

# ***Helicobacter pylori* en Tunisie: épidémiologie, sensibilité aux antibiotiques et facteurs de virulence**

**BEN MANSOUR KHANSA**

**(Thèse de doctorat en Biologie, soutenu  
le 21 Juin 2012)**

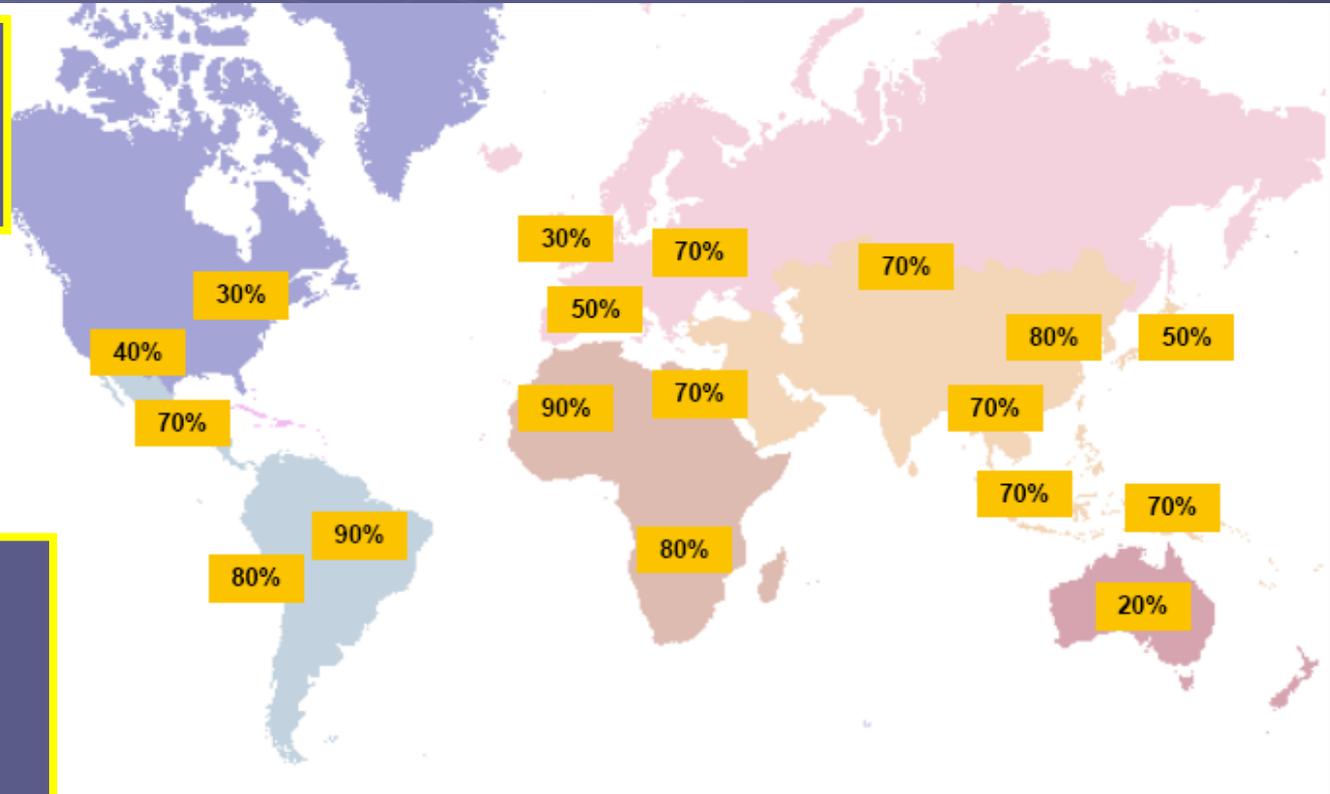
**Laboratoire de Microbiologie – Unité UR 04SP08**

