

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
I-REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
A-GENERALITES SUR <i>HELICOBACTER PYLORI</i>.....	2
1. Historique.....	2
2. Epidémiologie de L' <i>Helicobacter pylori</i>	2
2.1. Réservoir.....	2
2.2. Prévalence de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i>	3
2.3. Transmission.....	3
3. Caractéristique bactériologiques.....	4
3.1. Taxonomie.....	4
3.2. Morphologie.....	4
3.3. Caractéristique culturaux.....	5
3.4. Caractères biochimiques	5
3.5. Génomes et diversité génétique.....	5
B-PATHOGENICITE DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	6
1. Facteurs de virulence bactérienne.....	6
1.1. Facteurs de colonisation et de persistance bactérienne.....	6
1.1.1. Activité uréasique.....	6
1.1.2. Mobilité.....	7
1.1.3. Adhérence bactérienne.....	8
1.1.4. Autres enzymes.....	8
1-1-5 Persistance de la bactérie.....	8
1.2. Facteurs d'altération tissulaire.....	9
1.2.1. Ilots de pathogénicité Cag PAI.....	9
1.2.2. gène de virulence vacA.....	10

1-2-3. Associations des différentes souches <i>H.pylori</i> avec les pathologies gastriques.....	11
C-MALADIES ASSOCIEES A L'INFECTION A <i>H.PYLORI</i>.....	11
1. Gastrite.....	12
2. Ulcère gastroduodénale.....	12
3. Cancer gastrique.....	13
4. Lymphome gastrique du MALT.....	13
II- MATERIEL ET METHODES.....	14
A- REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE.....	14
1-Principe.....	14
2-Protocole.....	15
B-ELECTROPHORESE.....	16
1-Principe.....	16
C-ANALYSE STATISTIQUE.....	17
III-RESULTATS ET DISCUSSION.....	18
1-Population étudiée.....	18
2-Génotypage de la région C du gène vac A de <i>H.pylori</i>	19
3-Corrélation des facteurs étudiés aux pathologies gastriques.....	20
4- Corrélation des sous types de la région c du vacA aux pathologies gastriques.....	21
5- Corrélation des sous types de la région c du vacA aux facteurs étudiés.....	22
DISCUSSION.....	24
CONCLUSION.....	27
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	28

I- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Après la découverte de *Helicobacter pylori* dans l'estomac humain, les concepts concernant les pathologies gastriques ont été bouleversés. Le rôle pathogène de cette bactérie au niveau de la muqueuse gastrique a été largement étudié. Dès lors, son implication dans les maladies gastriques notamment les plus sévères de types tumorales a été confirmée (IARC, 1994).

La présence de divers gènes de virulence polymorphe au niveau du génome de *H.pylori* lui permet d'exercer un fort pouvoir pathogène sur l'hôte ce qui engendre une évolution vers différentes pathologies gastriques (Labigne , 1996).

H.pylori qui colonise sélectivement l'estomac humain est devenue un déterminant majeur des maladies gastroduodénales. Le gène de cytotoxine vacuolisante A (vacA), qui code pour la toxine multifonctionnelle vacA est un gène de virulence de *H.pylori* qui joue un rôle fondamental dans l'incidence des maladies associées à cette bactérie. Il est présent chez toutes les souches et comprend 5 régions polymorphes m, i, s et d en plus d'une région vacA c qui a été nouvellement identifiée (Bakhti et al.,2016). Cette dernière est située à l'extrémité 3' du gène vacA. Le rôle déterminant des différentes régions m,i,s et d dans la pathogenèse de *H.pylori* a été montré, mais jusqu'à présent, les études sur l'implication de la région vacA c dans les maladies gastroduodénales restent très limitées. L'objectif de ce travail porte sur la caractérisation de cette région à partir de prélèvements gastriques *H.pylori* positifs obtenus chez la population Marocaine, ainsi que l'étude de son association avec les différentes pathologies gastriques.

1- Historique

Depuis longtemps, l'estomac humain était qualifié de stérile vu sa forte. Les scientifiques considéraient que les maladies gastriques sont liées à un régime alimentaire inadéquat ou au stress acidité (Mégraud, 2005). En 1906, un médecin Allemand a observé pour la première fois des bactéries spiralées dans l'estomac humain mais les scientifiques restaient convaincus de la stérilité gastrique. En 1982, la première culture d'une bactérie résidante dans l'estomac humain a été obtenue par Barry Marshall et Robin Warren. Malgré cette découverte révolutionnaire, la communauté médicale n'a pas été convaincue que les maladies gastriques sont essentiellement infectieuses. Après des études morphologiques de la bactérie détectée, cette dernière a été nommée *Campylobacter pylori* vu sa morphologie et son caractère micro-aérophile comparables à ceux de *Campylobacter jejuni*. Ensuite, les études portant sur la caractérisation génétique et phénotypiques de cette bactérie ont permis de l'individualiser dans un nouveau genre et de la baptiser *Helicobacter pylori* (Mégraud, 2005).

En 1994 et après un long débat les maladies gastriques ont été qualifiées de pathologies essentiellement infectieuses dont l'agent responsable est *Helicobacter pylori* et qui sont guérissables par un simple traitement antibiotique (IARC, 1994).

2- Epidémiologie de L'*Helicobacter pylori*

2-1. Réservoir :

L'estomac est l'habitat principal de *H.pylori* (Cover et Blaser, 2009). Il peut y avoir une extension de *H.pylori* dans le duodénum proximal ou l'œsophage distal, comme elle a également été retrouvée dans l'épithélium gastrique ectopique dans le diverticule de Meckel (Ackerman et al., 2003). *H. pylori* a été trouvée dans la salive, la plaque dentaire et les excréments (Fernández et al., 2011).

La présence d'un réservoir environnemental de *H.pylori* a été toujours suspectée. Grâce à des techniques moléculaire (PCR et d'hybridation in situ en fluorescence), l'ADN de cette

bactérie a été retrouvée dans l'eau (Giao et al., 2008 ; Azevedo et al., 2009 ; Atapoor et al., 2014).

Plusieurs études ont reporté qu'il y a une relation entre la consommation de quelques aliments et l'infection à *H.pylori* (Goodman.,1996) mais cette bactérie n'a jamais été détectée ni par culture ni par technique moléculaire dans aucun aliment.

L'hypothèse que *H.pylori* soit une zoonose a été mentionnée dans plusieurs études mais elle n'a jamais été retrouvée chez les animaux. D'autres espèces appartenant au genre *Helicobacter* ont été détectées chez quelques animaux notamment *Helicobacter suis* qui a été retrouvée chez le porc (Ghill et al.,2009).

2-2 Prévalence de l'infection à *Helicobacter.pylori*

Une grande proportion de la population mondiale est infectée par *H.pylori*. La variabilité de la prévalence de cette infection dépend de plusieurs facteurs, à citer les plus importants qui sont l'âge et les conditions socio-économiques du pays. En fait, l'infection à *H.pylori* survient dans plus 90% des cas pendant l'enfance (<5ans) (Granström et al., 1997) et est moins fréquentes dans les pays industrialisés (25% à 30%). Cependant, elle est très répandue dans les pays en voie de développement et sa prévalence peut atteindre 90% (WGO, 2010). Cette forte prévalence est liée, entre autres, aux conditions sanitaires précaires et l'absence de traitement (Nurgalieva et al., 2002 ; Vale et Vitor., 2010).

2-3 Transmission :

Jusqu'à présent, le mode de transmission de *H.pylori* reste mal connu. La transmission gastro-orale a été suspectée après une grande prévalence de l'infection chez les gastro-entérologues. Elle se fait par le biais de micro-gouttelettes de jus gastrique qui proviennent lors des endoscopies (Hildebrond et al., 2000). Les vomissements et les reflux gastro-intestinaux présentent les principaux moyens de ce mode de transmission (Mitchell et al., 1992).

Malgré la confirmation de la présence de *H.pylori* dans la cavité buccale et la salive, aucune étude n'a montré la transmission de la bactérie par voie oro-orale (burger et al., 2008).

À cause de sa sensibilité à la bile, *H.pylori* ne peut survivre que brièvement dans l'intestin lors du transit intestinal (Azzapoor, 2009), ce qui fait que sa présence dans les selles est rarement rencontrée. Le fait que les selles peuvent renfermer des formes d'*H.pylori* viables, en cas de transit accéléré, la transmission par voie féco-orale peut avoir lieu. Ce mode de transmission est généralement décrit dans les pays en développement et est lié à une mauvaise hygiène fécale ou au non traitement des eaux (Mégraud et al., 2003).

