

THESE
présentée
devant l'**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON I**
pour l'obtention
du **DIPLOME DE DOCTORAT**
(arrêté du 30 mars 1992)

présentée et soutenue publiquement le 23 mars 2001

par

Laurence SALAÜN

**ETUDE DE LA STRUCTURE GENETIQUE DE
L'ESPECE *HELICOBACTER PYLORI*
PAR L'ANALYSE COMPARATIVE DE PLUSIEURS
MARQUEURS MOLECULAIRES**

JURY :

BALANDREAU Jacques, <i>DR1-CNRS, Université Claude Bernard Lyon I</i>	Président
BLANC Dominique, <i>Docteur ès Sciences, CHU Vaudois, Lausanne</i>	Rapporteur
GRIMONT Patrick, <i>Professeur, Institut Pasteur, Paris</i>	Rapporteur
PICARD Bertrand, <i>PU-PH, Université de Bretagne Occidentale, Brest</i>	Co-encadrant de thèse
TIBAYRENC Michel, <i>DR1-IRD, IRD, Montpellier</i>	Co-encadrant de thèse
FAUCHERE Jean-Louis, <i>PU-PH, CHU La Milétrie, Poitiers</i>	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie les membres de mon jury de thèse pour avoir consacré du temps à la lecture de ce manuscrit. Merci à Monsieur Jacques Balandreau de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Merci à Messieurs Dominique Blanc et Patrick Grimont d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et d'y avoir porté un regard critique.

Je remercie Monsieur Jean-Louis Fauchère d'avoir accepté la direction de cette thèse.

Je remercie Monsieur Bertrand Picard pour m'avoir permis de poursuivre le travail entamé pendant le DEA. Merci de m'avoir donné ma chance et de m'avoir fait confiance.

Je remercie Monsieur Michel Tibayrenc pour m'avoir permis de poursuivre ce travail de thèse dans son laboratoire. Merci de m'avoir fait profiter du savoir et l'enthousiasme de toute l'équipe du CEPM.

A Christian Barnabé, mille mercis pour ton encadrement et pour toutes nos discussions scientifiques. Merci pour ta grande gentillesse, ton entière disponibilité et ton soutien.

A l'ensemble du laboratoire de Bactériologie-Virologie de la Faculté de Médecine de Brest et du CHU Morvan, merci de m'avoir accompagnée pour mes premiers pas dans la recherche. Merci pour votre disponibilité et votre bonne humeur.

A tous les membres du CEPM, merci pour les nombreux débats scientifiques. Merci aussi pour les discussions animées et tous azimuts du coin café et du restaurant de l'IRD !

A l'équipe du laboratoire de Microbiologie A du CHU La Milétrie de Poitiers, merci pour m'avoir fait partager votre connaissance de *Helicobacter pylori* et pour le travail que nous avons fait ensemble.

Merci à ma famille pour ses encouragements tout au long de ces nombreuses années d'étude.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
I. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	3
1. HISTOIRE DE LA DECOUVERTE DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	3
1.1. Premières observations de bactéries spiralées dans l'estomac	3
1.2. L'uréase gastrique	3
1.3. La découverte de <i>H. pylori</i>	3
2. BACTERIOLOGIE ET ECOLOGIE DES BACTERIES DU GENRE <i>HELICOBACTER</i>	4
2.1. Position taxonomique des bactéries du genre <i>Helicobacter</i>	4
2.2. Quelques exemples d'espèces du genre <i>Helicobacter</i>	6
<input type="checkbox"/> Exemples d' <i>Helicobacter</i> gastriques	6
<input type="checkbox"/> Exemples d' <i>Helicobacter</i> non gastriques	7
2.3. Morphologie des <i>Helicobacter</i>	7
2.4. Physiologie de <i>H. pylori</i>	9
2.5. Ecologie de <i>H. pylori</i>	9
3. EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION A <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	11
3.1. Prévalence de l'infection à <i>H. pylori</i>	11
3.2. Incidence de l'infection à <i>H. pylori</i>	12
3.3. Facteurs de risque de l'acquisition de l'infection à <i>H. pylori</i>	12
3.4. Transmission de <i>H. pylori</i>	13
3.4.1. Réservoirs et sources d'infection	13
<input type="checkbox"/> Réservoir animal	13
<input type="checkbox"/> Sources environnementales	14
3.4.2. Transmissions inter-humaines	15
<input type="checkbox"/> Transmission féco-orale	15
<input type="checkbox"/> Transmission oro-orale	15
4. POUVOIR PATHOGENE DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	15
4.1. Pathologies engendrées par <i>H. pylori</i>	15
4.1.1. Gastrite	16
<input type="checkbox"/> Gastrite aiguë	16
<input type="checkbox"/> Gastrite chronique	16
4.1.2. Ulcère duodéal et ulcère gastrique	16
4.1.3. Adénocarcinome gastrique	17
4.1.4. Lymphome du MALT	17
4.1.5. Autres pathologies possiblement associées à l'infection à <i>H. pylori</i>	17
<input type="checkbox"/> Maladies coronariennes	17
<input type="checkbox"/> Mort subite du nourrisson	18
4.2. Déterminants bactériens du pouvoir pathogène de <i>H. pylori</i>	18
4.2.1. Facteurs de l'infection à <i>H. pylori</i>	18
4.2.1.1. Uréase	18
4.2.1.2. Flagelles	19
4.2.1.3. Autres facteurs de l'infection à <i>H. pylori</i>	20
<input type="checkbox"/> Adhésines bactériennes et récepteurs cellulaires	20
<input type="checkbox"/> Echappement au système immunitaire de l'hôte	20
4.2.2. Facteurs associés aux manifestations cliniques des maladies	20
4.2.2.1. Cytotoxine vacuolisante VacA	21
4.2.2.2. Antigène CagA associé à la cytotoxine et îlot de pathogénicité <i>cag</i>	22
<input type="checkbox"/> Antigène CagA associé à la cytotoxine	22
<input type="checkbox"/> Ilot de pathogénicité <i>cag</i>	22