**CHU la Rabta - Tunis**

# Epidémiologie

- 50 % de la population mondiale est infectée
- Grande variation de la prévalence selon les pays

Transmission oro-orale la plus probable



Transmission intrafamiliale (mère enfant surtout)

([www.helico.com](http://www.helico.com)); (Mégraud, 1989)

- Infection acquise dans l'enfance
- Pas de différence selon le sexe

# Epidémiologie

## En Tunisie

- **Etudes: 1991 chez l'adulte**

- 56 % chez les sujets asymptomatiques
- 62 % chez les malades dyspeptiques non ulcéreux
- 77- 98 % chez les ulcéreux duodénaux

*(Ben Ammar et al 2002)*

- **Etudes: 1990-1999 chez l'enfant (2-15 ans)**

- 30 à 33% chez l'enfant asymptomatique
- 57% chez les symptomatiques

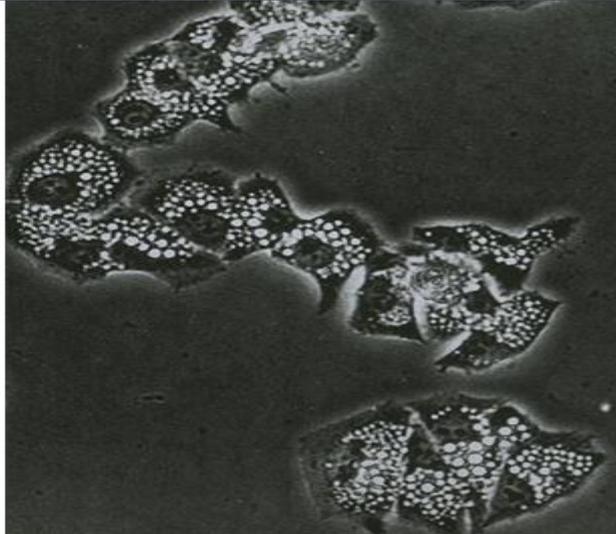
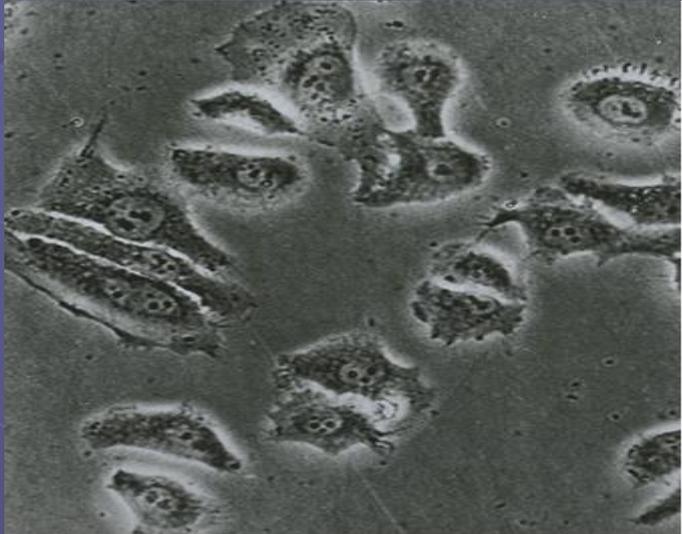
*(Maherzi et al 1993, ; Fendri et al, 1999)* 3

# Facteurs de virulence

## \* Facteurs de toxicité/inflammation tissulaire

- ♣ Cytotoxine vacuolisante VacA (vacuolizing cytotoxin A)/gène *vacA*
- Présente /toutes les souches de *H.pylori* (50%: cytotoxine active)
- Rôle +++ dans l'induction des lésions gastriques

Cellules normales



Effet de VacA sur les  
cellules HeLa

(formation de vacuoles)

## **VacA = Gène (mosaïque)**

Plusieurs génotypes: *m1 s1*, *m2 s2*, *m1 s1 a*....

