. *Clin Infect Dis*, **36**(4):462-7.
- **Román-Román A, Martínez-Carrillo DN, Atrisco-Morales J. (2017).** *Helicobacter pylori vacA s1m1* genotype but not *cagA* or *babA2* increase the risk of ulcer and gastric cancer in patients from Southern Mexico. *Gut Pathog*, **9**:18.
- **Ruiter R, Wunderink HF, Veenendaal RA, Visser LG, de Boer MGJ. (2017).** *Helicobacter pylori* resistance in the Netherlands: a growing problem? *Neth J Med*, **75**(9):394-398.
- **Ryan KA, van Doorn LJ, Moran AP, Glennon M, Smith T, Maher M. (2001).** Evaluation of clarithromycin resistance and *cagA* and *vacA* genotyping of *Helicobacter pylori* strains from the west of Ireland using line probe assays. *J Clin Microbiol*, **39**(5):1978-80.

### S

- **Salama N, Guillemin K, Mcdaniel TK, Sherlock G, Tompkins L, Falkow SA. (2000).** whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 14668-14673.
- **Salomon H. (1896).** Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. *Zentrallbl Bakteriolog*, **19**:433-442.
- **Sanches BS, Martins GM, Lima K, Cota B, Moretzsohn LD, Ribeiro LT, Breyer HP, Maguilnik I, Maia AB, Rezende-Filho J, Meira AC, Pinto H, Alves E, Mascarenhas R, Passos R, de Souza JD, Trindade OR, Coelho LG. (2016).** Detection of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in Brazil: A national survey. *World J Gastroenterol*, **22**(33):7587-94.
- **Schubert TT, Schubert AB et Ma CK (1992).** Symptoms, gastritis, and *Helicobacter pylori* in patients referred for endoscopy. *Gastrointest Endosc*, **38**(3):357-60.
- **Schwarz K. (1910).** Ueber penetrirende Magen- imf Jejunalgeschwuer. *Bitrage Klin Chir*, **68**:96-111.
- **Seck A, Buruoa C, Dia D, Mbengue M, Onambele M, Raymond J, Breurec S. (2013).** Primary antibiotic resistance and associated mechanisms in *Helicobacter pylori* isolates from Senegalese patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, **12**:3.

## Références bibliographiques

---

- **Secka O, Berg DE, Antonio M, Corrah T, Tapgun M, Walton R, Thomas V, Galano JJ, Sancho J, Adegbola RA, Thomas JE. (2013).** Antimicrobial susceptibility and resistance patterns among *Helicobacter pylori* strains from The Gambia, West Africa. *Antimicrob Agents Chemother*, **57**(3):1231-7.
- **Selgrad M, Malfertheiner P. (2017).** Management of *Helicobacter pylori* Infection: What Should the Surgeon Know? *Visc Med*, **33**(3):216-219.
- **Sewald X, Fischer W, Haas R. (2008).** *Helicobacter pylori* VacA takes shape. *Trends Microbiol*, **16**: 89-92.
- **Shao Y, Lu R, Yang Y, Xu Q, Wang B, Ye G. (2017).** Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* to 16 antibiotics in clinical patients. *J Clin Lab Anal*, doi: 10.1002/jcla.22339.
- **Sheu BS, Wu MS, Chiu CT, Lo JC, Wu DC, Liou JM, Wu CY, Cheng HC, Lee YC, Hsu PI, Chang CC, Chang WL, Lin JT. (2017).** Consensus on the clinical management, screening-to-treat, and surveillance of *Helicobacter pylori* infection to improve gastric cancer control on a nationwide scale. *Helicobacter*, **22**(3). doi:10.1111/hel.12368. Epub 2017 Jan 8.
- **Smeets LC, Arents NL, Van Zwet AA, Vandenbroucke-Grauls CM, Verboom T, Bitter W et Kusters JG. (2003).** Molecular patchwork: Chromosomal recombination between two *Helicobacter pylori* strains during natural colonization. *Infect Immun*, **71**:2907-2910.
- **Smith MA, Edwards DI. (1997).** Oxygen scavenging, NADH oxidase and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother*, **39**:347-53.
- **Smith MA, Finel M, Korolik V, Mendz GL. (2000).** Characteristics of the aerobic respiratory chains of the microaerophiles *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Arch Microbiol*, **174**(1-2):1-10.
- **Smith SI, Fowora MA, Otegbayo JA, Abdulkareem FB, Omonigbehin EA, Adegboyega A, Contreras M, Haas R. (2011).** Comparison of PCR with other diagnostic techniques for the detection of *H. pylori* infection in patients presenting with gastroduodenal symptoms in Nigeria. *Int J Mol Epidemiol Genet*, **2**:178-184.
- **Song Z, Zhang J, He L, Chen M, Hou X, Li Z, Zhou L. (2014).** Prospective multi-region study on primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from Chinese patients. *Dig Liver Dis*, **46**:1077–1081.

