

Caractérisation moléculaire des facteurs de virulences de *Helicobacter pylori* : fréquences, signes cliniques et traitements associés à une infection à *H. pylori*

Tegwinde Rebeca COMPAORE^{1,2,3*}, Aminata Dickel SIDIBE³,
Kalifou TRAORE³, Nômawendé Ines COMPAORE^{3,4}, Sylvie ZIDA¹,
Dinanibe KAMBIRE¹, Serge Théophile SOUBEIGA^{1,2,3}, Lassina TRAORE^{1,2,3},
Denise P. ILBOUDO⁵, Yasmine Astrid SANA³, Tani SAGNA^{1,2,3},
Wendkuuni Florencia DJIGMA^{1,2,3}, Henri Gautier OUEDRAOGO^{1,3},
Jacques SIMPORE^{2,3}

Titre courant de l'article : Signes cliniques et traitements associés aux facteurs de virulences de *Helicobacter pylori*

Résumé

Contexte : *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) est selon l'OMS un agent pathogène à priorité élevée pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques. Plusieurs facteurs de virulences présumés tels que *vacA*, *cagA* et *babA* ont été identifiés comme contribuant au risque et à la gravité des maladies liées à *H. pylori*. L'objectif de notre étude était de déterminer les liens entre les signes cliniques associés à une infection à *H. pylori*, les traitements utilisés et les gènes *vacA1* (sous types), *vacA2*, *babA2* et *cagA*.

Méthodologie : 250 prélèvements de selles ont été collectés dans deux laboratoires de la ville de Ouagadougou, Burkina Faso, de Novembre 2020 à Janvier 2021. Les ADN bactériens ont été extraits et les facteurs de virulences de *H. pylori* ont été caractérisés par PCR.

Résultats : Le gène *VacAi1* semblerait être lié à la présence des signes cliniques de l'infection à *H. pylori* avec $p=0,05$. Les sous-types des facteurs de virulences *vacAs1*, *babA2* et *cagA* sembleraient liés à un échec des traitements d'éradications avec respectivement $p=0,034$; $0,027$ et $0,025$.

Conclusion : Les résultats suggèrent une association entre la présence du facteur de virulence *vacAi1* et l'apparition des signes cliniques de l'infection par *H. pylori*.

Mots clés : *Helicobacter pylori*, gènes des facteurs de virulences, signes cliniques, traitements, Burkina Faso

¹ : Département Biomédical et Sante Publique, Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Ouagadougou, Burkina Faso

² : Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni (CERBA), Ouagadougou, Burkina Faso

³ : Laboratoire de Biologie et de Génétique Moléculaire (LABIOGENE); Université Joseph KI-ZERBO, Ouagadougou, Burkina Faso

⁴ : Clinique El Fateh-Suka, Service de médecine et de spécialités médicales, Ouagadougou, Burkina Faso

⁵ : Université de Fada N'Gourma, Fada N'Gourma, Burkina Faso Burkina Faso

*Auteur correspondant : Compaore Tegwinde Rebeca Ouagadougou, tel : +226 79090075. Courriel : rebecca23fr@yahoo.fr

Molecular Characterization of *Helicobacter pylori* Virulence Factors: Clinical Signs and Treatments Associated with *Helicobacter pylori* infection

Abstract

Background: According to the WHO, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a high-priority pathogen for research and development of new antibiotics. Several putative virulence factors, such as *vacA*, *cagA*, and *babA*, have been identified as contributing to the risk and severity of *H. pylori*-related diseases. The aim of our study was to determine possible relationships between clinical signs associated with *H. pylori* infection, treatments used, and the *vacA1* (subtypes), *vacA2*, *babA2*, and *cagA* genes.

Methodology: Two hundred and fifty (250) stool samples were collected at the two HOSCO and CERBA laboratory sites in Ouagadougou, Burkina Faso, from November 2020 to January 2021. A questionnaire form was completed for each sample. Bacterial DNA was extracted, and *H. pylori* virulence factors were characterized by PCR.

Results: The *vacA1* gene appeared to be linked to the presence of clinical signs of *H. pylori* infection, with $p=0.05$. The *vacAs1*, *babA2*, and *cagA* virulence factor subtypes appeared to be linked to the failure of eradication treatments with $p=0.034$; 0.027 , and 0.025 respectively.