***m1 s1***: souche la plus toxigène / pathologies sévères

***m2 s2***: pas de production de toxine/toxine inactive (gastrite)

(Atherton et al, 1995)

# Facteurs de virulence

## Antigène CagA (Cytotoxin associated gene)

### Ilot de pathogénicité cag

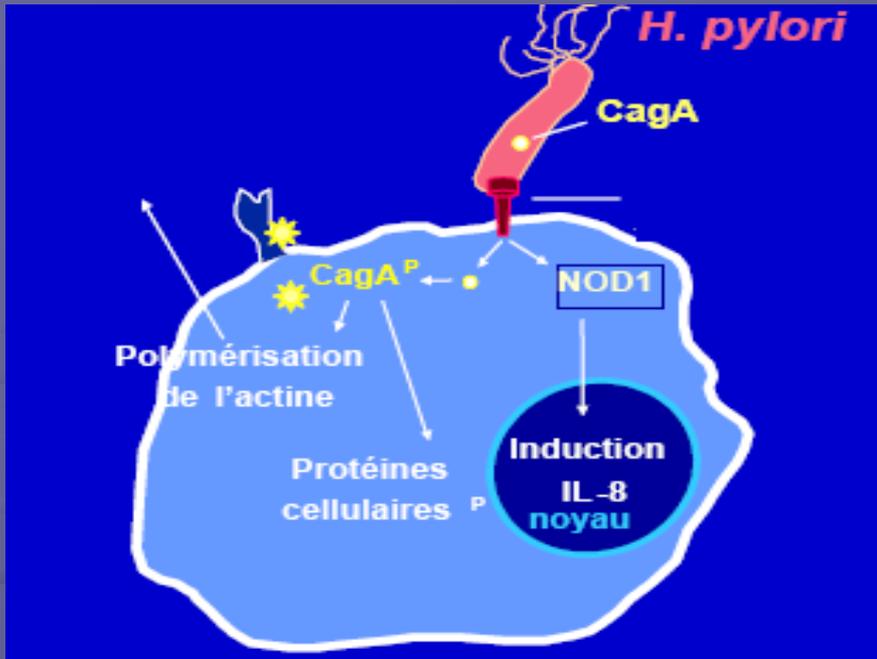
- Le gène Cag / n'est pas présent / toutes les souches
- CagA: un facteur de risque reconnu pour l'UG et UD

→ marqueur prédictif de l'évolution clinique péjorative

- L'îlot cag/ la synthèse de cytokines (l'IL8)