## Références bibliographiques

---

- **Song, Z, Zhou L, Zhang J, He L, Bai P and Xue Y. (2016).** Hybrid therapy as first-line regimen for *Helicobacter pylori* eradication in populations with high antibiotic resistance rates. *Helicobacter*, **21**: 382–388.
- **Steer HW. (1975).** Surface morphology of the gastroduodenal mucosa in duodenal ulceration. *Gut*, **25**:1203-1210.
- **Stone GG, Shortridge D, Versalovic J, Beyer J, Flamm RK, Graham DY, Ghoneim AT, et Tanaka SK. (1997).** A PCR-oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23S rRNA gene mutations in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**:712-4.
- **Subsomwong P, Miftahussurur M, Uchida T, Vilaichone RK, Ratanachu-Ek T, Mahachai V, Yamaoka Y. (2017).** Prevalence, risk factors, and virulence genes of *Helicobacter pylori* among dyspeptic patients in two different gastric cancer risk regions of Thailand. *PLoS One*, **12**(10):e0187113.
- **Suerbaum S, Josenhans C. (2007).** *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol*, **5**:441-452.
- **Sugimoto M, Wu JY, Abudayyeh S, Hoffman J, Brahem H, Al-Khatib K, Yamaoka Y, Graham DY. (2009).** Unreliability of results of PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical or environmental samples. *J Clin Microbiol*, **47**:738-742.
- **Sugimoto M, Sahara S, Ichikawa H, Kagami T, Uotani T and Furuta T. (2015).** High *Helicobacter pylori* cure rate with sitafloxacin-based triple therapy. *Aliment Pharmacol Ther*, **42**: 477–483.
- **Sugiyama, T, Sakaki N, Kozawa H, Sato R, Fujioka T, Satoh k, Sugano k, Sekine H, Takagi A, Ajioka Y et Takizawa T. (2002).** Sensitivity of biopsy site in evaluating regression of gastric atrophy after *Helicobacter pylori* eradication treatment. *Aliment Pharmacol Ther*, **2**:187-190.
- **Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. (2012).** Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infect Genet Evol*, **12**: 203-213.
- **Szajewska H, Horvath A, Piwowarczyk A. (2010).** Meta-analysis: the effects of *Saccharomyces boulardii* supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates and side effects during treatment. *Aliment Pharmacol Ther*, **32**:1069-1079.

## Références bibliographiques

---

### T

- **Tan MP, Kaparakis M, Galic M, Pedersen J, Pearse M, Wijburg OL, Janssen PH, Strugnell RA. (2007)** Chronic *Helicobacter pylori* infection does not significantly alter the microbiota of the murine stomach. **Appl Environ Microbiol**, **73**: 1010–1013.
- **Tankovic J, Lascols C, Sculo Q, Petit JC, Soussy CJ. (2003).** Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**: 3942-3944.
- **Tamayo E, Montes M, Fernández-Reyes M, Lizasoain J, Ibarra B, Mendarte U, Zapata E, Mendiola J, Pérez-Trallero E. (2017).** Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and its molecular determinants in Northern Spain, 2013-2015. *J Glob Antimicrob Resist*, **9**:43-46.
- **Taylor DE, Eaton M, Chang N, Salama SM. (1992).** Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *J Bacteriol*, **174**: 6800-6806.
- **Teh X, Khosravi Y, Lee WC, Leow AH, Loke MF, Vadivelu J, Goh KL. (2014).** Functional and molecular surveillance of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Kuala Lumpur. *PLoS ONE*, **9**:e101481.
- **Thiberge JM, Boursaux-Eude C, Lehours P, Dillies MA, Creno S, Coppée JY, Rouy Z, Lajus A, Ma L, Burucoa C, Ruskoné-Foumestaux A, Courillon-Mallet A, De Reuse H, Boneca IG, Lamarque D, Mégraud F, Delchier JC, Médigue C, Bouchier C, Labigne A, Raymond J. (2010).** From array-based hybridization of *Helicobacter pylori* isolates to the complete genome sequence of an isolate associated with MALT lymphoma. *BMC Genomics*, **11**:368.
- **Thi Huyen Trang T, Thanh Binh T, Yamaoka Y. (2016).** Relationship between *vacA* Types and Development of Gastrointestinal Diseases. *Toxins (Basel)*, **8**(6).
- **Thompson L. (2008).** Electron Micrographs courtesy of *Helicobacter pylori*, school of Biotechnology & Biomolecular Sciences, University of New South Wales. EURL: [www.cab.unimelb.edu.au/cab\\_helicobacter.htm](http://www.cab.unimelb.edu.au/cab_helicobacter.htm).
- **Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush**

## Références bibliographiques

---

- J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **388**:539-547.
- Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K, Faller G, Kirchner T, Kist M, Heesemann J et Haas R. (2000). Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. *Gut*, **46**:608-14.
  - Trend MA, Jorgensen MA, Hazell SL, Mendz GL. (2001). Oxidases and reductases are involved in metronidazole sensitivity in *Helicobacter pylori*. *Int J Biochem Cell Biol*, **33**:143-153.
  - Trespalacios-Rangél AA, Otero W, Arévalo-Galvis A, Poutou-Piñales RA, Rimbara E, Graham DY. (2016). Surveillance of Levofloxacin Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates in Bogotá-Colombia (2009-2014). *PLoS One*, **11**(7): e0160007.
  - Trieber CA, Taylor DE. (2002). Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *J Bacteriol*, **184**: 2131–40.
  - Tsugawa H, Suzuki H, Muraoka H, Ikeda F, Hirata K, Matsuzaki J, Saito Y, Hibi T. (2011). Enhanced bacterial efflux system is the first step to the development of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Biochem Biophys Res Commun*, **404**(2):656-60.
- V
- Vakil N, Mégraud F. (2007). Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, **133**: 985 -1001.
  - Vallve M, Vergara M, Gisbert JP, Calvet X. (2002). Single vs double dose of a proton pump inhibitor in triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a meta analysis. *Aliment Pharmacol Ther*, **16**:1149-1156.
  - Vandebosch S, Vanden Branden S, De Bel A, Urbain D, Mana F. (2009). How efficient is culture for *H. pylori* in daily clinical Practice. *Helicobacter*, **14**:390.