3- Caractéristique bactériologiques :

3-1 Taxonomie :

H.pylori est une bactérie appartenant à la division des Proteobacteria, la classe des *Epsilonproteobacteria* et l'ordre des Campylobacterale. Elle fait partie de la famille des Helicobacteriaceae (Mégraud et Lehours, 2007) et est qualifiée de chef de file du genre *Helicobacter*, elle est spécifique de l'Homme (Solnick et Schauer, 2001).

3-2 Morphologie :

H.pylori est un bacille gram -, spiralé, non sporulant qui mesure 2 à 6 µm de long et 0,5 à 1 µm de large (De Mascarel et Merlio, 1989). Il se présente sous forme spiralée, incurvée ou en forme de U ou O dans les jeunes cultures qui peuvent évoluer vers des formes coccoïdes non cultivables en milieu défavorable. Cette bactérie est caractérisée par la présence de flagelles unipolaires engainés par une double couche phospholipidique.



Figure 1: Morphologie de *H.pylori* en microscope électronique à balayage (<http://preveengeorge.blogspot.com/2011/02/h-pylori-and-peptic-ulcers.html>)

3-3 Caractéristiques culturaux :

H.pylori est une bactérie très exigeante, son isolement et sa culture exigent des milieux de culture enrichis en sang ou bien en sérum, elle peut être cultivée soit sur la Gélose Columbia/Brucella de Wilkins Chalgren enrichie à 10% de sang de cheval ou de sang de mouton ou sur gélose sélective *H.pylori* (PYL) de biomérieux.

H.pylori est micro-aerophile et exige une atmosphère humide qui contient 2 à 5% d'O₂ et 10% de CO₂ pour une croissance optimale (Mégraud et Lehours ,2007). Les colonies apparaissent après une incubation de 2 à 5 jrs à 37°C. Elles sont translucides, régulières, non pigmentées et présentent un diamètre de 1 mm.

3-4 Caractères biochimiques :

L'adaptation de *H.pylori* au milieu gastrique et son pouvoir pathogène nécessitent un équipement enzymatique adéquat. La plus importante enzyme de *H.pylori* est l'urease qui lui permet de résider dans l'estomac humain malgré son extrême acidité. D'autres enzymes lui permettent de faire face à la réponse immunitaire et sont indispensables pour sa persistance (la Catalase, la superoxyde dismutase...).

3-5 Génomes et diversité génétique :

Le génome de *H.pylori* est constitué d'un seul chromosome circulaire d'une taille de 1,6mbp (De Reuse et Bereswill, 2007). Il code pour environ 27000 protéines dont 500 sont reconnues spécifiques à la bactérie, ce qui fait de *Helicobacter pylori* une bactérie particulière (Lamarque, 1998). Une partie du génome, qui comprend environ 1200 gènes, est essentielle à la physiologie de la bactérie et elle est commune à toutes les souches en plus chaque souche possède des séquences caractéristiques et uniques (Gressmann et al., 2005). Le génome de *H.pylori* présente un grand polymorphisme entre les différentes souches. Cette variabilité génétique est dû aux gènes de virulence qui sont très polymorphes. Ce polymorphisme

implique une grande variabilité du pouvoir pathogène et permet à *H.pylori* de s'adapter parfaitement à son environnement (Blaser et Berg, 2001).

Pathogénicité de *H.pylori*

H.pylori est une bactérie à fort pouvoir pathogène, sa présence dans l'estomac implique toujours une gastrite qui est une inflammation de la muqueuse gastrique. La gastrite passe généralement inaperçue au premier stade de l'infection, et évolue vers une gastrite chronique laquelle peut rester asymptomatique chez la majorité des sujets, mais elle peut conduire à des pathologies très sévères notamment l'ulcère gastroduodénale et des pathologies tumorales. L'évolution de la maladie dépend de 3 facteurs : les gènes de virulence de la souche, l'hôte et l'environnement (wroblewski et al., 2010).

1- Facteurs de virulence bactérienne

La virulence de *H.pylori* réside dans sa capacité d'adhérer aux cellules épithéliales, persister en résistant à l'acidité gastrique et en échappant à la réponse immunitaire, pour finalement exercer son pouvoir pathogène en agressant la muqueuse gastrique. Ces différentes fonctionnalités sont conférées à *H.pylori* grâce à son génome qui code pour différentes enzymes et protéines dont chacun à un rôle dans la virulence. Les gènes ure, l'ilot de pathogénicité cag PAI et le gène vacA sont parmi les gènes déterminant de la pathogénicité de *H.pylori*.

1-1 Facteurs de colonisation et de persistance bactérienne :

1-1-1 Activité uréasique :

La capacité de *H. pylori* à se développer dans l'environnement acide de l'estomac dépend de la génération de grandes quantités (10-15% de protéines totales) de l'enzyme 'uréase' (Ha et al.,2001). En produisant de l'ammoniac et du CO₂ à partir de l'urée de l'hôte, l'uréase neutralise l'acidité gastrique et permet à *H.pylori* de proliférer (Perez et al., 1992). L'uréase de *H. pylori* est principalement localisée dans le cytoplasme, mais presque 20 % sont libérées dans le milieu de culture ou trouvées absorbées à la surface des cellules. Les souches

d'*H.pylori* déficientes en uréase n'ont jamais été isolées chez les patients et sont présumées ne pas être infectieuses (Mobley et al., 2001).

L'uréase est codée par plusieurs gènes : 2 gènes qui codent pour la structure de l'apoenzyme (ureA et ureB), et cinq gènes (ureI, ureE, ureF, ureG et ureH) qui codent pour des protéines participant à l'activation de l'enzyme par incorporation des ions nickels (Ha et al., 2001).

La résistance de l'enzyme à l'acidité lui est garantie grâce à la formation d'un complexe hyper compact constitué de 12 sous unités ureA et 12 sous unités ureB sur lesquels se fixent 24 ions de Nickel. (Ha et al., 2001).

Le gène ureI code pour une protéine qui forme un pore à urée au niveau de la membrane plasmique. Ce dernier permet un transport adéquat de l'urée quand la bactérie se trouve dans un milieu acide (McGee et al., 1999). Ce gène est indispensable à la survie de *H.pylori*.

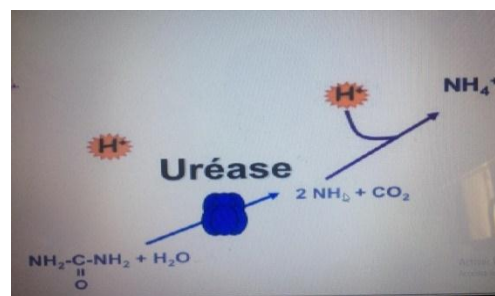


Figure 2 : Activité de l'enzyme uréase

[www.pasteur.fr/formation/AAEIP/Downloads/Hilde de Reuse .ppt](http://www.pasteur.fr/formation/AAEIP/Downloads/Hilde%20de%20Reuse.ppt)

1-1-2 Mobilité :

La mobilité de *H.pylori* est un facteur indispensable à sa survie et à la colonisation de la muqueuse gastrique. Sa forme spiralée et ses flagelles unipolaires lui permettent de passer rapidement par le suc gastrique et pénétrer dans la couche du mucus (Hazell et al., 1986). La fonctionnalité de l'appareil flagellaire de *H.pylori* exige l'expression d'une quarantaine de gènes et qui est bien régulée grâce aux protéines FibA, FigR et FlgE (Tomb et al., 1997).

1-1-3 Adhérence bactérienne :

Une fois *H.pylori* atteint la surface des cellules épithéliales de l'hôte, elle y adhère grâce à ses adhesines qui sont codées par une multitude de gènes tel que : le gène babA, babB , alpA alpB et sabA.

Le gène babA code pour l'adhesine Bab qui se fixe sur l'antigène fucolysé "lewis b" localisé à la surface des cellules épithéliales (Ilver et al., 1998). L'inactivation des gènes alpA et alpB conduit à une diminution d'adhésion aux cellules épithéliales gastriques (Odenbreit et al., 1999).

1-1-4 Autres enzymes :

La colonisation de la muqueuse gastrique par *H.pylori* est renforcée grâce à certaines enzymes qui affaiblissent la barrière protectrice du mucus. *H.pylori* possède une activité protéasique qui permet la destruction d'une protéine entrant dans la composition du mucus nommée la mucine, et possède aussi une activité lipasique qui participe dans l'altération de la structure phospholipidique de l'épithélium gastrique.