→ pouvoir pro- inflammatoire/MG

*(Nomura et al, 2002)*

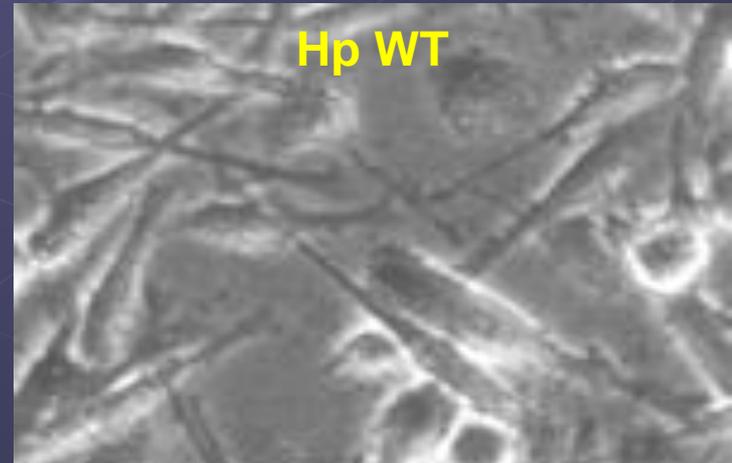


Phosphorylation ++



Changement morphologique

Phénotype « colibri »/cellules gastriques



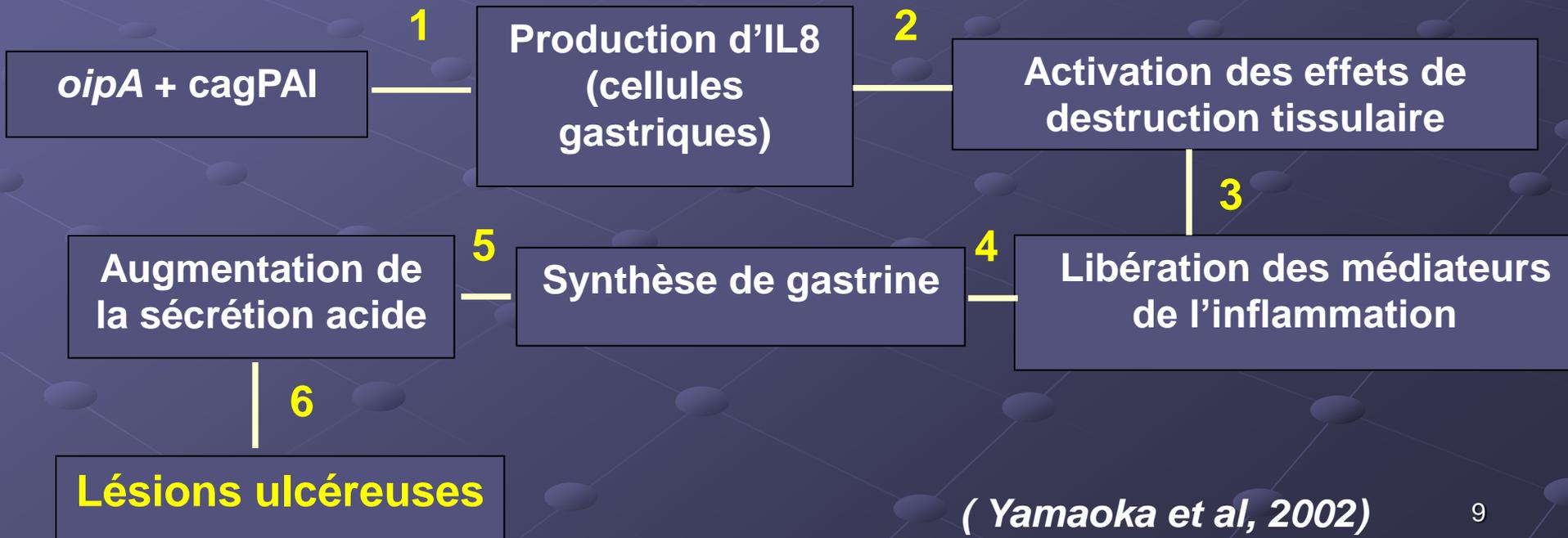
(Stein et al, 2001; Moese et al, 2004)

## ♠ Le gène *iceA*

- Découvert par Peek et coll
- Groupe de gènes: virulence de *H. pylori*
- Exprimé: contact avec les cellules épithéliales
- *iceA*: deux variants alléliques: *iceA1* et *iceA2*
  - ❖ *iceA1*: associé à l'ulcère duodénal
  - ❖ *iceA2*: associé à la gastrite chronique

## ♠ Le gène *oipA*

- Récemment décrit
- Code pour une OMP: impliquée/ Processus pro-inflammatoire: **OIP (Outer Inflammatory Protein)**
- Deux formes:   
→ gène fonctionnel «on»  
→ gène non fonctionnel «off»



( Yamaoka et al, 2002)

# Contexte

**Travail prospectif** en Tunisie destiné à connaître l'épidémiologie tunisienne (Etude multicentrique)

- ✓ Mettre en place **un consensus tunisien** de traitement de l'ulcère et sa mise à jour en cas de besoin
- ✓ **Prévenir les pathologies sévères** (cancer gastrique et lymphome du MALT)
  - les données biologiques (prise en charge ciblée des patients Hp+ cliniquement patents)
  - les données épidémiologiques (populations à risque)