4.2.2.3. Autres facteurs de virulence possibles	23
5. DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT DE L'INFECTION A <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	24
5.1. Diagnostic de l'infection à <i>H. pylori</i>	24
5.1.1. Méthodes invasives	24
<input type="checkbox"/> Test rapide à l'uréase	24
<input type="checkbox"/> Détection par examen histologique	24
<input type="checkbox"/> Examen bactériologique standard	24
<input type="checkbox"/> Détection de <i>H. pylori</i> par amplification génique	25
5.1.2. Méthodes non invasives	25
<input type="checkbox"/> Sérologie	25
<input type="checkbox"/> Test respiratoire à l'urée marquée au ¹³ C	26
5.2. Traitement de l'infection à <i>H. pylori</i>	26
<input type="checkbox"/> Antibiothérapie	26
<input type="checkbox"/> Développement de vaccins	26
6. ELEMENTS SUR LA STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS NATURELLES DE L'ESPECE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	27
6.1. Diversité génétique de <i>H. pylori</i>	27
6.2. Structure génétique des populations naturelles de <i>H. pylori</i>	28
7. OBJECTIF ET MISE EN ŒUVRE DE CETTE ETUDE	28
II. MATERIEL ET METHODES	30
1. MATERIEL BIOLOGIQUE	30
1.1. Souches étudiées	30
1.2. Primoculture à partir des biopsies gastriques	31
1.3. Production de biomasse	31
1.3.1. Essais de culture en milieu liquide	31
1.3.2. Essais de culture en milieu solide	32
1.3.3. Préparation des culots cellulaires	33
2. ANALYSE DU POLYMORPHISME DES GENES DE L'UREASE (<i>ureA-ureB</i>) ET DE LA FAGELLINE (<i>flaA</i>)	33
2.1. Extraction de l'ADN	33
2.2. Amorces	34
2.3. Amplification par PCR des gènes <i>ureA-ureB</i> et <i>flaA</i>	34
2.4. Analyse par RFLP des fragments amplifiés	34
2.5. Lecture et interprétation des profils	35
3. RECHERCHE DES GENES CODANT POUR LES FACTEURS DE VIRULENCE <i>vacA</i> ET <i>cagA</i> ET LA SEQUENCE D'INSERTION IS605	35
3.1. Génotypage du gène <i>vacA</i> par PCR	35
3.2. Amplification par PCR d'un fragment du gène <i>cagA</i>	36
3.3. Amplification par PCR de la séquence d'insertion IS605	36
4. ANALYSE DU POLYMORPHISME DE RESTRICTION DES GENES DE L'ARN RIBOSOMIQUE (RIBOTYPAGE)	37
4.1. Principe	37
4.2. Digestion de l'ADN et électrophorèse	37
4.3. Préparation de la sonde d'ADN complémentaire marquée à la digoxigénine	38
4.4. Transfert de l'ADN et hybridation	38
4.5. Lecture et interprétation des profils	38
5. ANALYSE DU POLYMORPHISME DE L'ADN REVELE PAR AMPLIFICATION ALEATOIRE (RAPD) ET HYBRIDATIONS MOLECULAIRES	39