1-1-5 Persistance de la bactérie :

Après l'adhérence et la prolifération de *H.pylori* au niveau de la muqueuse gastrique, l'infection commence à se manifester. Ceci engendre une réponse immunitaire (humoral et cellulaire) spécifique contre la bactérie. *H.pylori* peut s'échapper ou résister à cette réponse et ceci grâce à son équipement enzymatique à citer : la superoxyde dismutase, la catalase et l'alkylhydroperoxyde (Hazell et al., 1986 ; Odenbreit et al., 1996 ; Pesci et al., 1994)

1-2 Facteurs d'altération tissulaire

1-2-1 Ilots de pathogénicité Cag PAI :

L'îlot de pathogénicité cag PAI est une région génomique qui comprend une trentaine de gènes. Ces derniers codent pour des protéines de la famille cag et pour un système de sécrétion de type 4 (SSTIV) (Tegtmeyer et al., 2011 ;Roesler et al., 2014). L'îlot n'est pas présent dans toutes les souches de *H.pylori*. Ainsi les souches sont classées en 2 catégories : la première comprend les souches de type 1 qui possèdent dans leur génome un îlot de pathogénicité, et la deuxième englobe les souches de type 2 qui en sont dépourvus. Toutes les souches, indépendamment de la présence de cet îlot, provoquent une gastrite, mais la présence de cette région génomique accroît le risque des maladies ulcéreuses, gastrites sévères et du cancer gastrique. (Wroblewski et al., 2010; Roesler et al.,2014).

Le système de sécrétion de type 4 (SSTIV) est un complexe multimerique de structure analogue à une seringue qui assure le transport de diverses macromolécules à travers la membrane cellulaire. Il contribue à la virulence de *H.pylori* en permettant le passage de facteurs bactériens à l'intérieur de la cellule épithéliale. L'une de ces protéines, cagE, qui est un composant structurel du système de sécrétion fonctionnel de type IV et l'inactivation de son produit génique annule l'administration des protéines de *H. pylori* dans les cellules hôtes (Roesler et al., 2014).

Un autre composant du système de sécrétion, cagL, fonctionne comme une adhésine bactérienne spécialisée qui se lie à et active les récepteurs de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, déclenchant l'administration de molécules effectrices bactériennes dans le cytoplasme des cellules hôtes (Kwok et al., 2007). cagL relie le système de sécrétion de type IV aux intégrines $\alpha 5\beta 1$ sur les cellules cibles et active la kinase d'adhésion focale de l'hôte. La protéine cagA est un autre composant qui cause de nombreux effets délétères sur la cellule épithéliale. Ce complexe de sécrétion induit aussi la synthèse de l'I1-8 à partir des cellules épithéliales (Roesler et al., 2014).

Dans le cytoplasme des cellules épithéliales de l'hôte, une tyrosine kinase permet la phosphorylation des résidus tyrosine présent au niveau d'un motif répétés « Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala » (Motif EPIYA) de la protéine cagA. La protéine cagA agit aussi sur une tyrosine

phosphatase (SHP-2) et implique des changements dans la signalisation de la cellule (Yamaoka, 2012).

1-2-2 Gène de virulence vacA

Le gène *vacA* code pour la cytotoxine vacuolisante *vacA* qui est une protéine de 140 KDa qui se clive aux extrémités N-terminale et C-terminale lors de sa sécrétion pour donner 2 sous unités A et B de 33 et 55 KDa liées de façon non covalente (Rieder et al., 2005). La grande sous unité permet à la toxine de se lier aux cellules épithéliales pour qu'elle soit internalisée et se localiser autour du noyau (Garner et Cover, 1996). Toutes les souches d'*H.pylori* possèdent le gène *vacA*, mais seulement 40% de ces bactéries ont un effet vacuolisant. Le gène *vacA* comprend 5 régions polymorphes : (s) signal qui code pour une partie de l'extrémité N-terminale de la protéine; (m) milieu, code pour une partie de la sous unité B terminale de 55KDa; (i) intermédiaire, situé entre s et m et qui possède un rôle fonctionnel dans les activités de création de vacuoles et la région (d) de suppression qui comprend une suppression de 81pb située entre les régions m et i) *vacA c* , nouvellement décrit est site polymorphe , identifié dans la région terminale 3' du gène *vacA* . Ce dernier se présente sous 2 formes *c1/c2* avec *c1* présentant une délétion de 15pb (Bakhti et al., 2016).

La région (s) du *vacA* présente différents sous type *s1a*, *s1b*, *s1c* et *s2*, alors que la région (m) est subdivisée en 2 sous types *m1* et *m2*. La diversité allélique de ces différents sites conduit à une multitude de combinaisons alléliques possible et par conséquent a une activité cytotoxique variable selon les souches (Piazuelo et al., 2010). La prévalence de chaque sous type de ces régions peut différer d'un pays à un autre. La combinaison allélique la plus virulente des sous types de ces 2 régions est *s1m1*, suivie de *s1m2* alors que *s2m2* ne possède pas d'activité cytotoxique et *s2/m1* est rare (Paniagua et al., 2009 ;Kusters et al, 2006; Roesler et al., 2014), cela a été confirmé par plusieurs études dans différents pays. Dans d'autres rapports plus récents, la prévalence des allèles des régions (i) (*i1,i2*) et d (*d1* et *d2*) a été étudiée et corrélée avec les deux autres sous types déjà cités, l'allèle *i1* est plus répandu et fortement associé aux pathologies gastriques que *i2* (Chung C. et al., 2010).

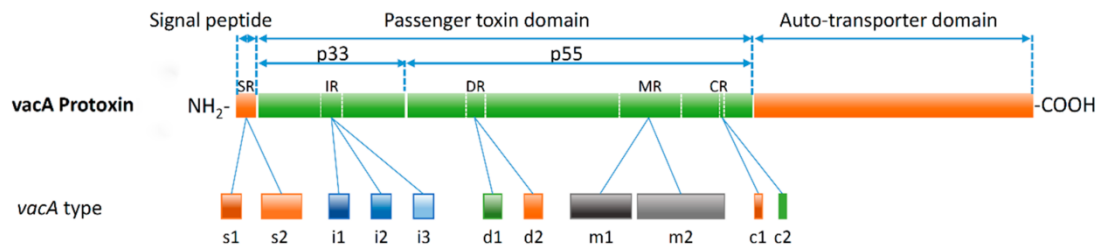


Figure 3: Gène de virulence *vacA* de *H.pylori* (Tran et al., 2016)

1-2-3 Associations des différentes souches *H.pylori* avec les pathologies gastriques

L'association des différentes combinaisons alléliques avec les pathologies gastriques a été étudiée, en Chine. Peng. et ces coll ont trouvé que la combinaison *vacA* s1m2 est fortement associée à l'ulcère gastroduodéal (Peng. et al., 2000). Une autre étude effectuée en Allemagne, a montré une grande association entre la combinaison *vacA* s1m1 avec l'ulcère (Rudi. et al., 1998). Le cancer gastrique a été associé dans plusieurs études aux souches *vacA* s1m1 (Stephan. et al., 2000). Basiri et col ont conclu que le sous type d1 est étroitement associé au cancer gastrique et aussi à l'ulcère gastrique (Basiri et al., 2014).

C- Maladies associés à l'infection à *H.pylori* :

L'infection par *H. pylori*, acquise le plus souvent dans l'enfance, persiste toute la vie et elle engendre différentes pathologies connues la gastrite chronique, l'ulcère gastroduodéal, le cancer gastrique et le lymphome du MALT.

1- Gastrite :

La gastrite est une réaction inflammatoire de la muqueuse gastrique résultante de l'infection par *H.pylori*. Au début de l'infection, la forme aiguë passe dans la plupart des cas inaperçue, mais par la suite, cette maladie devient chronique. La gastrite est la lésion de base et l'élément clé dans la pathogénie liée à *H.pylori*. Elle est caractérisée par une introduction massive de polynucléaires neutrophiles et de lymphoplasmocytes dans la muqueuse gastrique correspondant à la réaction inflammatoire. Il existe 2 type de gastrites chroniques, la première est de type A qui est atrophique obligatoirement et d'origine auto-immune alors que la deuxième est de type B qui peut être atrophique ou non et elle est d'origine non auto-immune. Selon les classifications européennes, la gastrite chronique liée à *H.pylori* correspond à la gastrite chronique de type B (Courillon-Mallet et Fléjou, 2005).

La gastrite chronique causée par *H.pylori* est asymptomatique chez la plupart des sujets (70%) (de Korwin et Lehours, 2010). Selon des facteurs liés à la bactérie et les propriétés génétiques de l'hôte, elle peut évoluer vers différentes formes: la pangastrite, la gastrite fundique atrophique, la gastrite antrale. Selon sa localisation, La gastrite chronique va permettre l'induction soit d'un effet positif soit d'un effet négatif sur la sécrétion acide (Mc coll et al., 2000). L'évolution vers la maladie ulcéreuse ou duodénale dépend du degré d'acidité.