# Objectifs

## 1/ Séroprévalence chez le sujet tout venant

✓ asymptomatique

✓ symptomatique

## 2/ Facteurs de virulence

(distribution selon la pathologie, age, sexe)

## 3/ Résistance aux antibiotiques (mutations/ cla)

# Matériel d'étude (1)

## Séroprévalence

♠ 250 Donneurs de sang: aucun ATCD de PG ou autre et contrôlés AgHBS, Ac Anti-HIV et anti-HVC (-) / **Sérum**

♠ 146 sujets consultants à l'hôpital (**Sérum, biopsies gastriques**)

- 59 sujets asymptomatiques

- 87 sujets symptomatiques: ATCD de PGD

# Matériel d'étude (2)

## Facteurs de virulence/ Rce aux ATB

♠ 281 souches: Février 2004 - Juillet 2007

♠ 4 biopsies (antrales et/ou fundiques)

- 48 Enfants (1UD, 47 G)

- 233 Adultes (11UG, 66UD, 148G, 7CG et 1MALT )

# Méthodes d'étude (1)

## Séroprévalence

♠ **ELISA** : mise en évidence des anticorps : le reflet de l'infection

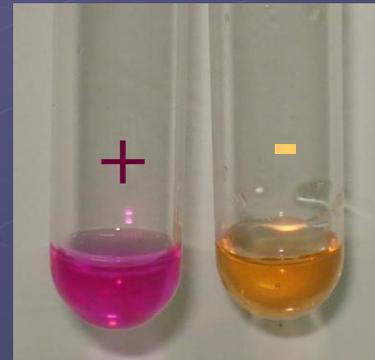
**IgG totaux** anti *H pylori* : kit Platelia® *H. pylori* (Biorad)

**Anti-Cag:** kit Medizinische Labordiagnostika AG  
(Euroimmun)

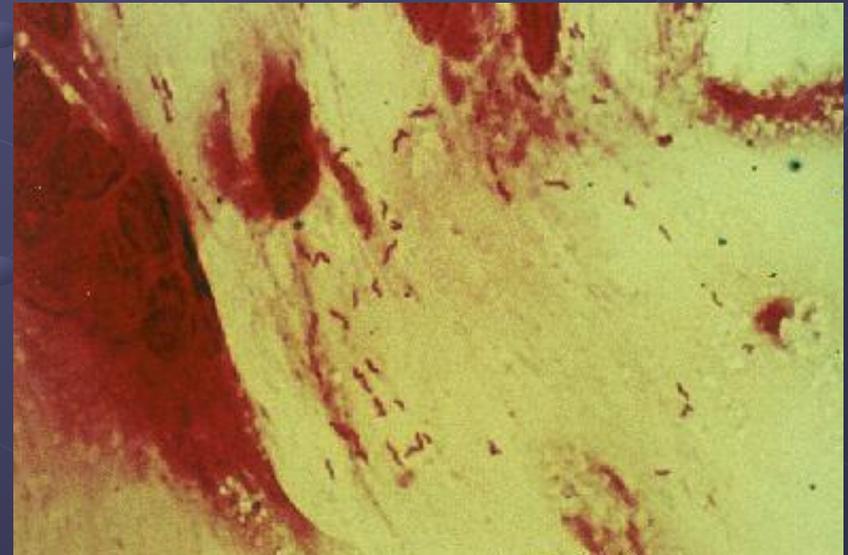
# Méthodes d'étude (2)

## Tests d'orientation

♠ **Activité uréasique +++**



♠ **Etalement, fixation, coloration de Gram/ biopsies dilacérées/scalpel**



# Méthodes d'étude (3)

## Isolement et Identification

### ♠ Culture: référence

- Milieu sélectif / Columbia (Skirrow)
- Microaérophilie / 3 à 7j à 37°C



### ♠ Identification biochimique

• Uréase +

• Catalase +

• Oxydase +



# Méthodes d'étude (4)

## Résistance aux antibiotiques Antibiogramme

### ♠ Antibiogramme: CA-SFM

- Inoculum riche (3McF)
- Inondation
- < 10% formes coccoides
- Microaérophilie / 2 à 4j à 37°C