5.1. Principe	39
5.2. Technique RAPD	39
5.3. Lecture et interprétation des profils	40
5.4. Test de l'indépendance des marqueurs RAPD	40
5.4.1. Principe	40
5.4.2. Préparation des membranes et dépôts des échantillons	41
5.4.2.1. Dot-Blot	41
5.4.2.2. Southern-Blot	41
5.4.3. Préparation de la sonde composite radiomarquée	41
5.4.4. Hybridations moléculaires	42
6. ELECTROPHORESE DES ISOENZYMES	42
6.1. Principe	42
6.2. Préparation des extraits protéiques	43
6.2.1. Migration en gel d'acrylamide-agarose	43
6.2.2. Migration sur support acétate de cellulose	43
6.3. Systèmes enzymatiques étudiés	44
6.3.1. Migration en gel d'acrylamide-agarose	44
6.3.2. Migration sur support acétate de cellulose	44
6.4. Dépôts et migration	45
6.4.1. Migration en gel d'acrylamide-agarose	45
6.4.1.1. Préparation du gel	45
6.4.1.2. Electrophorèse	45
6.4.2. Migration sur support acétate de cellulose	45
6.4.2.1. Préparation du support	46
6.4.2.2. Electrophorèse	46
6.5. Révélation	47
6.5.1. Coloration après migration en gel d'acrylamide-agarose	47
6.5.2. Coloration après migration sur support acétate de cellulose	47
6.6. Lecture et interprétation des profils	48
7. METHODES D'ANALYSE DES RESULTATS	48
7.1. Indices de variabilité génétique	48
7.1.1. Diversité génétique moyenne	48
7.1.2. Diversité génotypique et indice de diversité génotypique	49
7.1.3. Distance génétique de Jaccard	49
7.2. Tests statistiques classiques	50
7.3. Méthodes de classification	51
7.3.1. Méthodes phénétiques	51
7.3.1.1. Méthodes agglomératives	51
7.3.1.2. Méthode de parcimonie	52
7.3.2. Méthode d'analyses factorielles : analyse des correspondances multiples	52
7.4. Méthodes d'analyse de génétique des populations	53
7.4.1. Indice d'association entre les locus (I_A)	53
7.4.2. Tests de déséquilibre de liaison	54
III. RESULTATS	56
1. ESSAIS DE DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE	56
1.1. Essais de culture en milieu liquide	56
1.2. Essais de culture en milieu solide Wilkins-Chalgren modifié	57
2. ETUDE DE LA STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS NATURELLES DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	57
2.1. Etude de la structure génétique de <i>H. pylori</i> par des marqueurs « spécialistes »	58
2.1.1. Polymorphisme des gènes de l'uréase (<i>ureA-ureB</i>) et de la flagelline (<i>flaA</i>)	58
2.1.1.1. Polymorphisme des gènes de l'uréase (<i>ureA-ureB</i>) étudié par PCR-RFLP	58

<input type="checkbox"/> Profils observés	58
<input type="checkbox"/> Diversité génétique moyenne	59
<input type="checkbox"/> Diversité génotypique	59
<input type="checkbox"/> Distance génétique de Jaccard moyenne	60
2.1.1.2. Polymorphisme du gène de la flagelline (<i>flaA</i>) étudié par PCR-RFLP	60
<input type="checkbox"/> Profils observés	60
<input type="checkbox"/> Diversité génétique moyenne	61
<input type="checkbox"/> Diversité génotypique	61
<input type="checkbox"/> Distance génétique de Jaccard moyenne	61
2.1.1.3. Polymorphisme comparé des gènes <i>ureA-ureB</i> et <i>flaA</i>	61
<input type="checkbox"/> Diversité génétique moyenne	61
<input type="checkbox"/> Analyses phénétiques de classification	62
<input type="checkbox"/> Analyse de génétique des populations	62
2.1.2. Polymorphisme des gènes codant pour les facteurs de virulence <i>vacA</i> et <i>cagA</i> et la séquence d'insertion IS605	63
2.1.2.1. Polymorphisme du gène <i>vacA</i> révélé par PCR	63
2.1.2.2. Détection du gène <i>cagA</i> par PCR	65
2.1.2.3. Détection de la séquence d'insertion IS605 par PCR	65
2.1.2.4. Analyse comparée des gènes <i>vacA</i> et <i>cagA</i> et de la séquence d'insertion IS605	65
<input type="checkbox"/> Relation entre les génotypes <i>vacA</i> et la présence du gène <i>cagA</i> et de la séquence d'insertion IS605	65
<input type="checkbox"/> Diversité génétique moyenne	66
<input type="checkbox"/> Analyses phénétiques de classification	66
<input type="checkbox"/> Analyse de génétique des populations	66
2.1.3. Analyse comparée des données obtenues pour les facteurs « spécialistes » de <i>H. pylori</i>	67
<input type="checkbox"/> Diversité génétique moyenne	67
<input type="checkbox"/> Analyses phénétiques de classification	67
<input type="checkbox"/> Analyse de génétique des populations	68
2.2. Etude de la structure génétique de <i>H. pylori</i> par des marqueurs « généralistes »	68
2.2.1. Ribotypage	68
<input type="checkbox"/> Profils observés	69
<input type="checkbox"/> Diversité génétique moyenne	69
<input type="checkbox"/> Diversité génotypique	70
<input type="checkbox"/> Distance génétique de Jaccard moyenne	70
<input type="checkbox"/> Analyse phénétique de classification	70
<input type="checkbox"/> Analyses de génétique des populations	71
2.2.2. Amplification génique aléatoire (RAPD)	71
2.2.2.1. Choix des marqueurs RAPD	71
2.2.2.2. Analyses conduites sur les données générées par les 12 marqueurs RAPD	71
2.2.2.2.1. Variabilité génétique révélée par les 12 marqueurs RAPD	71
<input type="checkbox"/> Profils observés	71
<input type="checkbox"/> Diversité génétique moyenne	72
<input type="checkbox"/> Diversité génotypique	73
<input type="checkbox"/> Distance génétique de Jaccard moyenne	73
2.2.2.2.2. Méthodes de classification	73
2.2.2.3. Vérification expérimentale de l'indépendance des marqueurs RAPD : tests d'hybridations moléculaires	74
2.2.2.4. Analyses de génétique des populations	75
2.2.2.5. Analyses conduites sur les données générées par les marqueurs RAPD les moins variables	75
2.2.3. Analyse du polymorphisme enzymatique (MLEE)	76
2.2.3.1. Mise en œuvre de la technique MLEE	76
<input type="checkbox"/> Choix des systèmes enzymatiques étudiés	76
<input type="checkbox"/> Choix du système d'extraction	76
<input type="checkbox"/> Choix du système de migration	77
<input type="checkbox"/> Reproductibilité des profils électrophorétiques obtenus	77
<input type="checkbox"/> Allèles nuls	78