## Références bibliographiques

---

- **Van der Wouden EJ, Thijs JC, Van Zwet AA, Sluiter WJ, Kleibeuker JH. (1999).** The influence of *in vitro* nitroimidazole resistance on the efficacy of nitroimidazole-containing anti-*Helicobacter pylori* regimens: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, **94**:1751-1759.
- **Van Der Wouden EJ, Thijs JC, Van Zwet AA et Kleibeuker JH. (2000).** Review article: nitroimidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*, **14**:7-14.
- **Van Doorn LJ, Schneeberger PM, Nouhan N, Plaisier AP, Quint WG, de Boer WA.(2000).** Importance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. *Gut*, **46**(3):321–6.
- **Van Zanten SJ, Goldie J, Hollingsworth J, Silletti C, Richardson H, Hunt RH. (1992).** Secretion of intravenously administered antibiotics in gastric juice: implications for management of *Helicobacter pylori*. *Clin Pathol*, **45**: 225-22.
- **Van Zwet AA, Vandenbroucke-Grauls CM, Thijs JC, vander Wouden EJ, Gerrits MM, Kusters JG. (1998).** Stable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Lancet*, **352**:1595.
- **Versalovic J, Osato MS, Spakovsky K, Dore MP, Reddy R, Stone GG, Shortridge D, Flamm RK, S. K. Tanaka SK et Graham DY. (1997).** Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother*, **40**:283-6.
- **Villoria A, Garcia P, Calvet X, Gisbert JP, Vergara M. (2008).** Meta-analysis: High-dose proton pump inhibitors vs standard dose in triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther*, **28**:868-877.
- **Vinagre ID, Queiroz AL, Silva Júnior MR, Vinagre RM, Martins LC. (2015).** *Helicobacter pylori* infection in patients with different gastrointestinal diseases from northern Brazil. *Arq Gastroenterol*, **52**(4):266-71.
- **Vos M, Didelot X. (2009).** A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *ISME J*, **3**(2):199-208.

### W

- **Wang F, Wu X, Liu Z, Bu G, Li X, Qu N, Peng J, Xu C, Shen S, Yuan Y. (2015).** Association between virulence factors and TRAF1/4-1BB/Bcl-xL expression in gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Res Pract*, 648-479.

## Références bibliographiques

---

- **Wang LH, Cheng H, Hu FL, Li J. (2005).** Distribution of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* strains. *World J Gastroenterol*, **16**: 2272–2277.
- **Weisblum B. (1995).** Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents Chemother*, **39**:577-585.
- **Wu JY, Kim JJ, Reddy R, Wang WM, Graham DY, Kwon DH. (2005).** Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolats with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**:578-583.
- **Wu WM, Yang YS et Peng LH. (2014).** Microbiota in the stomach: New insights. *J Dig Dis*, **15**: 54–61.
- **Wüppenhorst N, Draeger S, Stüger HP, Hobmaier B, Vorreiter J, Kist M, Glocker EO; ResiNet Study Group. (2014).** Prospective multicentre study on antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Germany. *J Antimicrob Chemother*, **69**(11):3127-33.

### X

- **Xiao SD, Liu WZ, Xia DH, Jiang SJ, Wang RN, Zhang ZH, Xu WW. (1990).** The efficacy of furazolidone and metronidazole in the treatment of chronic gastritis associated with *Helicobacter (Campylobacter) pylori*: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Hepatogastroenterology*, **37**:503-506.

### Y

- **Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. (1999).** Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol*, **37**:2274-2279.
- **Yamaoka Y. (2010).** Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **7**: 629-641;
- **Yang I, Nell S, Suerbaum S. (2013).** Survival in hostile territory: The microbiota of the stomach. *FEMS Microbiol Rev*, **37**: 736–761.
- **Yang J, Ji S, Zhang Y, Wang J. *Helicobacter hepaticus* infection in primary hepatocellular carcinoma tissue 2013. Singapore Med J. 2013; 54:451-457.**

## Références bibliographiques

---

- **Yue JY, Yue J, Wang MY, Song WC, Gao XZ. (2014).** CagA status & genetic characterization of metronidazole resistant strains of *H. pylori* from: A region at high risk of gastric cancer. *Pak J Med Sci*, **30**(4):804-8.

### Z

- **Zamani M, Rahbar A, Shokri-Shirvani J. (2017).** Resistance of *Helicobacter pylori* to furazolidone and levofloxacin: A viewpoint. *World J Gastroenterol*, **23**(37): 6920-6922.
- **Zerbetto De Palma G, Mendiando N, Wonaga A, Viola L, Ibarra D, Campitelli E, Salim N, Corti R, Goldman C, Catalano M. (2017).** Occurrence of Mutations in the Antimicrobial Target Genes Related to Levofloxacin, Clarithromycin, and Amoxicillin Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates from Buenos Aires City. *Microb Drug Resist*, **23**(3):351-358.
- **Zhang W, Chen Q, Liang X, Liu W, Xiao S, Graham D Y, Lu H. (2015).** Bismuth, lansoprazole, amoxicillin and metronidazole or clarithromycin as first-line *Helicobacter pylori* therapy. *Gut*, **64**, 1715–1720.
- **Zhang YX, Zhou LY, Song ZQ, Zhang JZ, He LH et Ding Y. (2015).** Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with dyspeptic symptoms in Beijing: a prospective serial study. *World J Gastroenterol*, **21**: 2786–2792.
- **Zhao B, Zhao J, Cheng WF, Shi WJ, Liu W, Pan XL, Zhang GX (2014).** Efficacy of *Helicobacter pylori* eradication therapy on functional dyspepsia: a meta-analysis of randomized controlled studies with 12-month follow-up. *J Clin Gastroenterol*, **48**(3):241-7.
- **Zhen-Hua Z, De-Qiang H, Yong X, Lin-Lin L, Nong-Hua L. (2013).** Characterization of 23S rRNA gene mutation in primary and secondary clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains from East China. *Turk J Gastroenterol*, **24** (1): 5-9.
- **Zhou L, Zhang J, Chen M, Hou X, Li Z, Song Z, He L, Lin S. (2014).** A comparative study of sequential therapy and standard triple therapy for *Helicobacter pylori* infection: a randomized multicenter trial. *Am J Gastroenterol*, **109**: 535–541.