2- Ulcère gastroduodénale :

La pathologie ulcéreuse gastroduodénale survient suite à un déséquilibre entre les facteurs d'agression (prise d'anti-inflammatoires, sécrétion d'acide, tabac) et les facteurs de défense et de réparation (mucus) dans la muqueuse gastrique. L'ulcère n'est pas toujours symptomatique. Il est caractérisé par une douleur épigastrique quotidienne qui survient à distance des repas. Parfois il peut même se compliquer d'hémorragie, de sténose ou de perforation (Bouarioua et al., 2007). La maladie ulcéreuse engendre des lésions arrondie profonde recouverte d'une fausse membrane jaunâtre (Bouarioua et al., 2007). La mise en évidence de la lésion est possible grâce au diagnostic en endoscopie digestive haute. *H.pylori* est le principale agent causant les ulcères gastriques et duodénaux (90% des cas) (Pospai et al., 2005). Elle a été détectée chez 90% des sujets ulcéreux (Bouarioua et al., 2007). Mais l'ulcère ne concerne que 10 à 15% des sujets infectés par *H.pylori* (HAS,2010). Il y a d'autres facteurs qui peuvent

favoriser l'apparition de l'ulcère, parmi eux, le stress, la sécrétion acide et le polymorphisme génétique.

3- Cancer gastrique :

Le cancer gastrique est classé cinquième selon sa fréquence et troisième par sa mortalité (Ferlay et al., 2012) . L'agence internationale de recherche sur le cancer a qualifié *H.pylori* d'agent carcinogène de type 1 (IARC 1994). Le risque de développer un cancer chez un sujet infecté par *H.pylori* après 30 ans d'évolution de l'infection est de 1% (Courillon-Mallet, 2009). L'infection à *H.pylori* est la principale cause du Cancer gastrique (80% des cas) (INCa, 2014), mais elle n'est pas le seule responsable vu la présence d'autre facteurs.

4- Lymphome gastrique du MALT:

Une association étroite entre le lymphome gastrique du MALT et la présence de *H.Pylori* existe (Parsonnet et al., 1994). En fait, presque 90% des malades portent la bactérie (Konturek et al., 2000). L'estomac est normalement dépourvu de lymphocytes. Suite à une infection chronique par *H.pylori*, la réaction inflammatoire se traduit par une introduction massive de lymphocytes dans la muqueuse gastrique. Parfois, le tissu lymphoïde s'organise en follicule lymphoïde. Le lymphome est caractérisé par une prolifération monoclonale des lymphocytes qui se trouvent dans la zone marginale des follicules lymphoïde ce qui entraîne une destruction des glandes gastriques et conduit à la formation des lésions épithéliales tumorales (Ruskone- Fourmestaux, 2002).

Les principaux symptômes de ce lymphome sont non spécifiques: fièvre, nausées, fatigue, une perte de poids, anémies et douleurs abdominales. Le traitement consiste à une antibiothérapie. L'éradication de la bactérie permet la rémission dans certains cas (Ruskone-Fourmestaux et al., 2001). Dans le cas des lymphomes présentant un haut degré de malignité, le recours à une chimiothérapie ou à une radiothérapie est obligatoire (Bommelaer et Stef, 2009).

II- MATERIEL ET METHODES

Dans cette étude rétrospective réalisée au sein du laboratoire de Microbiologie et de Biologie moléculaire de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès (FMPF), 200 extraits d'ADN *H.pylori* positifs (identifié par amplification d'une région du gène urec) et pris au hasard, ont été utilisés pour la détermination du génotype de la région c du gène de virulence vacA. Cet ADN a été préalablement extrait à partir de biopsies gastriques obtenues chez des patients souffrants de pathologies gastriques et recrutés au service de gastro-entérologie du centre hospitalier universitaire Hassan II de Fès entre 2009 et 2015. Les données sociodémographiques et cliniques de ces patients, qui ont consenti à participer à une étude sur l'infection à *H.pylori*, ont préalablement été obtenues.

Pour le génotypage de la region C du gène vacA de *H.pylori*, la technique d'amplification génique (PCR) est utilisée.

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique Hospitalo-universitaire de Fès.

A- Réaction de polymérisation en chaîne

1- Principe :

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet une amplification exponentielle in vitro d'une séquence cible de l'ADN à partir de deux amorces oligonucléotidiques complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier sous l'action d'une ADN polymérase thermostable, chaque amorce est allongée dans le sens 5'→3'.

Pour l'amplification des séquences de la région polymorphe c du gène de virulence vacA, deux couples d'amorces ont été utilisés. Le premier couple permet l'amplification d'un fragment correspondant au sous type c1, il délimite une région génomique dont la taille varie entre 600 et 700pb. Cette région s'étend de la position 2206 à la position 2864 du gène vacA (*H.pylori* Genbank accession number : LC420374.1). Le fragment correspondant au sous type c2 a été amplifié par le deuxième couple d'amorce, il s'étend de la position 2228 à la position

2906 du gène *vacA* (*H.pylori* Genbank accession number : GQ331974.1) (Tableau2). Dans chaque réaction PCR, un témoin positif et un témoin négatif sont utilisés.

2- PROTOCOLE :

La PCR a été réalisée dans un volume total de 50 µl contenant :

- 1mmol/l de tampon PCR 10X
- 1,5 mM Mgcl₂
- 2U deTaq polymérase
- 0,2 mM de dNTPs
- 0,5 µM de chacune des amorces(Tableau1)
- 7 µL d'ADN.

Tableau 1 : Conditions de PCR :

	Température °C	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	96	3min	1
Dénaturation	96	40 secondes	35
Hybridation	55	40 secondes	
Extension	72	40 secondes	
Extension finale	72	7 minutes	1

Tableau 2 : Amorces utilisées pour les PCR

Amorces	Séquence (5' à 3')	Taille du produit PCR (pb)	Température d'hybridation (°C)	Position sur le gène vacA Position (Genbank accession number)	Référence
c1-F	ATC ATY SGT TAT GRH AAT GTT TCT	600-700	55	2206---2229 (ID : LC420374.1)	(Bakhti et al., 2016)
R-nd	TTA TGC TCT AAA CTG GCT A			2846---2864 (ID :LC420374.1) Et 2888---2906 (ID : GQ331974.1)	
c2-F	ATT ATA ATT TAG TAG GAG TGC AAG G	600-700	55	2252---2228 (ID : GQ331974.1)	

B- ELECTROPHORESE

1- Principe:

L'analyse des fragments d'ADN en fonction de leur taille est un procédé usuel en biologie moléculaire. Cette méthode repose sur une technique électro phorétique utilisant différents supports. L'électrophorèse est une méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Elle se réalise sur des supports gélatineux, de type acrylamide ou agarose. Dans notre étude l'agarose est utilisé, qui est un polysaccharide extrait d'une algue, la rhodophycée qui permet d'analyser de manière très simple des fragments d'ADN d'une centaine à quelques milliers de nucléotides, obtenus après digestion par des endonucléases de restriction ou amplification par PCR

Préparation du gel d'agarose :

100ml du TBE 1X a été ajouté à 1,5 g d'agarose, puis le mélange a été chauffé dans la micro-onde pour 3 min de sorte que l'agarose soit totalement dissout. Ensuite le gel a été versé dans le moulage et laissé jusqu'à solidification.

Révélation des produits de PCR :

10µl du produit PCR sont additionnés du bleu de Bromophénol et sont déposés dans un puits du gel d'agarose. La migration se fait à 100 volts pendant 50 min. La visualisation des produits se fait sur une plaque UV et leur taille est déduite à l'aide du marqueur de poids moléculaire.

C- Analyse statistique :

L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide du logiciel EPI-INFO (version 3.5.4). Un descriptif de la population étudiée a été effectué. L'analyse uni variée a été réalisée afin de corrélérer les pathologies gastriques aux facteurs étudiés ainsi qu'aux sous types de la région c du vacA. La corrélation entre les facteurs étudiés et le génotype de la région c a été également étudiée. Tous les résultats dont le $p < 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs.