Conclusion: This study is one of the first of its kind in sub-Saharan Africa, particularly in Burkina Faso. The results suggest an association between the presence of the *vacA1* virulence factor and the onset of clinical signs of infection by *H. pylori*. This could lead to further studies to better understand this association.

Keywords: *Helicobacter pylori*, virulence factor genes, clinical signs, treatments, Burkina Faso

Introduction

Helicobacter pylori (*H. pylori*) a un rôle bien établi dans différentes affections gastroduodénales : gastrite, maladie ulcéreuse gastroduodénale, adénocarcinome gastrique, lymphome MALT « Mucosal Associated Lymphoïde Tissue »(1). L'infection a également été liée à d'autres maladies telles que l'anémie ferriprive, la thrombocytopénie immunitaire, les maladies cardiovasculaires, les maladies hépatobiliaires, le diabète sucré, les allergies et l'asthme (2). La symptomatologie varie d'une pathologie à une autre. La présentation clinique diversifiée de l'infection par *H. pylori* est le résultat de l'interaction entre la virulence bactérienne, la génétique de l'hôte et les facteurs sociodémographiques et environnementaux (3). Dans une étude précédente, nous avons trouvés une forte association entre les facteurs de virulence de *H. pylori* et les comportements hygiéno-dietétiques (4).

Les gènes *cagA* (cytotoxin associated genes A), *vacA* (Vacuolating cytotoxin A) et l'adhésine de liaison à l'antigène du groupe sanguin (*babA2*) ont été associés à la pathogénicité de la bactérie et à la gravité de l'infection par *H. pylori* (5). Le gène *VacA* est composé de trois (3) régions principales : la région « signal » (S1 et S2), la région « intermédiaire » (I1 et I2) et la région « médiane »(m1 et m2) (5).

L'infection à *H. pylori* est très souvent asymptomatique. Elle se fait généralement dès l'enfance et s'accompagne dans la grande majorité des cas de gastrite chronique qui peut évoluer sans autres complications. Différents symptômes sont possibles : douleurs épigastriques, crampes ou brûlures, vomissements, diarrhées, ballonnements, éructations, constipations, fièvres, nausées, remontés gastriques, un syndrome ulcéreux avec les manifestations liées aux complications telles qu'une anorexie, une anémie ou une hémorragie digestive.

L'éradication de la bactérie constitue la base du traitement antiulcéreux. Elle favorise la cicatrisation, prévient la récurrence et les complications. *H. pylori* possède une capacité à acquérir des résistances essentiellement par mutation. La transmission de la résistance est verticale et les taux de résistance augmentent progressivement du fait de la pression de sélection. Tous les antibiotiques sont concernés (6-8). L'amélioration de l'antibiothérapie et des conditions socioéconomiques dans le monde a permis d'avoir une réduction du nombre de personnes infectées par *H. pylori*. La lutte contre l'infection à *H. pylori*, se fait avec les thérapies à base des combinaisons d'anti-sécrétoires comme les inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) et d'au moins deux antibiotiques. Les antibiotiques couramment utilisés en 1^{ère} intention sont : amoxicilline, métronidazole et clarithromycine. En cas d'échec du traitement de première intention, il faut recourir à des traitements de deuxième intention, puis de troisième (9). En effet, le succès des protocoles de traitement diminue en raison de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques. Malgré plusieurs études sur l'infection à *H. pylori*, aucun traitement efficace n'a encore été développé pour faire face à la résistance aux antibiotiques (7, 10, 11).

Compte tenu de ces constats, nous nous sommes fixés pour objectif de déterminer les relations possibles entre les signes cliniques associés à une infection à *H. pylori*, les traitements d'éradications et les gènes *vacAs1*, *vacAs2*, *vacAm1*, *vacAm1*, *vacI*, *vacA2*, *BabA1* et *cagA*. Ceci pour discuter de la responsabilité de ces gènes dans la virulence de cette bactérie.