## *Publications*



# *Annexes*

## **Annexe 01**

### **Coloration de Gram (protocole)**

- Coloration par le violet de gentiane . Laissez agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincez à l'eau
- Mordançage au lugol : étalez le lugol et laissez agir le même temps que le violet de gentiane ; rincez à l'eau.
- Décoloration (rapide) à l'alcool : versez goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement, et surveillez la décoloration qui doit être rapide. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincez abondamment avec de l'eau
- Recoloration à la fuchsine. Mettez de l'eau distillée sur la lame et quelques gouttes de fuchsine. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute. Lavez doucement à l'eau déminéralisée. Séchez la lame sur une platine chauffante à 50°C.
- Observez avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement  $\times 1000$ ).

### **Gélose Muller Hinton**

Pour préparer 1L de gélose Muller Hinton

- Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Peptone.....17,50g
- Extrait de viande ..... 2,00g
- Amidon .....1,50g
- Agar.....17,00 g
- pH final du milieu à 25°C :  $7,3 \pm 0,1$ .

### **Gélose Cœur Cervelle**

Pour préparer 1L de gélose Cœur Cervelle

- Extrait coeur-cervelle .....17,50g
- Peptone pancréatique de gélatine .....10,00g
- Chlorure de sodium.....5,00g
- Phosphate disodique .....2,50g
- Glucose..... 2,00 g
- Agar agar bactériologique.....15,00g
- pH final du milieu à 25°C :  $7,4 \pm 0,2$ .

### **Gélose pylo base Cœur Cervele**

Pour préparer 1L de gélose pylo il faut ajouter les ingrédients suivant à la gélose cœur cervelle en surfusion : de et of.

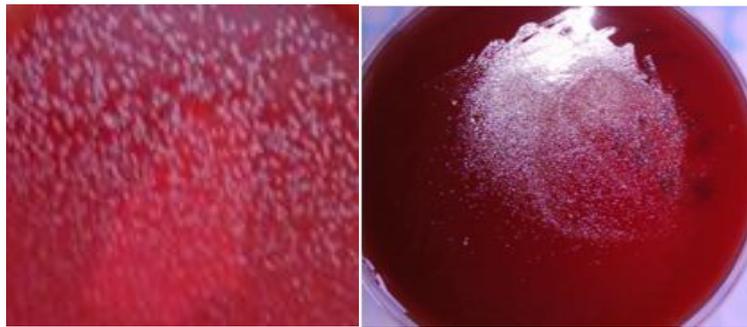
- Sang humain .....10%
- IsoVitaleX .....0.4%
- Trimethoprime .....5 mg/l
- Cefsulodine .....5 mg/l
- Vancomycine ..... 10 mg/l
- Amphotericine B .....8 mg/l

### **Bouillon de conservation**

Pour préparer 400ml de bouillon de conservation il faut :

- Glycérol .....100ml
- Néopeptone .....40g
- Chlorure de sodium .....20g
- Eau distillée .....300 ml

**Annexe 02 : résultats de la culture et de l'antibiogramme**



**Figure 01.** Aspect des colonies de *H. pylori* après culture de 72h.



**Figure 10 :** Isolat C14 résistant à la CLA



**Figure 11 :** Isolat S09 résistant au MTZ



S19-11-Fqdr-Rqdr-cons	AGGGCAACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGCAGCGATGCGTTACACTGAAGCCA
S19-12-Fqdr-Rqdr-cons	AGGGCAACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGCAGCGATGCGTTACACTGAAGCCA
S19-13-Fqdr-Rqdr-cons	AGGGCAACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGCAGCGATGCGTTACACTGAAGCCA
S19-14-Fqdr-Rqdr-cons	AGGGCAACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGCAGCGATGCGTTACACTGAAGCCA
S19-15-Fqdr-Rqdr-cons	AGGGCAACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGCAGCGATGCGTTACACTGAAGCCA
S19-16-Fqdr-Rqdr-cons	AGGGCAACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGCAGCGATGCGTTACACTGAAGCCA
S19-17-Fqdr-Rqdr-cons	AGGGCAACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGCAGCGATGCGTTACACTGAAGCCA
S19-18-Fqdr-Rqdr-cons	AGGGCAACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGCAGCGATGCGTTACACTGAAGCCA
S19-19-Fqdr-Rqdr-cons	AGGGCAACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGCAGCGATGCGTTACACTGAAGCCA
S19-20-Fqdr-Rqdr-cons	AGGGCAACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGCAGCGATGCGTTACACTGAAGCCA
	*****
S19-1-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-2-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-3-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-4-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-5-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-6-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-7-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-8-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-9-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-10-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-11-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-12-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-13-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-14-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-15-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-16-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-17-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-18-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-19-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
S19-20-Fqdr-Rqdr-cons	GAATGACYAAGGCGAGTGAAGAAATTTAAGGGATATTGATAAAGACACCATTGATTTTG
	*****
S19-1-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-2-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-3-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-4-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-5-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-6-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-7-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-8-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-9-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-10-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-11-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-12-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-13-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-14-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-15-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-16-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-17-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-18-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-19-Fqdr-Rqdr-cons	TA
S19-20-Fqdr-Rqdr-cons	TA
	**

**Figure01.** Alignement multiple d'une partie de la séquence d'ADN du gène *gyrA* des isolats sensibles et résistants à la CLA du Patient 05 ; De S19-1 à S19: sensibles au FLU.

S19-1-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-2-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-3-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-4-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-5-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-6-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-7-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-8-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-9-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-10-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-11-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-12-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-13-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-14-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-15-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-16-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-17-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-18-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN
S19-19-Fqdr-Rqdr-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELV DGQGN

S19-20-FqrdR-RqrdR-PEP	LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELVDGQGN *****
S19-1-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-2-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-3-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-4-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-5-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-6-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-7-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-8-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-9-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-10-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-11-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-12-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-13-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-14-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-15-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-16-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-17-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-18-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-19-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV
S19-20-FqrdR-RqrdR-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDFV *****

**Figure 02.** Alignement multiple d'une partie de la séquence peptidique codée par le gène *gyrA* des isolats sensibles et résistants à la CLA du Patient 05 ; De S19-1 à S19: sensibles au FLU.