III- RESULTATS

1- Population étudiée :

Lors de cette étude rétrospective, un total de 200 ADN *H. pylori* positive extraits de biopsies gastriques ont été utilisés. Les patients chez qui ces biopsies ont été obtenues sont âgés entre 18 et 85 ans avec une moyenne d'âge de 48,6 ans (écart-type 15,95 ans). Presque la moitié (48,5%(97/200)) d'entre eux sont de sexe masculin et 51,5% (103/200) de sexe féminin. Dans cette série, le pourcentage de patients ayant déclaré une consommation d'alcool est de 10,5% (21/200), alors que 30,5% (61/200) sont tabagique (active ou passive). Environ les deux tiers des patients (n = 134/200, 67%) provenaient des zones urbaines et 51,5% (n=103/200) ont un niveau socio-économique défavorable. La pathologie gastrique diagnostiquée chez la plupart des patients est la gastrite à 69% (139/200), suivie de l'ulcère à 20,5% (41/200) puis du CG à 10% (20/200). Les informations sociodémographiques ainsi que le diagnostic des patients sont présentés sur le Tableau3.

Tableau3 : Descriptif de la population étudiée

Variant		n(%)
Age	<40 ans	58/200 (29%)
	>40 ans	142/200 (71%)
Sexe	Homme	97/200 (48,5%)
	Femme	103/200 (51,5%)
Tabagisme	Oui	61/200 (30,5%)
	Non	139/200 (69,5%)
Consommation d'Alcool	Oui	21/200 (10,5%)
	Non	179/200 (89,5%)
Milieu	Rurale	66/200 (33%)
	Urbain	134/200 (67%)
Niveau socio-éco	Favorable	25/200 (12,5%)
	Moyen	72/200 (36%)
	Défavorable	103/200 (51,5%)
Diagnostic	Cancer gastrique	20/200 (10%)
	Ulçère	41/200 (20,5%)
	Gastrite	139/200 (69%)

2-Génotypage de la région c du gène *vacA* de *H.pylori*

La détermination du statut de la région c du gène *vacA* de *H.pylori* a été réalisée sur les 200 échantillons. La présence du gène se traduit par l'amplification d'une région d'une taille variant entre 600 et 700 pb en utilisant un des deux couples d'amorces (Figure 5). Au total, une amplification a été obtenue dans 167 cas alors qu'aucune amplification n'a été obtenue avec les 33 cas restant.

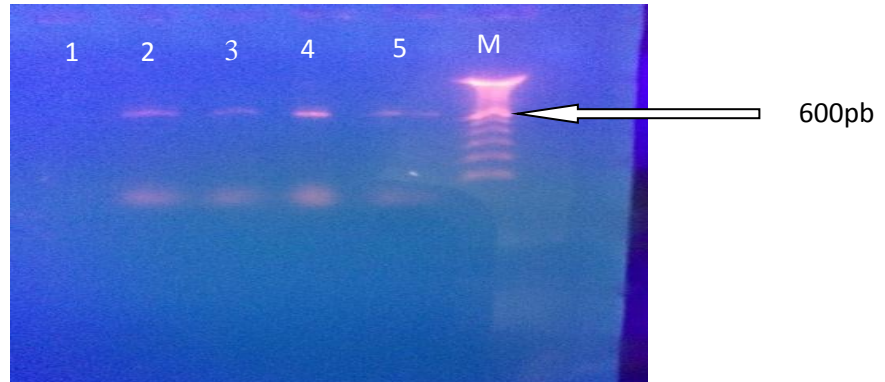


Figure 4 : Image d'un gel d'agarose à 1,5% montrant les produits d'amplification obtenus par les couples d'amorces c1-F/R-nd et c2-F/R-nd

1: Témoin négatif

2 : Témoin positif

3 et 5: Produits d'amplification par le couple d'amorces c1-F/R-nd et correspondant à VacA c1

4 : Produit d'amplification par le couple c2-F/R-nd et correspondant à vacA c2

M : Marqueur DNA Ladder 100 pb

En fait, une bande d'une taille d'environ 600 a été obtenue avec le couple d'amorces c2-F/R-nd dans 100 cas. Cette bande correspond au génotype C2. Alors qu'une bande d'une taille d'environ 600 a été obtenue avec le couple d'amorces c1-F/R-nd dans 38 cas correspondant à C1. Une infection simple a été obtenue dans 138 des cas, alors que la présence des deux génotypes a été notée dans 29 des cas.

Le typage moléculaire a montré que le génotype *vacA c2* (absence de délétion) est le plus prédominant avec un pourcentage qui atteint 50% (100/200), alors que le sous type *c1*, la double infection *c1-c2* et les extraits d'ADN non génotypés ont respectivement les pourcentages 19%, 14,5% et 16,5% (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Fréquences de différents allèles de la région *c* du gène *vacA* de *H.pylori*:

Gène	Type de l'allèle	n (%)
<i>vacA c</i>	<i>c1</i>	38/200 (19%)
	<i>c1-c2</i>	29/200 (14,5%)
	<i>c2</i>	100/200 (50%)
	Non génotypé	33/200 (16,5%)

3- Corrélation des facteurs étudiés aux pathologies gastriques :

Les pathologies gastriques ont été corrélées à l'âge, le sexe, le milieu de vie, le niveau socio-économique, le tabagisme et la consommation d'alcool. Les résultats ont montré que tous les types de pathologies étaient prédominants chez les patients âgés de plus de 40 ans ($p > 0,05$). Une association statistiquement significative a été établie entre le sexe et les pathologies ($p=0,0031$). En fait, une prédominance d'ulcère a été notée chez les participants de sexe masculin (70,7% contre 29,3% chez les femmes). La même tendance a été observée dans le cancer gastrique. Par contre, la gastrite prédominait chez les femmes avec un pourcentage de 55%. La consommation d'alcool présentait une association significative avec les pathologies gastriques. Cependant, aucune association n'a été observée entre le tabagisme, le milieu et le niveau socio-économique avec les pathologies (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Facteurs étudiés et pathologies gastriques.

Variable		Cancer gastrique (n=20)	Ulcère (n=41)	Gastrite (n=139)
Age	<40 ans	5/20(25%)	14/41 (34,1%)	39/139 (28,1%)
	>40 ans	15/20(75%)	27/41 (65,9%)	100/139 (71,9%)
	Valeur p	0,68		
Sexe	Homme	11/20(55%)	29/41 (70,7%)	57/139 (41%)
	Femme	9/20(45%)	12/41 (29,3%)	82/139 (59%)
	p	0,0031		
Tabagisme	Oui	4/20(20%)	18/41 (43,9%)	38/138 (27,5%)
	Non	16/20(80%)	23/41 (56,1%)	100/138 (72,5%)
	p	0,07		
Alcool	Oui	5/20(25%)	7/41 (17,1%)	9/138 (6,5%)
	Non	15/20(75%)	34/41(82,9%)	129/138 (93,5%)
	p	0,01		
Milieu	Rurale	9/20(45%)	17/41 (41,5%)	40/139 (28,8%)
	Urbain	11/20(55%)	24/41(58,5%)	99/139 (71,2%)
	p	0,15		
Niveau socio- éco	Favorable	1/20(5%)	3/41 (7,3%)	21/139 (15,1%)
	Moyen	6/20(30%)	14/41 (34,1%)	52/139 (37,4%)
	Défavorable	13/20(65%)	24/41 (58,5%)	66/139 (47,5%)
	p	0,35		

4- Corrélation des sous types de la région c du vacA aux pathologies gastriques :

La corrélation des deux types de la région c du gène vacA aux pathologies gastriques a été étudiée. Lors de l'analyse statistique, les cas de double infection ainsi que les extraits non génotypés n'ont pas été pris en compte. Les résultats de l'analyse ont montré une

prédominance du génotype c1 (54,5%) contre 45,5% pour le génotype c2 dans le cas du cancer gastrique. Le sous type c2 a été détecté chez 80% des patients souffrant de l'ulcère gastroduodénale. Ces résultats restent statistiquement non significatifs ($p>0,05$) (Tableau 6).