2.2.3.2. Variabilité génétique révélée par MLEE	78
2.2.3.2.1. MLEE en gel d'acrylamide-agarose sur 41 souches de <i>H. pylori</i>	78
<input type="checkbox"/> Profils observés	78
<input type="checkbox"/> Diversité génétique moyenne	79
<input type="checkbox"/> Diversité génotypique	79
<input type="checkbox"/> Distance génétique de Jaccard moyenne	80
2.2.3.2.2. MLEE en gel d'acétate de cellulose sur 87 souches de <i>H. pylori</i> et 4 souches « outgroup »	80
<input type="checkbox"/> Profils observés	80
<input type="checkbox"/> Diversité génétique moyenne	81
<input type="checkbox"/> Diversité génotypique	82
<input type="checkbox"/> Distance génétique de Jaccard moyenne	82
2.2.3.3. Méthodes de classification	82
2.2.3.4. Analyses de génétique des populations	83
2.2.3.5. Analyses conduites sur les données générées par les marqueurs MLEE les moins variables	83
2.2.4. Comparaison des données RAPD et des données MLEE	84
<input type="checkbox"/> Diversité génétique moyenne	84
<input type="checkbox"/> Analyses phénétiques de classification	84
<input type="checkbox"/> Analyses de génétique des populations	84
2.3. Comparaison de tous les marqueurs	84
2.3.1. Taille de génome analysée par les différents marqueurs	85
2.3.2. Polymorphisme mis en évidence par les différents marqueurs	85
2.3.2.1. Analyses phénétiques et de génétique des populations	85
2.3.2.2. Méthodes d'analyses factorielles : analyse des correspondances multiples	86
3. RECHERCHE D'UNE STRUCTURATION GENETIQUE EN FONCTION DE L'ORIGINE GEOGRAPHIQUE DES SOUCHES DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	87
<input type="checkbox"/> Diversité génétique	87
<input type="checkbox"/> Diversité génotypique et indice de diversité génotypique	88
<input type="checkbox"/> Distribution géographique des génotypes <i>vacA</i> et des statuts <i>cagA</i> et IS605	88
<input type="checkbox"/> Analyses phénétiques de classification	89
<input type="checkbox"/> Analyses factorielles des correspondances	90
<input type="checkbox"/> Analyses de génétique des populations	90
4. RECHERCHE D'UNE STRUCTURATION GENETIQUE EN FONCTION DE L'ORIGINE CLINIQUE DES SOUCHES DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	91
<input type="checkbox"/> Exploration des données cliniques	91
<input type="checkbox"/> Diversité génétique	91
<input type="checkbox"/> Diversité génotypique	92
<input type="checkbox"/> Distribution pathologique des génotypes <i>vacA</i> et des statuts <i>cagA</i> et IS605	92
<input type="checkbox"/> Analyses phénétiques de classification	92
<input type="checkbox"/> Analyses factorielles des correspondances	92
<input type="checkbox"/> Analyses de génétique des populations	93
5. ANALYSE COMPAREE DES STRUCTURES GENETIQUES DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i> ET D'AUTRES ESPECES DE MICROORGANISMES ETUDIES PAR RAPD ET MLEE	93
5.1. Comparaisons établies sur la base de la MLEE	94
5.1.1. Etendue de la diversité génétique de <i>H. pylori</i>	94
5.1.2. Impact de la recombinaison chez <i>H. pylori</i>	96
5.2. Comparaisons établies sur la base de la MLEE et de la RAPD	96
IV. DISCUSSION	100
1. POSITION TAXONOMIQUE DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	100
2. DIVERSITE GENETIQUE INTRASPECIFIQUE DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i> :	