# Méthodes d'étude (5)

## Recherche des mutations à la clarithromycine

- **Extraction:** kit Qiagen (Mini kit DNA)
- **PCR en temps réel:** amorces Scorpion
- **PCR-RFLP:**
  - B<sub>Sa</sub>1: A2144G → 2143G
  - B<sub>b</sub>S1: A2143G → 2142G

## Facteurs de virulence

- **PCR :** amorces relatives aux gènes cibles (*cagA*, *vacA*, *iceA* et *oipA*)

# RESULTATS

# Résultats (1)

## Séroprévalence globale

### Donneurs de sang

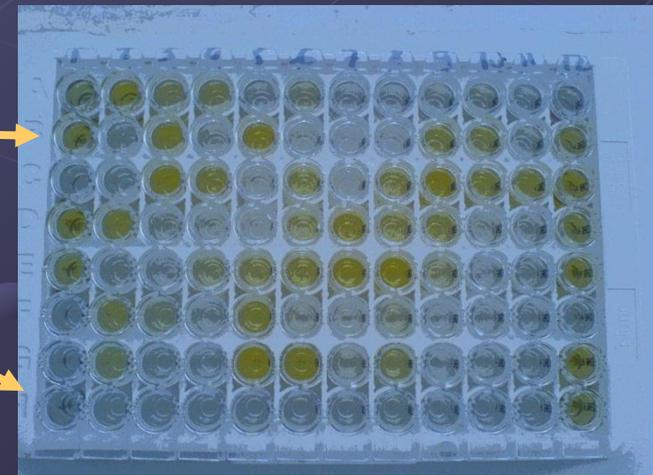
IgG anti-*H. pylori* : 63,2%

IgG anti-cag : 11%

IgG anti-*H. pylori*



IgG anti-cag



Echantillon positif

Echantillon négatif

# Résultats (2)

- Corrélation de la sérologie avec la taille

Taille	Anticorps anti Hp+	Anticorps anti Hp-	Total	<i>p</i>
<1,71	95 (62,5%)	57 (37,5%)	152	0,8 NS
>1,71	63 (64,3%)	35 (35,7%)	98	
Total	158 (63,2%)	92 (36,8%)	250	

# Résultats (3)

- Corrélation de la sérologie avec la consommation de tabac

Fumeur	Anticorps anti Hp+	Anticorps anti Hp-	Total	<i>p</i>
Oui	88 (77,9%)	45 (22,1%)	113	0,3  NS
Non	70 (59,8%)	47 (40,2%)	117	
Total	158 (63,2%)	92 (36,8%)	250	

# Résultats (4)

- **Corrélation de la sérologie avec la consommation d'alcool**

Consommation d'alcool	Anticorps anti <i>H. pylori</i> +	Anticorps anti <i>H. pylori</i> -	Total	<i>p</i>
Oui	29 (52,7%)	26 (47,3%)	55	0,07*  NS
Non	129 (66,1%)	66 (33,9%)	195	
Total	158 (63,2%)	92 (36,8%)	250	

\* Littérature : certains tanins seraient protecteurs contre l'infection à *H pylori*

# Résultats (5)

- **Corrélation de la sérologie avec le mode d'alimentation**

Assiette unique	Anticorps anti Hp+	Anticorps anti Hp-	Total	<i>p</i>
Non	67 (57,8%)	49 (42,2%)	116	0,09 NS
Oui	91 (67,9%)	43 (32,1%)	134	
Total	158 (63,2%)	92 (36,8%)	250	

♠ Séroprévalence: élevée patients partageant une assiette commune (rôle++ de la salive)