Tableau 6 : Corrélation des sous types aux pathologies gastriques :

Variable	Cancer gastrique	Ulcère	Gastrite	Valeur p
c1	6/11 (54,5%)	6/30 (20%)	27/98 (27,7%)	0,09
c2	5/11 (45,5%)	24/30 (80%)	71/98 (72,4%)	
Total	11 (100%)	30 (100%)	98 (100%)	

5- Corrélation des sous types de la région c du vacA aux facteurs étudiés :

La corrélation de différents facteurs étudiés aux sous types de la région c du gène vacA a été effectuée. Une prédominance du génotype c2 est notée chez les sujets âgés de plus de 40 ans avec une valeur de p proche de la significativité. Aucun des résultats n'a été statistiquement significatif (**Tableau 7**)

Tableau 7 : Corrélacion des sous types de la région c du vacA aux facteurs étudiés

Variable		c1	c2
Age	<40 ans	18/39 (46,2%)	24/100 (24%)
	>40 ans	21/39 (53,8%)	76/100 (76%)
	Valeur p	0,06	
Sexe	Homme	18/39 (46,2%)	48/100 (48%)
	Femme	21/39 (53,8%)	52/100 (52%)
	Valeur p	0,42	
Tabagisme	Oui	11/39 (28,2%)	34/100 (34%)
	Non	28/39 (71,8%)	66/100 (66%)
	Valeur p	0,26	
Alcool	Oui	3/39 (7,7%)	11/100 (11%)
	Non	36/39 (92,3%)	89/100 (89%)
	Valeur p	0,29	
Milieu	Rurale	13/39(33,3%)	34/100(34%)
	Urbain	26/39(66,7%)	66/100(66%)
	Valeur p	0,47	
Niveau socio-éco	Favorable	4/39 (10,3%)	11/100 (11%)
	Moyen	14/39 (35,9%)	33/100 (33%)
	Défavorable	21/39 (53,8%)	56/100 (56%)
	Valeur p	0,94	

DISCUSSION :

H. pylori induit une gastrite chronique chez tous les patients infectés. Cette gastrite peut évoluer vers des pathologies gastriques plus sévères, notamment l'ulcère peptique, et le cancer gastrique (IARC ,1994). La progression de la maladie dépend des génotypes bactériens, de l'hôte et des facteurs environnementaux. Certaines études ont rapporté une corrélation significative entre les génotypes de *H.pylori* et les différentes pathologies gastriques (Nogueira et al., 2001 ; Soltermann et al., 2007) ainsi qu'une variabilité de la distribution des génotypes selon les zones géographiques (Khedmatet al., 2012). Parmi les facteurs de virulence qui présentent une association avec les pathologies le *cagA* et la *vacA* sont les plus caractérisés. Pour le *vacA*, nombreuses sont les études qui portent sur la corrélation des génotypes des régions m, s, i et d aux différentes pathologies gastriques mais pour la région c, uniquement deux études en Iran et une au Bangladesh ont été menées.

Au Maroc, le génotypage de *H.pylori* circulant dans la région de Fès a été réalisé sur une large série et les régions *vacA* s, m et i ont été caractérisées (Alaoui et al., 2013). Cependant, le profil de la région C du *vacA*, qui a montré une forte association avec le cancer gastrique en Iran, reste indéterminée (Bakhti et al., 2016). Ainsi, dans la présente étude, 200 extraits d'ADN obtenus de biopsies appartenant aux patients souffrant de différentes pathologies gastriques ont été analysés par PCR afin de génotyper la région c du gène de virulence *vacA* de *H.pylori*. Après le typage moléculaire, la relation entre les génotypes et les différentes pathologies gastriques a été étudiée.

Les patients dont les prélèvements ont été utilisés dans cette étude présentaient une des pathologies gastriques suivantes: gastrite, ulcère ou cancer gastrique

La corrélation des différentes variables (âge, sexe, niveau socioéconomique, tabagisme et consommation d'alcool...) aux pathologies gastriques a montré que la prévalence de ces pathologies est plus élevée chez les patients âgés de plus de 40 ans. Ceci est en accord avec les résultats obtenus dans d'autres études (Freddy ,1991; Alaoui et al., 2013). En fait, l'infection par *H.pylori* survient essentiellement pendant l'enfance (Granstrom et al.,1997) et l'évolution de l'infection vers les autres pathologies sévères se fait en quelques années si la bactérie n'est pas éradiquée. Ceci explique en partie la prévalence de ces pathologies chez les patients ayant un âge avancé.

Une prédominance d'ulcère a été notée chez les participants de sexe masculin (70,7% contre 29,3% chez les femmes). Ce taux est comparable à celui obtenu en Iran (80,3%) chez les hommes (Bakhti et al., 2016). De même, la prévalence du cancer gastrique est plus importante chez les hommes que chez les femmes (55% contre 44,5% chez les femmes), la même prévalence est obtenue en Iran mais avec un taux beaucoup plus élevé que celui obtenu dans notre série (88% contre 12% chez les femmes) (Bakhti et al., 2016).

Même si le tabac est un facteur augmentant le risque de développement de l'ulcère duodéal (koivisto et al, 2008) et la progression des lésions néoplasique et l'évolution vers le cancer gastrique (Camargo et al., 2007; koivisto et al., 2008), dans cette série, aucune association significative n'a été notée entre le tabagisme et les pathologies gastriques sévères. Ceci peut être expliqué par la petite taille de l'échantillonnage ou par la présence d'autres facteurs environnementaux ou nutritionnels.

De même, aucune association n'a été notée entre la consommation d'alcool et les différentes pathologies gastriques. Ceci confirme les résultats de plusieurs autres études (Stevens et al., 2010 ; HAS., 2010).

Les résultats du typage moléculaire de la région c du vac A ont montré que le génotype c2 est le plus fréquent avec un pourcentage de 50% (100/200) suivie de c1 qui représente 19% de tous les échantillons. Les taux déterminés sont comparable à ceux obtenus dans d'autres études notamment ceux en Iran où le sous type c2 prédominait sur c1 (63,8% pour c2 contre 28,6 pour c1) (Bakhti et al., 2016). Cependant, ils sont différents de ceux obtenus au Bangladesh, où une prédominance du génotype c1 avec un pourcentage de 53,6% (Aftab et al., 2017) a été notée. Ce résultat confirme la différence de distribution des génotypes *H.pylori* suivant les régions géographiques. Sur le total des prélèvements analysés, 16,5% d'extraits d'ADN n'ont pas pu être génotypés. Ce taux reste supérieur à celui obtenu en Iran (0,9%) (Bakhti et al., 2016). Ceci peut être dû à des mutations au niveau de la région cible et confirme la grande variabilité génétique de *H.pylori*. Cependant, 29 des 200 (14,5%) échantillons ont présenté les deux génotypes c1 et c2 à la fois, ce qui est plus ou moins comparable aux résultats obtenus en Iran (6,6%) (Bakhti et al., 2016). Ces extraits correspondent aux biopsies des patients qui présentent une double infection par au moins deux souches de *H.pylori* dont une présente le génotype c1 et l'autre c2. L'étude menée en Bangladesh n'a mentionné aucune double infection (Aftab et al., 2017) .

Les études effectuées sur la région c du vacA ont montré que le génotype c1 est fréquemment détecté chez les souches ayant les génotypes s1m1 qui sont les plus répandus et les plus virulents du monde (Paniagua et al., 2009 ; Kusters et al, 2006; Roesler et al., 2014 ; Aftab et

al., 2017) , alors que le génotype c2 est associé au moins virulentes s2m2(Bakhti et al.,2016 ; Bakhti et al.,2017).Au Maroc, les études réalisées dans la région de Fès, ont montré une prédominance des génotypes vacA s2m2 (Samia et al., 2013 ; El khadir et al., 2016). L'association du génotype c2 aux souches s2m2 (Bakhti et al.,2016 ; Bakhti et al.,2017).et l'abondance de ces souches vacA s2m2 au Maroc peut expliquer la fréquence élevée du génotype c2 trouvée dans notre étude. Une corrélation entre différents génotypes du vacA (s,m et c) doit être réalisée pour confirmer cette hypothèse .

Pour étudier les différentes associations « génotypes-pathologies », les cas non typés et les cas présentant une infection multiple ont été éliminés de l'analyse statistique. La double infection présente les deux génotypes c1 et c2 ce qui ne nous permet pas de conclure à quel génotype les maladies pourront être associées. L'analyse de la corrélation des sous type de la région c du vacA aux pathologies gastriques a montré que la fréquence du vacA c1 chez les patients atteints du cancer gastrique (54%) était supérieur à ceux atteints d'ulcère (20%) et de gastrite (27,7%). La fréquence du vacA c1 chez les patient souffrants du cancer gastrique en Iran atteint 80% ce qui présente une forte association entre ce génotype et la pathologie citée (Bakhti et al., 2016). Même si le résultat obtenu dans notre étude n'est statistiquement pas significatif ($p=0,09$), il pourra confirmer le résultat obtenu en Iran ou le génotype c1 est significativement associé au cancer gastrique (Bakhti et al., 2016; Bakhti et al., 2017). L'étude d'une série plus large et nécessaire à effectuer.