ETENDUE, REPARTITION, ORIGINES	101
2.1. Diversité génétique des gènes <i>ureA-ureB</i> et <i>flaA</i>	101
2.2. Diversité génétique du gène <i>vacA</i>	103
2.3. Détection du gène <i>cagA</i>	105
2.4. Détection de la séquence d'insertion IS605	106
2.5. Diversité génétique révélée par ribotypage	107
2.6. Diversité génétique révélée par RAPD et par MLEE	108
3. STRUCTURE GENETIQUE DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	111
3.1. Mise en évidence de la structure recombinante de l'espèce <i>H. pylori</i>	111
3.2. Existence de groupes de « basse clonalité » au sein de l'espèce <i>H. pylori</i>	112
3.3. Hypothèse d'une structure clonale de l'espèce <i>H. pylori</i>	114
4. IMPLICATIONS DE LA STRUCTURE RECOMBINANTE DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i> DANS LE SUIVI EPIDEMIOLOGIQUE DES SOUCHES	115
CONCLUSION – PERSPECTIVES	117
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	120

ANNEXES

- Annexe 1 : Les 87 souches de *H. pylori* considérées dans l'étude
- Annexe 2 : Les 83 amorces décarnériques testées pour l'étude par RAPD
- Annexe 3 : Les 30 systèmes enzymatiques testés pour l'étude par MLEE
- Annexes 4a à 4e : Données brutes obtenues pour les différents marqueurs
- Annexe 5 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour les différents marqueurs
- Annexe 6: Représentation des différents génotypes *vacA*, *cagA* et IS605 en fonction de l'origine géographique des souches de *H. pylori*

ARTICLES

- Salaün L., Audibert C., Le Lay G., Burucoa C., Fauchère J.L. and Picard B., 1998.
Panmictic structure of *Helicobacter pylori* demonstrated by the comparative study of six genetic markers.
FEMS Microbiology Letters, 161 : 231-239.
- Audibert C., Janvier B., Grignon B., Salaün L., Burucoa C., Lecron J.C. and Fauchère J.L., 2000.
Correlation between IL-8 induction, *cagA* status and *vacA* genotypes in 153 french *Helicobacter pylori* isolates.
Research in Microbiology, 151 : 191-200.
- Salaün L., Picard B., Fauchère J.L., Oury B., Tibayrenc M. and Barnabé C.
Random amplified DNA and multilocus enzyme electrophoresis typing show far more genetic exchange in *Helicobacter pylori* than in *Escherichia coli* and some other microorganisms.
(en préparation).
- Ayraud S., Janvier B., Salaün L. and Fauchère J.L.
Variations of *Helicobacter pylori* clinical isolates during one year murine infection.
(soumis à *Journal of Clinical Microbiology*).

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'infection de l'estomac par *Helicobacter pylori* est une des maladies infectieuses les plus communes chez l'homme. Cette bactérie est retrouvée chez près de une personne sur deux de par le monde, avec une prévalence de 30 à 50% dans les pays industrialisés et de 80 à 90% dans les pays en développement. La découverte récente de *H. pylori*, puisque cultivé pour la première fois en 1982, a révolutionné les idées que l'on avait sur les pathologies digestives, et notamment sur l'ulcère gastrique, qui était considéré jusque-là comme la conséquence d'une augmentation de la production d'acide gastrique due au stress. Il est à présent démontré que *H. pylori* conduit à de nombreuses maladies inflammatoires gastroduodénales. Ainsi, tous les patients infectés développeront à un moment ou un autre une gastrite. Cette gastrite chronique peut évoluer vers les formes cliniques plus graves que sont l'ulcère et les cancers gastriques. A ce titre, *H. pylori* a été déclaré agent carcinogène de classe I par l'Organisation Mondiale de la Santé en 1994, devenant ainsi le premier agent bactérien reconnu comme facteur de risque dans l'apparition du cancer.