Méthodologie

Echantillonnage

La population d'étude était constituée de patients reçus aux laboratoires de l'Hopital Saint Camille (HOSCO) et du Centre de Recherche Biomoléculaire (CERBA) de la ville de Ouagadougou au Burkina Faso. L'échantillonnage faite de façon systématique, a concerné tous les patients consentants qui se présentaient avec des examens de selles, quel que soit la nature de l'examen. Au total 250 prélèvements de selles ont été collectés sur les deux sites, de Novembre 2020 à Janvier 2021. Pour chaque patient une fiche de collecte a été renseignée. Dans cette fiche figurait les renseignements sur la survenue de symptômes et la prise de traitements d'éradications. Nous n'avons pas tenu compte des

protocoles appliqués mais il s'agissait tous des traitements de 1^{ère} ligne. Les signes cliniques étudiés étaient ceux de reflux gastro-œsophagiens (RGO), de dyspepsies, d'anémie ferriprive, de maladie ulcéreuse gastro-duodénale, de gastro-duodénopathies et/ou de cancer gastrique.

Les selles ont été stocké à -80 °C avant analyses.

Extraction de l'ADN

Le kit QIAamp ® DNA Stool a été utilisé pour l'extraction de l'ADN bactérien dans les selles, extraction réalisée en suivant les instructions du fabricant (Qiagen, Allemagne).

L'amplification des gènes a été effectuée par PCR classique multiplexe.

Après reconstitution des amorces de l'ARN16s, *vacAs1*, *vacAs2*, *vacAm1*, , *vacI*, *vacA2*, *Baba1* et *cagA*, celles-ci ont été diluées au 1/10 dans un volume final de 200µL. Le Master Mix 5X FIREPol® Solis Biodyne (contenant de l'ADN polymérase, du tampon de réaction, 12,5mM de MgCl₂ puis 1mM de dNTP) a également été dilué pour avoir une concentration de 1,5X dans un volume final de 1000µL.

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur classique (GeneAmp* PCR System 9700) sur une plaque de 96 puits avec dans chaque puit 25µL de mélange réactionnel. Ce mélange comprenait 12µL du Master Mix (1,5X), 2µL d'amorces 100µM (0,5µL des amorces sens et anti-sens de chaque couple d'amorces associées en multiplexe (Tableau 1)), 6µL de H₂O stérile et 5µL d'ADN bactérien (82,01 ng/mL). Les conditions PCR appliquées ont été décrite dans une publication précédente (4)

Collecte et Analyses des données

Les données ont été recueillies sur un formulaire papier et saisies sur Excel version 2016 et analysées à l'aide du logiciel SPSS version 21. Un tableau statistique 2X2 et un test de chi carré ont été effectués afin de déterminer les liens entre les facteurs de virulence et les signes cliniques et traitements. La différence était statistiquement significative si la valeur de $p \leq 0,05$ (p-value).

Considérations éthiques

Cette étude a obtenu l'approbation du Comité d'Ethique pour la Recherche en Santé du Burkina Faso (Délibération n° 2020-12-274). Tous les participants ou tuteurs de participants mineurs ont donné leur consentement (et assentiment) libre et éclairé. La confidentialité et l'anonymat des informations ont été respectés. Les résultats ont été transmis au médecin traitant.

Résultats

Le gène de virulence *cagA* était présent chez 20,19 % des individus, *babA2* et *vacA* ont été détectés respectivement chez 9,65 % et 67,54 % de la population positive pour *H. pylori*. Parmi les sous-types de *vacA*, *vacAs1* était le plus fréquent, avec 39,04 %, suivi de *vacAi1* (19,74 %), *vacAi2* (17,54 %) et *vacAs2* avec 10,96 %. Les gènes *vacAm1* et *vacAm2* sont moins fréquents (6,14 % chacun).

Lien entre les facteurs de virulence et les signes cliniques de l'infection à *H. pylori*

Le tableau I ci-dessous représente la corrélation entre les signes cliniques d'une infection à *H. pylori* et les différents gènes de virulences. Le gène *VacAi1* semblait lié à l'apparition des signes cliniques de l'infection à *H. pylori* avec une valeur de *p* proche de 0.05.