C14-1-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-2-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-3-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-4-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-7-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-8-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-5-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-6-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-9-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-10-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-11-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-12-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-13-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-14-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-15-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-16-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-17-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-18-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-19-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA
C14-20-FqrdR-RqrdR-cons	TTTTGTATGCGATGCATGAATTAGGCCTTACTTCCAAAGTCGCTTATAAAAAAGCGCTA *****
C14-1-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-2-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-3-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-4-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-7-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-8-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-5-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-6-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-9-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-10-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-11-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-12-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-13-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-14-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-15-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-16-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-17-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-18-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-19-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG
C14-20-FqrdR-RqrdR-cons	GGATCGTGGGTGATGTGATTGGTAAATACCACCCCATGGCGACACCGCAGTTTATGGTG *****
C14-1-FqrdR-RqrdR-cons	CGTTAGTGAGAATGGCGAAGATTTTTTTATGCGCTTGAATTAGTGGATGGCGAGGTA
C14-2-FqrdR-RqrdR-cons	CGTTAGTGAGAATGGCGAAGATTTTTTTATGCGCTTGAATTAGTGGATGGCGAGGTA

C14-3-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-4-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-7-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-8-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-5-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-6-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-9-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-10-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-11-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-12-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-13-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-14-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-15-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-16-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-17-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-18-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-19-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 C14-20-Fqdr-Rqdr-cons CGTTAGTGAGAATGGCGCAAGATTTTTTTATGCGCTTGGAAATAGTGGATGGGCAGGGTA  
 \*\*\*\*\*

C14-1-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-2-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-3-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-4-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-7-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-8-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-5-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-6-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-9-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-10-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-11-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-12-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-13-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-14-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-15-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-16-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-17-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-18-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-19-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 C14-20-Fqdr-Rqdr-cons ACTTTGGCTCTATTGATGGCGATAACGCCGAGCGATGCGTTACACTGAAGCCAGAATGA  
 \*\*\*\*\*

C14-1-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-2-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-3-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-4-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-7-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-8-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-5-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-6-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-9-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-10-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-11-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-12-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-13-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-14-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-15-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-16-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-17-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-18-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-19-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 C14-20-Fqdr-Rqdr-cons CCAAGCGAGTGAAGAAATTTTAAGAGATATTGATAAAGACACCATTGATTTT  
 \*\*\*\*\*

**Figure03.** Alignement multiple d'une partie de la séquence d'ADN du gène *gyrA* des isolats sensibles et résistants à la CLA du Patient 01 ; C14-1 à C14-4, C14-7 et C14-8: résistants au FLU ; C14-5, C14-6 et de C14-9 à C14-20 : sensibles au FLU.

C14-1-Fqdr-Rqdr-PEP LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDVAVY ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN  
 C14-2-Fqdr-Rqdr-PEP LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDVAVY ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN  
 C14-3-Fqdr-Rqdr-PEP LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDVAVY ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN  
 C14-4-Fqdr-Rqdr-PEP LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDVAVY ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN  
 C14-7-Fqdr-Rqdr-PEP LYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDVAVY ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN

C14-8-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN
C14-5-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN
C14-6-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN
C14-9-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN
C14-10-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN
C14-11-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN
C14-12-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN
C14-13-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN
C14-14-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN
C14-15-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN
C14-16-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN
C14-17-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN
C14-18-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN
C14-19-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN
C14-20-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	LYAMHELGLTSTKVAYKKSARIIVGDVIGKYHPHGDTAVY	ALVRMAQDFFMRLELVDGQGN

\*\*\*\*\*

C14-1-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-2-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-3-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-4-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-7-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-8-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-5-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-6-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-9-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-10-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-11-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-12-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-13-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-14-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-15-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-16-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-17-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-18-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-19-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF
C14-20-Fqdrdr-Rqdrdr-PEP	FGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIKDTIDF

\*\*\*\*\*

**Figure04.** Aligement multiple des séquences peptidiques codées par le gène *gyrA* des isolats sensibles et résistants à la CLA du Patient 01 ; C14-1 à C14-4, C14-7 et C14-8: résistants au FLU ; C14-5, C14-6 et de C14-9 à C14-20 : sensibles au FLU.

dna22R-1-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-2-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-3-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-4-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-5-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-6-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-7-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-8-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-9-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-10-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-11-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-12-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-13-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-14-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-15-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-16-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-17-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-18-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-19-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD
dna22R-20-rdxA	MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDSDHYEFSSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWHFVMVDKD

\*\*\*\*\*

dna22R-1-rdxA	LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQNLYPESYKVRVIFSFAQMLG
dna22R-2-rdxA	LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQNLYPESYKVRVIFSFAQMLG
dna22R-3-rdxA	LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQNLYPESYKVRVIFSFAQMLG
dna22R-4-rdxA	LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQNLYPESYKVRVIFSFAQMLG
dna22R-5-rdxA	LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQNLYPESYKVRVIFSFAQMLG
dna22R-6-rdxA	LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQNLYPESYKVRVIFSFAQMLG
dna22R-7-rdxA	LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQNLYPESYKVRVIFSFAQMLG
dna22R-8-rdxA	LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQNLYPESYKVRVIFSFAQMLG
dna22R-9-rdxA	LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQNLYPESYKVRVIFSFAQMLG
dna22R-10-rdxA	LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQNLYPESYKVRVIFSFAQMLG
dna22R-11-rdxA	LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQNLYPESYKVRVIFSFAQMLG

```

dna22R-12-rdxA      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQONLYPESYKVRVISFAQMLG
dna22R-13-rdxA      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQONLYPESYKVRVISFAQMLG
dna22R-14-rdxA      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQONLYPESYKVRVISFAQMLG
dna22R-15-rdxA      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQONLYPESYKVRVISFAQMLG
dna22R-16-rdxA      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQONLYPESYKVRVISFAQMLG
dna22R-17-rdxA      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQONLYPESYKVRVISFAQMLG
dna22R-18-rdxA      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQONLYPESYKVRVISFAQMLG
dna22R-19-rdxA      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQONLYPESYKVRVISFAQMLG
dna22R-20-rdxA      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPHGHYMQONLYPESYKVRVISFAQMLG
*****

dna22R-1-rdxA      VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-2-rdxA      VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-3-rdxA      VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-4-rdxA      VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-5-rdxA      VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-6-rdxA      VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-7-rdxA      VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-8-rdxA      VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-9-rdxA      VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-10-rdxA     VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-11-rdxA     VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-12-rdxA     VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-13-rdxA     VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-14-rdxA     VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-15-rdxA     VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-16-rdxA     VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-17-rdxA     VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-18-rdxA     VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-19-rdxA     VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna22R-20-rdxA     VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
*****

dna22R-1-rdxA      CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-2-rdxA      CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-3-rdxA      CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-4-rdxA      CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-5-rdxA      CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-6-rdxA      CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-7-rdxA      CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-8-rdxA      CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-9-rdxA      CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-10-rdxA     CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-11-rdxA     CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-12-rdxA     CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-13-rdxA     CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-14-rdxA     CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-15-rdxA     CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-16-rdxA     CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-17-rdxA     CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-18-rdxA     CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-19-rdxA     CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna22R-20-rdxA     CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
*****