# Résultats (6)

## Séroprévalence globale Patients consultant à l'hôpital

IgG anti-*H. pylori* : 99,3%

IgG anti-cag : 55,5%

# Résultats (7)

- Corrélation de la sérologie avec le statut symptomatique/asymptomatique

Patients	Anticorps anti <i>H. pylori</i>		Total	<i>p</i>
	Positifs N (%)	Négatifs N (%)		
Symptomatiques	87 (100 %)	0	87	0,2 NS
Asymptomatiques	58 (98,3%)	1 (1,7%)	59	

# Résultats (8)

- Relation IgG anti-Cag et statut symptomatique/asymptomatique

Patients	Anticorps anti- Cag		Total	<i>p</i>
	Positif N (%)	Négatif N (%)		
Symptomatiques	58 (66,7%)	29 (33,3%)	87	0,002
Asymptomatiques	23 (39%)	36 (61%)	59	
Total	92	54	146	

♣ Le gène *cagA*: fortement corrélé/ Ac anti-cag

Réaction de l'organisme envers cet Ag, en + de l'inflammation

# Résultats (9)

## Résistance aux antibiotiques

Résistance primaire chez les enfants et les adultes (PCR-TR/ATB standard)

	Enfants (N=48)	Adultes (N=225)	<i>p</i>
Clarithromycine <b>R</b>	9 (18.8%)	33 (14.6%)	> 0.05
Clarithromycine <b>S</b>	39 (81.2%)	192 (85.4%)	
Métronidazole <b>R</b>	12 (25%)	128 (56.8%)	< 0.05
Métronidazole <b>S</b>	36 (75%)	97 (43.2%)	
Amoxicilline <b>R</b>	Pas de résistance	Pas de résistance	-

♠ Rce laire Cla: les enfants >> les adultes: acquisition de la résistance dès l'enfance (Kim et al., *J Antimicrobial Chemother*, 2001)

# Résultats (10)

## Distribution de la résistance primaire en fonction du sexe

	Femme	Homme	Total	p
Clarithromycine <b>R</b>	26 <b>(61.9%)</b>	16 <b>(38.1%)</b>	42	> 0,05
Métronidazole <b>R</b>	95 <b>(67.8%)</b>	45 <b>(32.2%)</b>	140	< 0,05

♠ Rce laire Mtz: la femme >> l'homme: utilisation des imidazolés: infections génitales (Koletzko et al, Gut, 2006)

# Résultats (11)

## Distribution de la résistance primaire / des pathologies

	<b>PNU*</b>	<b>PU**</b>	<b>Total</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Clarithromycine R</b>	<b>32 (76.2%)</b>	<b>10 (23.8%)</b>	<b>42</b>	<b>&gt; 0,05</b>
<b>Métronidazole R</b>	<b>96 (68.6%)</b>	<b>44 (31.4%)</b>	<b>140</b>	<b>&gt; 0,05</b>

**\*PNU: Pathologies Non Ulcéreuses**

**\*\*PU: Pathologies Ulcéreuses**

# Résultats (12)

## Distribution de la résistance primaire en fonction des 3 régions

	Tunis (N=181)	Menzel Bourguiba (N=83)	Mahdia (N=9)	Total (N=273)	<i>p</i>
Clarith R	27	12	3	42	> 0,05
Mtz R	95	42	3	140	

**Clarithromycine/ Métronidazole: différence non significative**

# Résultats (13)

## Distribution des mutations conférant la résistance à la clarithromycine PCR temps réel

	<b>PNU</b>	<b>PU</b>	<b>Total</b>
<b>A2143G</b>	<b>28</b> <b>(75.6%)</b>	<b>9</b> <b>(24.4%)</b>	<b>37</b>
<b>A2142G</b>	<b>4</b> <b>(80%)</b>	<b>1</b> <b>(20%)</b>	<b>5</b>
<b>A2142C</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

# Résultats (14)

Distribution des mutations conférant la résistance à la clarithromycine PCR-RFLP et comparaison avec la PCR-TR