Tableau I: Liens entre signes cliniques et facteurs de virulences de *H. pylori*

Gènes de virulence		Signes cliniques			p-value
		Asymptomatiques N (%)	Symptomatiques N (%)	Total N (%)	
<i>vacAs1</i>	Absent	47 (18,8)	114 (45,6)	161 (64,4)	0,178
	Présence	19 (7,6)	70 (28)	89 (35,6)	
	Total	66 (26,4)	184 (73,6)	250 (100)	
<i>vacAs2</i>	Absence	59 (23,6)	166 (66,4)	225 (90)	0,848
	Présence	7 (2,8)	18 (7,2)	25 (10)	
	Total	66 (26,4)	184 (73,6)	250 (100)	
<i>vacAm1</i>	Absence	62 (24,8)	174 (69,6)	236 (94,4)	0,850
	Présence	4 (1,6)	10 (4)	14 (5,6)	
	Total	66 (26,4)	184 (73,6)	250 (100)	
<i>vacAm2</i>	Absence	61 (24,4)	175 (70)	236 (94,4)	0,416
	Présence	5 (2)	9 (3,6)	14 (5,6)	
	Total	66 (26,4)	184 (73,6)	250 (100)	
<i>vacAi1</i>	Absence	49 (19,6)	156 (62,4)	205 (82)	0,056
	Présence	17 (6,8)	28 (11,2)	45 (18)	
	Total	66 (26,4)	184 (73,6)	250 (100)	
<i>vacAi2</i>	Absence	54 (21,6)	156 (62,4)	210 (84)	0,573
	Présence	12 (4,8)	28 (11,2)	40 (16)	
	Total	66 (26,4)	184 (73,6)	250 (100)	
<i>babA2</i>	Absence	60 (24)	168 (67,2)	228 (91,2)	0,923
	Présence	6 (2,4)	16 (6,4)	22 (8,8)	
	Total	66 (26,4)	184 (73,6)	250 (100)	
<i>cagA</i>	Absence	57 (22,8)	147 (58,8)	204 (81,6)	0,244
	Présence	9 (3,6)	37 (14,8)	46 (18,4)	
	Total	66 (26,4)	184 (73,6)	250 (100)	

Corrélation entre la présence des gènes de virulence de *Helicobacter pylori* et la mise sous traitement d'éradication

La corrélation entre les gènes de virulences de *Helicobacter pylori* et la mise sous traitement de première ligne est présentée dans le tableau II. La présence des sous-types *vacAs1*, *babA2* et *cagA* sont liés au traitement avec respectivement $p=0,034$; $0,027$ et $0,025$.

Tableau II : Corrélation entre traitement et gènes de virulences de *H. pylori*

Gènes de virulence	Traitement			p-value	
	Absence	Non N (%)	Oui N (%)		Total N (%)
<i>vacAs1</i>	Absence	137 (54,8)	24 (9,6)	161 (64,4)	0,034
	Présence	66 (26,4)	23 (9,2)	89 (35,6)	
	Total	203 (81,2)	47 (18,8)	250 (100)	
<i>vacAs2</i>	Absence	185 (74)	40 (16)	225 (90)	0,215
	Présence	18 (7,2)	7 (2,8)	25 (10)	
	Total	203 (81,2)	47 (18,8)	250 (100)	
<i>vacAm1</i>	Absence	191 (76,4)	45 (18)	236 (94,4)	0,656
	Présence	12 (4,8)	2 (0,8)	14 (5,6)	
	Total	203 (81,2)	47 (18,8)	250 (100)	
<i>vacAm2</i>	Absence	192 (76,8)	44 (17,6)	236 (94,4)	0,796
	Présence	11 (4,4)	3 (1,2)	14 (5,6)	
	Total	203 (81,2)	47 (18,8)	250 (100)	
<i>vacAi1</i>	Absence	165 (66)	40 (16)	205 (82)	0,538
	Présence	38 (15,2)	7 (2,8)	45 (18)	
	Total	203 (81,2)	47 (18,8)	250 (100)	
<i>vacAi2</i>	Absence	169 (67,6)	41 (16,4)	210 (84)	0,502
	Présence	34 (13,6)	6 (2,4)	40 (16)	
	Total	203 (81,2)	47 (18,8)	250 (100)	
<i>babA2</i>	Absence	189 (75,6)	39 (15,6)	228 (91,2)	0,027
	Présence	14 (5,6)	8 (3,2)	22 (8,8)	
	Total	203 (81,2)	47 (18,8)	250 (100)	
<i>cagA</i>	Absence	171 (68,4)	33 (13,2)	204 (81,6)	0,025
	Présence	32 (12,8)	14 (5,6)	46 (18,4)	
	Total	203 (81,2)	47 (18,8)	250 (100)	