```

**Figure 05.** Alignement multiple des séquences peptidiques codées par le gène *gyrA* des isolats sensibles et résistants à la CLA du Patient 07 ; Isolats De R22-1 à R22-20 sensibles au MTZ.

```

dna14C-1-rdxA-PEP  MKFLDQEKRKQLLNECHSCKMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWRfVMVDKD
dna14C-2-rdxA-PEP  MKFLDQEKRKQLLNECHSCKMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNTQPWRfVMVDKD
dna14C-3-rdxA-PEP  MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-4-rdxA-PEP  MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-5-rdxA-PEP  MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-6-rdxA-PEP  MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-7-rdxA-PEP  MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-8-rdxA-PEP  MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-9-rdxA-PEP  MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-10-rdxA-PEP MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-11-rdxA-PEP MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-12-rdxA-PEP MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-13-rdxA-PEP MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-14-rdxA-PEP MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-15-rdxA-PEP MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-16-rdxA-PEP MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-17-rdxA-PEP MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----
dna14C-18-rdxA-PEP MKFLDQEKRKQLLNERHSCMFDShyEFSSTELEEIAE IARLSPSSYNT*-----

```

```

dna14C-19-rdxA-PEP      MKFLDQEKRKQLLNERHSCKMFDSDHYEFSSSTELEETAEIARLSPSSYNT*-----
dna14C-20-rdxA-PEP      MKFLDQEKRKQLLNERHSCKMFDSDHYEFSSSTELEETAEIARLSPSSYNT*-----
                        *****
dna14C-1-rdxA-PEP      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPTGHYMQNLYSESYKVRVISFVQMLG
dna14C-2-rdxA-PEP      LKKQIAAHSYFNEEMIKSASALMVVCSLRPSELLPTGHYMQNLYSESYKVRVISFVQMLG
dna14C-3-rdxA-PEP      -----
dna14C-4-rdxA-PEP      -----
dna14C-5-rdxA-PEP      -----
dna14C-6-rdxA-PEP      -----
dna14C-7-rdxA-PEP      -----
dna14C-8-rdxA-PEP      -----
dna14C-9-rdxA-PEP      -----
dna14C-10-rdxA-PEP     -----
dna14C-11-rdxA-PEP     -----
dna14C-12-rdxA-PEP     -----
dna14C-13-rdxA-PEP     -----
dna14C-14-rdxA-PEP     -----
dna14C-15-rdxA-PEP     -----
dna14C-16-rdxA-PEP     -----
dna14C-17-rdxA-PEP     -----
dna14C-18-rdxA-PEP     -----
dna14C-19-rdxA-PEP     -----
dna14C-20-rdxA-PEP     -----

dna14C-1-rdxA-PEP      VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna14C-2-rdxA-PEP      VRFNHSMQRLESYILEQCYIAVGQICMGVSLMGLDSCIIGGFDPKVGVEVLERINKPKIA
dna14C-3-rdxA-PEP      -----
dna14C-4-rdxA-PEP      -----
dna14C-5-rdxA-PEP      -----
dna14C-6-rdxA-PEP      -----
dna14C-7-rdxA-PEP      -----
dna14C-8-rdxA-PEP      -----
dna14C-9-rdxA-PEP      -----
dna14C-10-rdxA-PEP     -----
dna14C-11-rdxA-PEP     -----
dna14C-12-rdxA-PEP     -----
dna14C-13-rdxA-PEP     -----
dna14C-14-rdxA-PEP     -----
dna14C-15-rdxA-PEP     -----
dna14C-16-rdxA-PEP     -----
dna14C-17-rdxA-PEP     -----
dna14C-18-rdxA-PEP     -----
dna14C-19-rdxA-PEP     -----
dna14C-20-rdxA-PEP     -----

dna14C-1-rdxA-PEP      CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna14C-2-rdxA-PEP      CLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
dna14C-3-rdxA-PEP      -----
dna14C-4-rdxA-PEP      -----
dna14C-5-rdxA-PEP      -----
dna14C-6-rdxA-PEP      -----
dna14C-7-rdxA-PEP      -----
dna14C-8-rdxA-PEP      -----
dna14C-9-rdxA-PEP      -----
dna14C-10-rdxA-PEP     -----
dna14C-11-rdxA-PEP     -----
dna14C-12-rdxA-PEP     -----
dna14C-13-rdxA-PEP     -----
dna14C-14-rdxA-PEP     -----
dna14C-15-rdxA-PEP     -----
dna14C-16-rdxA-PEP     -----
dna14C-17-rdxA-PEP     -----
dna14C-18-rdxA-PEP     -----
dna14C-19-rdxA-PEP     -----
dna14C-20-rdxA-PEP     -----

```

**Figure 06.** Alignement multiple des séquences peptidiques codées par le gène *rdxA* des isolats sensibles et résistants à la CLA du Patient 01 ; Isolats De C14-3 à C14-20 résistants au MTZ par terminaison prématurée de la traduction (apparition de codon stop) ; C14-1 à C14-2 résistants au MTZ par mutations ponctuelles.