Techniques	A 2143G	A 2142G	Total
PCR-RFLP	26	2	28
PCR-TR	37	5	42

→ L'apport de la PCR en temps réel/ PCR-RFLP

# Résultats (15)

## Répartition des facteurs de virulence de *H. pylori*

♠ *vacA*:

	<i>m1 s1</i>	<i>m2 s2</i>	<i>m1 s2</i>	Mélange <i>m1 m2</i>
Adultes	19	102	0	71
Enfants	4	24	0	15
Total	23 (12.5%)	128 (45.6%)	0	88 (31.4%)

- *m1 s1*: souche la plus toxigène / associée aux pathologies sévères
- *m2 s2*: pas de production de toxines / toxines inactives
- *m1 s2*: très rarement décrit (littérature)

# Résultats (16)

## Répartition des facteurs de virulence de *H.pylori*

### ♠ *iceA*:

	<i>iceA1+</i>	<i>iceA2+</i>	Mélange (A1/A2)
Adultes	128	43	41
Enfants	31	2	11
TOTAL	169 (60.2%)	45 (16%)	67 (23.8%)

- *iceA1*: associé à l'ulcère duodénal
- *iceA2*: associé à la gastrite chronique

# Résultats (17)

## Répartition des facteurs de virulence de *H.pylori*

♠ *cagA*:

	<i>cagA</i> +	<i>cagA</i> -
Adultes	157 (75%)	52
Enfants	16 (35.5%)	29
Total	173 (61.6%)	81 (39.4%)

- *cagA*: pathologies sévères/ marqueur prédictif de l'évolution clinique

# Résultats (18)

## Répartition des facteurs de virulence de *H.pylori*

♠ *oipA*:

	<i>oipA</i> +	<i>oipA</i> -
Adultes	213 (100%)	0
Enfants	41 (85.4%)	3
Total	255 (90.8%)	3 (9.2%)

- *oipA*: confère aux souches un pouvoir inflammatoire +++

# Discussion-Conclusion

# Séroprévalence

♠ Adulte asymptomatique : **64%**, 2 fois plus que l'enfant

*(Besbes, 1999: 32,9% (enfant); 65,7% (DS)- Zaterka et al, 2007)*

**Plus faible: Pérou 75%; Afrique du sud 84,2%**

*(Shahinian , 2000)*

**Plus élevée: Japon 49%; Canada 20- 40%**

*(Replogle, 2000)*

♠ Pas de corrélation: Séropositivité/ Taille /Tabac / alcool

*(Oderda et al, 1998)*

# Résistance aux antibiotiques

♠ **Nos résultats:** stabilité Rce I<sup>aire</sup> : Cla, Mtz (17,5% et 56% en 2002 respectivement) vs 15,3% et 51,3% (*Chaabouni et al., Gastroenterol Clin Biol, 2002*)

La Rce I<sup>aire</sup> risque d'augmenter à l'image de la consommation annuelle exagérée de la clarithromycine et doit être constamment contrôlée

♠ PCR-TR: (en plus de la détermination de la résistance): **l'existence des doubles populations** (mélange chez le même patient): difficile par les méthodes phénotypiques

# Facteurs de virulence

♠ Facteurs de virulence: Tunisie/ proche de la littérature (*Rudi et al, Salih et al, Covacci et al, 2007*) : Répartition classique (Europe-Méditerranée)

## Pouvoir inflammatoire important/ souches tunisiennes

♠ *oipA*: pourcentages élevés en particulier chez l'adulte

♠ *cagA* et *iceA1*: prévalence élevée

♠ Discordance: Antre/Fundus: **co-infection par deux souches ou par deux clones d'une même souche** chez au moins 10% des patients

♠ A1/A2 (*iceA*) et m1/m2 (*vacA*) nous laisse penser que ce mélange pourrait atteindre **20-30%** de la population (*Yamaoka et al, Van Doorn et al, 1998*)

**Merci de votre attention**