Conclusion :

Cette étude rétrospective préliminaire est la première étude réalisée en Afrique et parmi les rares à l'échelle internationale visant à caractériser la région c du gène *vacA* de *H.pylori* et à étudier la corrélation de ses génotypes aux pathologies gastriques. Il en sort que les souches circulant dans la région de Fès sont majoritairement porteuses de l'allèle *vacA* c2. D'autre part, l'analyse de la corrélation entre les différents génotypes aux maladies gastriques a montré une prédominance de *vacA* c1 dans les cas de cancer gastrique. Ce résultat doit être confirmé par l'étude d'une large série.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aftab H, Miftahussurur M, Subsomwong P, Ahmed F, Khan AKA, Matsumoto T, Suzuki R, Yamaoka Y. Two populations of less-virulent *Helicobacter pylori* genotypes in Bangladesh. 2017 ; 12(8):e0182947.

Al Sayed A, Anand PS, Kamath KP, Patil S, Preethanath RS, Anil S. An oral cavity as an extragastric reservoir of *Helicobacter pylori*. ISRN Gastroenterol 2014, 261369.

Atapoor S, Safarpour Dehkordi F, Rahimi E. Detection of *Helicobacter pylori* in various types of vegetables and salads. Jundishapur J Microbiol 2014; 7(5): e10013.

Azevedo NF, Huntington J, Goodman KJ. The epidemiology of *Helicobacter pylori* and public health implications. Helicobacter. 2009; 15(1):78.

Bakhti SZ, Latifi-Navid S, Mohammadi S, Zahri S, Bakhti FS, Feizi F, Yazdanbod A, Siavoshi F. Relevance of *Helicobacter pylori* vacA 3'-end Region Polymorphism to Gastric Cancer 2016 ; 21(4):305-16.

Bakhti SZ, Latifi-Navid S, Zahri S, Bakhti FS, Hajavi N, Yazdanbod A. Are *Helicobacter pylori* highly cytotoxic genotypes and cardia gastric adenocarcinoma linked? Lessons from Iran 2017 ; 21(1):235-246.

Basiri Z, Safaralizadeh R, Bonyadi MJ, Somi MH, Mahdavi M, Latifi-Navid S. *Helicobacter pylori* vacA d1 genotype predicts risk of gastric adenocarcinoma and peptic ulcer in northwestern Iran 2014 ; 15(4):1575-9.

Bellack NR, Koehoorn MW, MacNab YC, Morshed MG. A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. Epidemiol Infect. 2006; 134:439-449. 106.

Bommelaer G, Stef A. Ulcère gastroduodénal : avant et après *Helicobacter pylori*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). Gastroenterol Clin Biol. 2009; 33(8-9):626-634.

Bouarioua N, Merrouche M, Pospai D, Mignon M. Physiopathologie de la maladie ulcéreuse gastroduodénale à l'ère d'*Helicobacter pylori*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). Gastroenterol 2007 ; 9-020-A-10.

Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev.* 2000; 22(2):283-97.

Camargo MC, Piazuolo MB, Mera RM, Fonham ET, Delgado AG, Yopez MC, Ceron C, Bravo LE, Bravo JC, Correa P. Effect of smoking on failure of *Helicobacter pylori* therapy and gastric histology in a high gastric cancer risk area of Colombia. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2007; 37(4):238-245.

Chung C, Olivares A, Torres E, Yilmaz O, Cohen H, Perez-Perez G. Diversity of vacA intermediate region among *Helicobacter pylori* strains from several regions of the world. 2010; 48(3):690-6.

Contreras M, Labigne A. Quels sont les facteurs de virulence de *Helicobacter pylori*? *Gastroenterol Clin Biol.* 2003; 27:401-408.

Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet.* 1975 ; 2(7924):58-60.

Correa P, Piazuolo MB. The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis.* 2012 ; 13(1) :2-9.
Courillon-Mallet A, Fléjou JF. Gastrites et gastropathies. In: Rambaud JC, ed. *Traité de gastro-entérologie.* Paris : Flammarion 2005. p. 310-324.

Courillon-Mallet A. *Helicobacter pylori* et cancer gastrique : qui « prévenir » ? *Gastroenterol Clin Biol.* 2009; 33(4):301-305. 108.

Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterol.* 2009; 136(6):1863-1873.

De Korwin JD, Lehours P. *Helicobacter pylori* : notions fondamentales, épidémiologie, 60.
deKorwin JD. Nouvelles recommandations pour le diagnostic et le traitement de l'infection à *Helicobacter pylori*. *Presse Med.* 2010; 1968(10)50083.

De Reuse H, Bereswill S. Ten years after the first *Helicobacter pylori* genome: comparative and functional genomics provide new insights in the variability and adaptability of a persistent pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007 ; 50(2) :165-76.

Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*. 1991; 59(7):2470-5.

El Khadir M, Alaoui Boukhris S, Benajah DA, El Rhazi K, , El Abkari M, Harmouch T, Nejjari C, Mahmoud M, Benlemlih M, Bennani B Detection of *Helicobacter pylori* urease antigen in saliva in patients with different gastric H. pylori status 2016 ; 79(7):363-7.

Fernández-Tilapa G, Axinecuilteco-Hilera J, Giono-Cerezo S, Martínez-Carrillo DN, Illades-Aguiar B, Román-Román A. *vacA* genotypes in oral cavity and *Helicobacter pylori* seropositivity among adults without dyspepsia. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16:e175–e180.

Flahou B, Ducatelle R, Smet A, Linden S, Skoog E, Pasmans F. La pathogénie chez l'Homme de l'infection à *Helicobacter suis* et *Helicobacter heilmannii*, deux bactéries d'origine animale. 2014 ; 302(6788) :1302-1305.

Fox JG. Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*. 1995. 9(Suppl 2):93-103.

Freddy Sitas. Twenty five years since the first prospective study by Forman et al. on *Helicobacter pylori* and stomach cancer risk (1991). *Cancer Epidemiol* 2016;41:159—64.

Garner JA, Cover TL. Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect Immun*. 1996 Oct;64(10):4197–4203.

Gião MS, Azevedo NF, Wilks SA, Vieira MJ, Keevil CW. Persistence of *Helicobacter pylori* in Heterotrophic Drinking-Water Biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2008 ; 74(19):5898-904.

Goodwin C, Armstrong J, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES. Transfer of *Campylobacter pyloridis* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov, respectively. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39:397-405.

Granström M, Tindberg Y, Blennow M. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. *J Clin Microbiol*. 1997.

Gressmann H, Linz B, Ghai R, Pleiness KP, Schlapbach R, Yamaoka Y, Kraft C, Suerbaum S, Meyer TF, Achtman M. Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. PLoS Genet. 2005; 1(4):e43.

Ha N, Oh S, Sung JY, Cha KA, Lee M, Oh B. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. Nature Structure Biol. 2001;8(6):505–509.

Hafeza Aftab, Muhammad Miftahussurur, Phawinee Subsomwong, Faruque Ahmed, A. K. Azad Khan, Takashi Matsumoto, Rumiko Suzuk, Yoshio Yamaoka. Two populations of less-virulent *Helicobacter pylori* genotypes in Bangladesh 2017; 12(8): e0182947.

Hazell SL, Lee A, Brady L, Hennessy W. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. J Infect Dis 1986; 153:658-63.

IARC , Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. liver flukes and *Helicobacter pylori*. schistosomes Lyon, France 1994 ; 61:1-241.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Helicobacter pylori*. In : Shistosomes, liver flukes, and *Helicobacter pylori*. Lyon : IARC 1994;177-240.

Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET et al. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. Science 1998;279:373-7.

INCa 2014. Les facteurs de risque de cancer de l'estomac. <http://www.e-cancer.fr/cancerinfo/les-cancers/cancer-de-lestomac/facteurs-de-risques> anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. Lancet 2002 ; 359(9300):14.

Khalifa MM, Sharaf RR, Aziz RK. *Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen? Gut Pathogens. 2010.

Khedmat H, Karami A, Safiri Z, Amini M, Bakhtiari A. *Helicobacter pylori* genotypes can predict gastric tissue histopathology: a longitudinal study of Iranian patients. J Infect Public Health 2012 ; 5(2): 153-158.

Koivisto TT, Voutilainen ME, Färkkilä MA. Effect of smoking on gastric histology in *Helicobacter pylori*-positive gastritis. Scand J Gastroenterol. 2008; 43(10):1177-83.

Konturek SJ, PC de Konturek, Hartwich BA, Hahn EG. Infection à *Helicobacter pylori* et expression de la gastrine et de la cyclooxygénase dans les malignités gastriques et colorectales. Reg. Peptides 2000 ; 93: 13-19.

Kwok T, Zabler D, Urman S, Rohde M, Hartig R, Wessler S, et al. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. Nature. 2007;449:862–866

Kwok T, Zabler D, Urman S, Rohde M, Hartig R, Wessler S, Misselwitz R, Berger J, Sewald N, König W, Backert S. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. 2007 ; 449(7164):862-6.