Trois grands modèles d'évolution bactérienne ont été proposés par Maynard Smith *et al.* (1993). Le premier est le modèle clonal strict dans lequel il n'y a pas d'échange génétique, qui évolue par mutations successives et dans lequel toute mutation avantageuse ou désavantageuse reste, de fait, limitée au clone bactérien lui-même. Le second est le modèle clonal-épidémique aux échanges génétiques également limités mais dans lequel certains clones, sélectivement avantageés, ont la propriété de se répandre très rapidement sur de grandes aires géographiques. Le troisième est le modèle panmictique dans lequel les échanges génétiques sont fréquents et aléatoires. Même si l'on rencontre le plus souvent des situations intermédiaires à ces trois modèles alternatifs, il est toujours primordial de connaître le niveau d'échanges génétiques d'une espèce bactérienne pour mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie elle-même. Le type d'évolution aura également des conséquences sur le suivi épidémiologique des clones, en particulier pour les bactéries responsables d'infections nosocomiales. De plus, connaître le niveau d'échanges génétiques permet de mieux comprendre les mécanismes d'acquisition et surtout de dispersion des gènes responsables de la résistance aux antibiotiques.

L'un des traits les plus saillants de l'espèce *H. pylori*, est sa très grande diversité génétique sur tous les continents. Il apparaît que chaque individu infecté héberge une souche qui lui est propre. La signification biologique d'un tel polymorphisme demeure énigmatique. Il pourrait être un élément déterminant de l'adaptation de la bactérie à sa niche écologique et de la persistance de l'infection tout au long de la vie de l'hôte. Cet intense polymorphisme génétique

pourrait également expliquer la variété et les différents degrés de sévérité des pathologies observées. Bien que la recombinaison ait été montrée chez *H. pylori* et que l'espèce soit classiquement considérée comme panmictique (Achtman *et al.*, 1999) (Go *et al.*, 1996) (Salaün *et al.*, 1998) (Suerbaum *et al.*, 1998), certains auteurs parlent de transmission clonale (Han *et al.*, 2000). En outre, le positionnement de l'espèce par rapport aux modèles de Maynard Smith *et al.* n'a jamais été exploré. Il est donc nécessaire d'examiner en détail cette variabilité génétique, de faire le lien avec les trois modèles précédemment cités et surtout d'en tirer toutes les conséquences épidémiologiques.

La génétique des populations, en particulier par l'analyse du déséquilibre de liaison entre locus, permet en grande partie de répondre à ces questions. Un déséquilibre de liaison fort est un signe de clonalité alors que l'absence de déséquilibre sera un signe de panmixie. En dehors de tout processus sélectif, la clonalité tendra à limiter la propagation de gènes alors que la recombinaison la favorisera. Cependant, l'observation du seul déséquilibre de liaison ne peut pas nous renseigner complètement sur le modèle évolutif de l'espèce. En effet, un échantillonnage sur deux zones géographiques éloignées peut montrer un déséquilibre de liaison important alors que celui-ci disparaît quand on considère les deux zones séparément. Il est donc également indispensable de faire aussi une analyse des groupes génétiques en présence (structuration génétique) en utilisant d'une part les outils que nous donnent la phylogénie (analyse des distances génétiques ou méthodes de parcimonie), et d'autre part les techniques statistiques d'analyses multivariées.

Cette connaissance génétique de l'espèce permettra de choisir la stratégie à adopter pour le suivi épidémiologique des souches et de juger de la pertinence de l'utilisation de tel ou tel marqueur comme facteur prédictif de la pathologie. Ceci permettra également d'estimer la part respective de l'hôte et du pathogène dans la génération de la pathologie, de mieux appréhender les interactions hôte-pathogène et de mieux comprendre l'évolution de la structure génétique de ce microorganisme. Toutes ces informations sont nécessaires alors qu'en France aujourd'hui de l'ordre de 14% des souches sont résistantes aux antibiotiques (Mégraud, 2000), qu'il est question de la mise au point de vaccin dirigé contre *H. pylori* (Eaton *et al.*, 1998), et que l'éradication de *H. pylori* par un traitement antibiotique chez les patients infectés peut conduire à l'apparition d'autres pathologies (reflux gastro-oesophagien) (Labenz *et al.*, 1997).