Discussion

Cette étude fait partie des premières en la matière en Afrique sub-Saharienne et particulièrement au Burkina Faso. Dans notre étude nous avons trouvé qu'il semble avoir une association entre la présence du facteur de virulence *vacA*i*1* et l'apparition des signes cliniques de l'infection par *H. pylori*. Ceci pourrait susciter d'autres études pour mieux comprendre cette association.

Nos résultats nous ont permis également de savoir que les sous-types *vacAs1*, *cagA* et *babA2* sont significativement liés aux traitements utilisés au moment de l'étude. Ces résultats montrent que ces trois (03) facteurs sont les plus fréquemment trouvés dans les cas d'échecs de traitement de *H. pylori* dans notre population d'étude. Les différents protocoles de traitement n'ont pas été pris en compte dans cette étude mais il s'agissait bien des traitements de 1^{ère} ligne. Aussi il a été rapporté que les patients ne reviennent pas systématiquement pour le contrôle dans les 3 mois après le traitement pour s'assurer de l'élimination efficace du germe. Ces gènes seraient-ils liés à des résistances aux antibiotiques utilisés en 1^{ère} intention ? Ceci rappelle encore la nécessité de l'antibiogramme et des PCR multiplexes pour étudier la résistance bactérienne dans notre contexte (12) et d'un suivi efficace du traitement.

Conclusion

Cette étude est l'une des premières au Burkina Faso à mettre en lumière le lien entre des facteurs de virulences et les signes cliniques de l'infection ainsi que les traitements d'éradication de *Helicobacter pylori*.

Références

1. **Oztekin M, Yilmaz B, Agagunduz D, Capasso R.** Overview of *Helicobacter pylori* Infection: Clinical Features, Treatment, and Nutritional Aspects. *Diseases*. 2021;9(4).
2. **Ofori EG, Adinortey CA, Bockarie AS, Kyei F, Tagoe EA, Adinortey MB.** *Helicobacter pylori* Infection, Virulence Genes' Distribution and Accompanying Clinical Outcomes: The West Africa Situation. *Biomed Res Int*. 2019;2019:7312908.
3. **Chang WL, Yeh YC, Sheu BS.** The impacts of *H. pylori* virulence factors on the development of gastroduodenal diseases. *J Biomed Sci*. 2018;25(1):68.
4. **Compaore TR, Traore K, Compaore NI, Traore L, Zida S, Soubeiga ST, et al.** *Helicobacter pylori* Virulence Genes *cagA*, *babA2*, and *vacA* Detection in Dyspeptic Patients from Burkina Faso. *AJMB*, 2023, 13, 141-155. 2023;2023(13):141-55.

5. **Atherton JC, Cao P, Peek RM, Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL.** Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem.* 1995;270(30):17771-7.
6. **Boyanova L, Mitov I.** Geographic map and evolution of primary *Helicobacter pylori* resistance to antibacterial agents. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(1):59-70.
7. **De Francesco V, Giorgio F, Hassan C, Manes G, Vannella L, Panella C, et al.** Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2010;19(4):409-14.
8. **Megraud F.** *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Gut.* 2007;56(11):1502.
9. **Saleem N, Howden CW.** Update on the Management of *Helicobacter pylori* Infection. *Curr Treat Options Gastroenterol.* 2020;18(3):476-87.
10. **Aparicio T YM, Karila-Cohen P, René E.** Adénocarcinome gastrique : notions fondamentales, diagnostic et traitementGastric carcinoma: epidemiology, diagnosis and treatment. *EMC - Chirurgie.* 2004;1(1):19.
11. **Ha NC, Oh ST, Sung JY, Cha KA, Lee MH, Oh BH.** Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol.* 2001;8(6):505-9.
12. **Sermé AK, Compaore N, Compaoré R, Djigma F, Somda KS, Diarra B, et al.** *Helicobacter Pylori* And Upper Digestive Diseases - Diagnosis Through Real Time Pcr. *Nigerian Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2016;8(2):71.