## Annexe 04 : Résultats de l'étude statistique

### Test de Chi-deux

**P** c'est la significativité du test si  $p < 0.05$  effet significatif si  $p \geq 0.05$  effet non significatif

Relation entre sexe du patients et la sensibilité au MTZ  $p=0.050$

**Tableau croisé**

		Sexe des patients		Total	
		F	H		
MTZ	Sensible	Effectif	86	97	183
		% compris dans MTZ	46,9%	53,1%	100,0%
		% du total	15,2%	17,2%	32,5%
		% compris dans MTZ	63,7%	36,3%	100,0%
		% du total	43,0%	24,5%	67,8%
		% compris dans MTZ	58,3%	41,7%	100,0%
		% du total	58,3%	41,7%	100,0%

Relation entre sexe du patients et la sensibilité à la CLA  $p=0.481$

**Tableau croisé**

		Sexe des patients		Total	
		F	H		
CLA	Sensible	Effectif	114	88	202
		% compris dans CLA	56,6%	43,4%	100,0%
		% du total	42,4%	32,5%	74,8%
		% compris dans CLA	63,2%	36,8%	100,0%
		% du total	15,9%	9,3%	25,2%
		% compris dans CLA	58,3%	41,7%	100,0%
		% du total	58,3%	41,7%	100,0%

Relation entre sexe du patients et la sensibilité à la AMOX  $p=$  - (sensibilité totale)

Tableau croisé

		Sexe des patients		Total	
		F	H		
AMOX	Sensible	% compris dans AMOX	58,3%	41,7%	100,0%
		% du total	58,3%	41,7%	100,0%
		% compris dans AMOX	58,3%	41,7%	100,0%
		% du total	58,3%	41,7%	100,0%

Relation entre sexe du patients et la sensibilité à la FLUO  $p= 0.576$

Tableau croisé

		Sexe des patients		Total	
		F	H		
FLUO	Sensible	% compris dans FLUO	59,3%	40,7%	100,0%
		% du total	49%	33,1%	82,1%
		% compris dans FLUO	53,6%	46,4%	100,0%
		% du total	9,3%	8,6%	17,9%
		% compris dans FLUO	58,3%	41,7%	100,0%
		% du total	58,3%	41,7%	100,0%

Relation entre sexe du patients et la sensibilité à la TETR  $p=$  - (sensibilité totale)

Tableau croisé

		Sexe des patients		Total	
		F	H		
TETR	Sensible	% compris dans TETR	58,3%	41,7%	100,0%
		% du total	58,3%	41,7%	100,0%
		% compris dans TETR	58,3%	41,7%	100,0%
		% du total	58,3%	41,7%	100,0%

Relation entre sexe des patients et la sensibilité à la RIFA  $p = -$  (sensibilité totale)

Tableau croisé

			Sexe des patients		Total
			F	H	
RIFA	Sensible	% compris dans RIFA	58,3%	41,7%	100,0%
		% du total	58,3%	41,7%	100,0%
		% compris dans RIFA	58,3%	41,7%	100,0%
		% du total	58,3%	41,7%	100,0%

### Relation entre la variable VacA et la sensibilité

Relation entre VacA et MTZ  $p=0.962$

Tableau croisé

			VacA		Total
			Négatif	Positif	
MTZ	Sensible	% compris dans MTZ	4,1%	95,9%	100,0%
		% du total	1,3%	31,1%	32,5%
		% compris dans MTZ	3,9%	96,1%	100,0%
		% du total	2,9%	64,9%	67,8%
		% compris dans MTZ	2,0%	98,0%	100,0%
		% du total	2,0%	98,0%	100,0%

Relation entre VacA et CLA  $p=0.624$

Tableau croisé

			VacA		Total
			Négatif	Positif	
CLA	Sensible	% compris dans CLA	4,4%	95,6%	100,0%
		% du total	3,3%	71,5%	74,8%
		% compris dans CLA	2,6%	97,4%	100,0%
		% du total	0,7%	24,5%	25,2%
		% compris dans CLA	2,0%	98,0%	100,0%
		% du total	2,0%	98,0%	100,0%

Relation entre VacA et AMOX  $p=-$

Tableau croisé

		VacA		Total	
		Négatif	Positif		
AMOX	Sensible	% compris dans AMOX	2,0%	98,0%	100,0%
		% du total	2,0%	98,0%	100,0%
		% compris dans AMOX	2,0%	98,0%	100,0%
		% du total	2,0%	98,0%	100,0%

Relation entre VacA et FLUO  $p=0.233$

Tableau croisé

		VacA		Total	
		Négatif	Positif		
FLUO	Sensible	% compris dans FLUO	4,9%	95,1%	100,0%
		% du total	4,0%	77,5%	82,1%
		% compris dans FLUO	0,0%	100,0%	100,0%
		% du total	0,0%	18,5%	17,9%
		% compris dans FLUO	2,0%	98,0%	100,0%
		% du total	2,0%	98,0%	100,0%

Relation entre VacA et TETR  $p=-$

Tableau croisé

		VacA		Total	
		Négatif	Positif		
TETR	Sensible	% compris dans TETR	2,0%	98,0%	100,0%
		% du total	2,0%	98,0%	100,0%
Total	% compris dans TETR	2,0%	98,0%	100,0%	
	% du total	2,0%	98,0%	100,0%	