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. HISTOIRE DE LA DECOUVERTE DE *HELICOBACTER PYLORI*

1.1. Premières observations de bactéries spiralées dans l'estomac

Dès la fin du XIX^{ème} siècle, Bizzozero (Bizzozero, 1893) et Salomon (Salomon, 1896) décrivent la présence de bactéries spiralées dans l'estomac de chiens, de chats et moins souvent de chatons. Krienitz (Krienitz, 1906) a été le premier à observer des bactéries spiralées dans l'estomac humain. Dans les années 1960 et 1970, surestimant leur capacité à cultiver des bactéries à pousse fastidieuse, les microbiologistes conclurent que les cultures négatives obtenues à partir d'échantillons gastriques signifiaient que l'estomac était stérile. De fait, les études précédentes furent ignorées. Néanmoins, la présence de bactéries incurvées continuait à être constatée par certains (Marshall, 1996).

1.2. L'uréase gastrique

Par ailleurs, dans les années 1920, on constatait que des quantités importantes d'ammoniac étaient présentes dans les vomissures de sujets urémiques. On supposait que cette présence d'ammoniac était due à une uréase gastrique destinée à neutraliser l'acidité gastrique.

En 1959, Lieber et Lefevre (Lieber & LeFevre, 1959) ont noté la disparition de l'uréase gastrique après administration de tétracycline indiquant que cette enzyme était d'origine bactérienne. Ce n'est qu'en 1968 que l'origine bactérienne de l'uréase a été définitivement prouvée, puisque absente chez des animaux axéniques (Delluva, Markley & Davies, 1968).

1.3. La découverte de *H. pylori*

La découverte de *H. pylori*, ou plus exactement le premier succès dans la culture de ce microorganisme, a été réalisée en avril 1982 par Warren et Marshall (Warren & Marshall, 1983). Les cultures étaient réalisées sur boîtes de Petri et incubées dans des conditions permettant la pousse des *Campylobacter*. A la faveur d'un long week-end, les boîtes de culture, habituellement lues au bout de 3 jours, ne furent lues qu'au bout de 5 jours : après ce laps de temps de nombreuses colonies étaient visibles (Marshall *et al.*, 1984).

L'examen en microscopie électronique des biopsies et des cultures a montré que cette bactérie appartenait au moins à une nouvelle espèce et peut être à un nouveau genre car elle

avait plusieurs flagelles engainés à la différence des *Campylobacter* entériques qui n'avaient qu'un seul flagelle non-engainé.

Si l'association de la présence de *H. pylori* avec des signes cliniques d'affection gastrique n'était pas concluante, la corrélation avec l'anatomopathologie était remarquable ; une corrélation peu différente de 100% était trouvée entre la gastrite et la présence de la bactérie ($p \leq 10^{-4}$). Ce nouveau *Campylobacter* était donc associé à la gastrite et par conséquent à la maladie ulcéreuse peptique (Marshall & Warren, 1984). La prescription empirique des sels de bismuth dans le traitement des ulcères dès la fin du 18^{ème} siècle en Europe se trouvait donc justifiée par l'action anti-microbienne de cet élément.

Par ailleurs, des travaux sur une grande série de malades (Marshall *et al.*, 1985b) ainsi que l'inoculation volontaire de cette bactérie (Marshall *et al.*, 1985a) ont permis de conforter l'idée que *H. pylori* était la cause de la maladie ulcéreuse, probablement de la dyspepsie non-ulcéreuse et peut-être aussi du cancer gastrique.

D'abord dénommé *Campylobacter pyloridis* (Marshall *et al.*, 1984), ce nom a été corrigé en *Campylobacter pylori* (Marshall & Goodwin, 1987) avant que l'espèce ne soit incluse dans un nouveau genre (Goodwin *et al.*, 1989). Ce genre a été créé en raison de la constitution des flagelles de *Helicobacter* différentes de la constitution des flagelles de *Campylobacter* et des composants cellulaires particuliers.

Depuis la première culture de *H. pylori* en 1982, le nombre des communications concernant cette bactérie a augmenté de manière exponentielle. Ainsi, une étude de 1998 (Galvez *et al.*, 1998) a montré que près de 7,5% des publications du domaine de la recherche en microbiologie concernait le genre *Helicobacter* et que le taux de publications sur *Helicobacter* avait triplé pendant cette période.

2. BACTERIOLOGIE ET ECOLOGIE DES BACTERIES DU GENRE *HELICOBACTER*

2.1. Position taxonomique des bactéries du genre *Helicobacter*

Les bactéries du genre *Helicobacter* sont classées parmi les protéobactéries (« purple non-sulfur bacteria »), une division d'eubactéries à Gram négatif qui inclut un grand nombre d'espèces variées. Les *Helicobacter* appartiennent à la subdivision epsilon (ϵ) des protéobactéries, subdivision à laquelle appartiennent également les *Campylobacter*, ainsi que les *Arcobacter* et les *Wolinella*.