Labigne A. Pouvoir pathogène de *Helicobacter pylori* Paris: Elsevier 1996. 119-139.

Lamarque D, Tran Van Nhieu J, Bréban M. Quelles sont les modifications gastriques induites par l'infection aiguë et chronique par *Helicobacter pylori*? EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). Gastroenterol Clin Biol 2003 ; 391-400.

Leung WK, Siu KL, Kwok CK, Chan SY, Sung R, Sung JJ. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. Am J Gastroenterol 1999; 94(10):2881-4.

linked? Lessons from Iran. Cancer Biomark. 2017 ;21(1) :235-246.

Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active gastritis. Lancet 1984; 1:1311-1315.

Mc Coll KE, El-Omar E, Gillen D. *Helicobacter pylori* gastritis and gastric physiology. Gastroenterol Clin North Am. 2000; 29(3):687-703.

McGee DJ, May CA, Garner RM, Himpsl JM, Mobley HL. Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. J Bacteriol 1999;181:2477-84.

Mégraud F, Bonnet F, Garnier M, Lamouliatte H. Characterization of *Campylobacter pyloridis* by culture, enzymatic profile, and protein content. J Clin Microbiol 1985; 22(6): 1007–1010.

Mégraud F. Détection de *Helicobacter pylori* et sa sensibilité aux antibiotiques. Gastroenterol Clin Biol 2007; p. 791.

Mégraud F. When and how does *Helicobacter pylori* infection occur? Gastroenterol Clin Biol. 2003; 27(3 Pt 2):374-9.

- Mobley HLT, Cortesia MJ, Rosenthal LE, Jones BD. Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol. 1988 ; 26(5) : 831–836.
- Mobley HLT. Urease. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press; Washington D.C: 2001 ; Chapter 16.
- Nogueira, T., M. de Smit, M. Graffe, M. Springer. The relationship between translational control and mRNA degradation for the Escherichia coli threonyl-tRNA synthetase gene. J.Mol.Biol 2001. 310:709-722
- Nurgalieva ZZ, Malaty HM, Graham DY, Almuchambetova R, Machmudova A, Kapsultanova D, Osato MS, Hollinger FB, Zhangabylov A. *Helicobacter pylori* infection in Kazakhstan: effect of water source and household hygiene. Am J Trop Med Hyg 2002; 67(2):201-6.
- Odenbreit S, Till M, Hofreuter D, Faller G, Haas R. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. Mol Microbiol 1999;31:1537-48.
- Paniagua GL, Monroy E, Rodríguez R, Arroniz S, Rodríguez C, Cortés JL, Camacho A, Negrete E, Vaca S, Frequency of vacA, cagA and babA2 virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis 2009; 30;8:14.
- Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelmann JH, Friedman GD. Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. N Engl J Med. 1994; 330:1267-1271.
- Perez-Perez GI, Olivares AZ, Cover TL, Blaser MJ. Characteristics of *Helicobacter pylori* variants selected for urease deficiency. Infect Immun. 1992;60:3658–3663.
- Pesci EC, Pickett CL. Genetic organization and enzymatic activity of a superoxide dismutase from the microaerophilic human pathogen, *Helicobacter pylori*. Gene 1994;143:111-6.
- Peters C, Schablon A, Harling M, Wohlert C, Torres Costa J, Nienhaus A. The occupational risk of *Helicobacter pylori* infection among gastroenterologists and their assistants. 2011; 11: 154.

- Piazuelo MB, Epplein M, Correa P. Gastric cancer: an infectious disease. *Infect Dis Clin North Am.* 2010; 24(4):853-869.
- Polk DB et Peek RM. *Helicobacter pylori* : gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer* 2010 ; 10(6) :403-414.
- Popsai D, Sobhani I, Mignon M. Maladie ulcéreuse duodénale et gastrique non compliquée. In: Rambaud JC, ed. *Traité de gastro-entérologie.* Paris: Flammarion; 2005. p. 329-346.
- Roesler BM, Rabelo-Gonçalves EMA, Zeitune JMR. Virulence Factors of *Helicobacter pylori*: A Review. *Clin Med Insights Gastroenterol* 2014; 7:9-17.
- Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle PR, Stremmel W. Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol* 1998; 36:944–948.
- Ruskone-Fourmestreaux A. Lymphome gastrique du malt : quoi de neuf? FMC-HGE post U 2002 <http://www.fmcgastro.org/postu-main/archives/postu-2002-nantes/lymphome-gastrique-dumalt-quoi-de-neuf/> Salih BA ; 6 : 355-362.
- Samia Alaoui Boukhris, Afaf Amarti, Karima El Rhazi, Mounia El Khadir, Dafr-Allah Benajah, Sidi Adil Ibrahim, Chakib Nejjari, Mustapha Mahmoud, Abdellah Souleimani, Bahia Bennani. *Helicobacter pylori* Genotypes Associated with Gastric Histo-Pathological Damages in a Moroccan Population 2013; 8(12): e82646.
- Samuel L. Palframan, Terry Kwok , Kipros Gabriel. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis 2012 ; 2 : 92.
- Schreiber S, Bücker R, Groll C, Azevedo-Vethacke M, Garten D, Scheid P, Friedrich S, Gatermann S, Josenhans C, Suerbaum S. Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen in vivo. *Infect Immun.* 2005; 73:1584-1589.
- Schwarz S, Morelli G, Kusecek B, Manica A, Balloux F, Owen RJ, Graham DY, van der Merwe S, Achtman M, Suerbaum S. Horizontal versus Familial Transmission of *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog.* 2008; 4(10): e1000180.

Sobhani I, Pospai D, Mignon M, Fléjou JF. *Helicobacter pylori* : épidémiologie, mécanismes d'altération de la muqueuse gastrique et diagnostic bactériologique. In: Rambaud JC, ed. Traité de gastro-entérologie. Paris: Flammarion 2005. p. 301-306. 123.

Solnick JV, Schauer DB. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. Clin Microbiol Rev 2001 ; 14(1) :59-97.

Soltermann A, Koetzer S, Eigenmann F, Komminoth P. Correlation of *Helicobacter pylori* virulence genotypes *vacA* and *cagA* with histological parameters of gastritis and patient's age. Mod Pathol 2007 ; 20(8): 878-883.

Stephan Miehle, Christian Kirsch, Karin Agha-Amiri, Thomas Günther, Norbert Lehn, Peter Malfertheiner, Manfred Stolte, Gerhard Ehninger, Ekkehard Bayerdörffer. The *Helicobacter pylori vacA s1, m1* genotype and *cagA* is associated with gastric carcinoma in Germany 2000; 532-536.

Styer CM, Hansen LM, Cooke CL, Gundersen AM, Sook Choi S, Berg DE, Benghezal M, Marshall BJ, Peek Jr RM, Borén T, Solnick JV. Expression of the BabA Adhesin during Experimental Infection with *Helicobacter pylori*. Infect Immun 2010 ; 78(4):1593-1600.

Tegtmeier N, Wessler S, Backert S. Role of the *cag*-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. FEBS J. 2011; 278(8):1190-1202.

Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1997;388:539-47.

Tran Thi Huyen Trang, Tran Thanh Binh and Yoshio Yamaoka. Relationship between *vacA* Types and Development of Gastrointestinal Diseases 2016 ; 8(6), 182.

World Gastroenterology Organization. *Helicobacter pylori* dans les pays en voie de développement. WGO Practices Guidelines. 2010.

Vale FF, Vitor JM. Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: does food play a role in rural and urban areas? Int J Food Microbiol 2010; 138(1-2):1-12.

vanDoorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Pena S, Midolo P, Ng EK, Atherton JC, Blaser MJ, Quint WG. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. J Clin Microbiol. 1998; 36(9):2597-603.

Vincent P, Gottrand F, Pernes P, Husson MO, Lecomte-Houcke M, Turck D, Leclerc H. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in cohabiting children. Epidemiology of a cluster with special emphasis on molecular typing. Gut. 1994; 35(3):313-6.

Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. Science. 2000; 287:482-485.

Wroblewski LE, Peek, Jr. RM, Keith WT. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. Clin Microbiol Rev 2010; 23(4):713-39.

Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-related Gastrointestinal Diseases from Molecular Epidemiological Studies. Gastroenterol Res Pract. 2012; 2012:371503.

Zeinab Basiri, Reza Safaralizadeh, Morteza Jabbarpour Bonyadi, Mohammad Hossein Somi, Majid Mahdavi, Saeid Latifi-Navid. *Helicobacter pylori* vacA d1 Genotype Predicts Risk of Gastric Adenocarcinoma and Peptic Ulcers in Northwestern Iran 2014 ; 15(4):1575-15