Relation entre VacA et RIFA  $p=-$

Tableau croisé

			VacA		Total
			Négatif	Positif	
RIFA	Sensible	% compris dans RIFA	2,0%	98,0%	100,0%
		% du total	2,0%	98,0%	100,0%
Total		% compris dans RIFA	2,0%	98,0%	100,0%
		% du total	2,0%	98,0%	100,0%

### Relation entre la variable CagA et la sensibilité

Relation entre CagA et MTZ  $p<0.001$

Tableau croisé

			CagA		Total
			Négatif	Positif	
Sensible		% compris dans MTZ	81,6%	18,4%	100,0%
		% du total	26,5%	6,0%	32,5%
		% compris dans MTZ	36,3%	63,7%	100,0%
		% du total	24,5%	43,0%	67,8%
Total		% compris dans MTZ	42,0%	58,0%	100,0%
		% du total	42,0%	58,0%	100,0%

Relation entre CagA et CLA  $p=0.887$

Tableau croisé

			CagA		Total
			Négatif	Positif	
CLA	Sensible	% compris dans CLA	51,3%	48,7%	100,0%
		% du total	38,4%	36,4%	74,8%
		% compris dans CLA	50,0%	50,0%	100,0%
		% du total	12,6%	12,6%	25,2%

	Effectif			
Total	% compris dans CLA	42,0%	58,0%	100,0%
	% du total	42,0%	58,0%	100,0%

Relation entre CagA et AMOX  $p=-$

Tableau croisé

		CagA		Total	
		Négatif	Positif		
AMOX	Sensible	% compris dans AMOX	42,0%	58,0%	100,0%
		% du total	42,0%	58,0%	100,0%
		% compris dans AMOX	42,0%	58,0%	100,0%
		% du total	42,0%	58,0%	100,0%

Relation entre CagA et FLUO  $p=0.471$

Tableau croisé

		CagA		Total	
		Négatif	Positif		
FLUO	Sensible	% compris dans FLUO	49,6%	50,4%	100,0%
		% du total	32,0%	50,1%	82,1%
		% compris dans FLUO	57,1%	42,9%	100,0%
		% du total	10,0%	7,9%	17,9%
		% compris dans FLUO	42,0%	58,0%	100,0%
		% du total	42,0%	58,0%	100,0%

Relation entre CagA et TETR  $p=-$

Tableau croisé

		CagA		Total	
		Négatif	Positif		
TETR	Sensible	% compris dans TETR	42,0%	58,0%	100,0%
		% du total	42,0%	58,0%	100,0%
		% compris dans TETR	42,0%	58,0%	100,0%
		% du total	42,0%	58,0%	100,0%

Relation entre CagA et RIFA  $p=-$

Tableau croisé

			CagA		Total
			Négatif	Positif	
RIFA	Sensible	% compris dans RIFA	42,0%	58,0%	100,0%
		% du total	42,0%	58,0%	100,0%
Total		% compris dans RIFA	42,0%	58,0%	100,0%
		% du total	42,0%	58,0%	100,0%

Tests de corrélations

Entre VacA et MTZ

$r = 0.004, p = 0.963$

Entre VacA et CLA

$r = 0.040, p = 0.627$

Entre VacA et AMOX

$r = \dots, p = \dots$

Entre VacA et FLUO

$r = 0.097, p = 0.236$

Entre VacA et TETR

$r = \dots, p = \dots$

Entre VacA et RIFA

$r = \dots, p = \dots$

Entre CagA et MTZ

$r = 0.425, p < 0.001$

Entre CagA et CLA

$r = 0.012, p = 0.888$

Entre CagA et AMOX

$r = \dots, p = \dots$

Entre CagA et FLUO

$r = -0.059, p = 0.474$  **(corrélacion négative)**

Entre CagA et TETR

$r = \dots, p = \dots$

Entre CagA et RIFA

$r = \dots, p = \dots$

**Effet de la répartition par région sur la sensibilité aux différents antibiotiques**

$P=0.488$

Tableau croisé

		MTZ		Total	
		Sensible	Résistante		
Région	Alger	% compris dans Région	25,0%	75,0%	100,0%
		% du total	9,6%	16,9%	26,5%
	Oran	% compris dans Région	29,0%	71,0%	100,0%
		% du total	2,3%	18,2%	20,5%
	Chlef	% compris dans Région	39,6%	60,4%	100,0%
		% du total	19,1%	16%	35,1%
	Sidi-Bel-Abbès	% compris dans Région	33,3%	66,7%	100,0%
		% du total	1,4%	16,5%	17,9%
	Total	% compris dans Région	32,5%	67,5%	100,0%
		% du total	32,5%	67,5%	100,0%

P=0.820

Tableau croisé

		CLA		Total	
		Sensible	Résistante		
Région	Alger	% compris dans Région	75,0%	25,0%	100,0%
		% du total	19,5%	7%	26,5%
	Oran	% compris dans Région	71,0%	29,0%	100,0%
		% du total	14,6%	6,0%	20,5%
	Chlef	% compris dans Région	73,6%	26,4%	100,0%
		% du total	25,8%	9,3%	35,1%
	Sidi-Bel-Abbès	% compris dans Région	81,5%	18,5%	100,0%
		% du total	11,9%	6%	17,9%
	Total	% compris dans Région	74,8%	25,2%	100,0%
		% du total	74,8%	25,2%	100,0%

$P=0.434$

**Tableau croisé**

		FLUO		Total	
		Sensible	Résistante		
Région	Alger	% compris dans Région	85,0%	15,0%	100,0%
		% du total	21,7%	4,8%	26,5%
	Oran	% compris dans Région	83,9%	16,1%	100,0%
		% du total	16,5%	4%	20,5%
	Chlef	% compris dans Région	83,0%	17,0%	100,0%
		% du total	30,1%	5%	35,1%
	Sidi-Bel-Abbès	% compris dans Région	70,4%	29,6%	100,0%
		% du total	13,9%	4%	17,9%
	Total	% compris dans Région	82,1%	17,9%	100,0%
		% du total	82,1%	17,9%	100,0%