Depuis la création du genre *Helicobacter*, avec ses deux premiers représentants *H. pylori* et *H. mustelae* (Goodwin *et al.*, 1989), de nouvelles espèces ont été décrites. A ce jour, le genre *Helicobacter* compte 28 espèces, pour lesquelles la séquence partielle de l'ARNr 16S a été déposée dans GenBank et un nom a été adopté (Tableau I.1). Ces bactéries ont été isolées chez différentes espèces de mammifères (primates, félins, rongeurs...) et chez des oiseaux à partir de sites gastriques principalement, mais aussi à partir de sites hépatiques et intestinaux.

Tableau I.1 : Les 28 espèces de *Helicobacter* décrites à ce jour

Espèce	Hôte	Localisation	Référence
<i>Helicobacter acinonychis</i> ^a	guépard	estomac	(Eaton <i>et al.</i> , 1993)
<i>Helicobacter aurati</i>	hamster	estomac	(Patterson <i>et al.</i> , 2000)
<i>Helicobacter bilis</i>	souris	bile, foie, intestin	(Fox <i>et al.</i> , 1995)
<i>Helicobacter bizzozeronii</i>	chien	estomac	(Hanninen <i>et al.</i> , 1996)
<i>Helicobacter bovis</i>	bœuf	estomac	(De Groote <i>et al.</i> , 1999)
<i>Helicobacter canadensis</i>	homme		(Fox <i>et al.</i> , 2000)
<i>Helicobacter canis</i>	chien	intestin	(Stanley <i>et al.</i> , 1993)
<i>Helicobacter cholecystus</i>	hamster	vessie	(Franklin <i>et al.</i> , 1996)
<i>Helicobacter cinaedi</i> ^b	homme		(Vandamme <i>et al.</i> , 1991)
<i>Helicobacter felis</i>	chat, chien	estomac	(Paster <i>et al.</i> , 1991)
<i>Helicobacter fennelliae</i>	homme		(Vandamme <i>et al.</i> , 1991)
<i>Helicobacter helmannii</i> ^c	homme, ...	estomac	(McNulty <i>et al.</i> , 1989)
<i>Helicobacter hepaticus</i>	souris	foie, intestin	(Fox <i>et al.</i> , 1994)
<i>Helicobacter mesocricetorum</i>	hamster		(Simmons <i>et al.</i> , 2000)
<i>Helicobacter muridarum</i>	souris, rat	intestin	(Lee <i>et al.</i> , 1992b)
<i>Helicobacter mustelae</i>	furet	estomac	(Fox <i>et al.</i> , 1988), (Fox <i>et al.</i> , 1989)
<i>Helicobacter nemestrinae</i>	macaque	estomac	(Bronsdon <i>et al.</i> , 1991)
<i>Helicobacter pametensis</i>	oiseau, porc		(Dewhirst <i>et al.</i> , 1994)
<i>Helicobacter pullorum</i>	homme, volaille		(Stanley <i>et al.</i> , 1994)
<i>Helicobacter pylori</i>	homme	estomac	(Warren & Marshall, 1983)
<i>Helicobacter rappini</i> ^d	mouton	estomac	(Paster <i>et al.</i> , 1991)
<i>Helicobacter rodentium</i>	souris		(Shen <i>et al.</i> , 1997)
<i>Helicobacter salomonis</i>	chien	estomac	(Jalava <i>et al.</i> , 1997)
<i>Helicobacter suis</i>	porc	estomac	(Mendes <i>et al.</i> , 1990), (De Groote <i>et al.</i> , 2000)
<i>Helicobacter suncus</i>	musaraigne	estomac	(Goto <i>et al.</i> , 1998)
<i>Helicobacter trogonum</i>	rat	intestin	(Mendes <i>et al.</i> , 1996)
<i>Helicobacter typhlonicus</i>	souris	intestin	(Franklin <i>et al.</i> , 1999)
<i>Helicobacter ulmiensis</i>	souris		(Borh <i>et al.</i> , 1998) (non publié)

(d'après <http://www.ncbi.nlm.gov:80/htbin-post/Taxonomy/> où sont déposées les séquences de l'ARN ribosomique 16S des différentes espèces, et d'après <http://www.bacterio.cict.fr/h/helicobacter.html>)

^a *Helicobacter acinonychis* : nouveau nom pour *Helicobacter acinonyx* (Truper & De Clari, 1997)

^b *Helicobacter westmeadi* (Trivett-More *et al.*, 1997) a été reclassé dans l'espèce *Helicobacter cinaedi* (Vandamme *et al.*, 2000)

^c *Helicobacter helmannii* : nouveau nom pour *Gastrospirillum hominis*

^d *Helicobacter rappini* ou « *Flexispira rappini* » : le nom *F. rappini* est un nom provisoire ; les souches de *F. rappini* représenteraient au moins 10 taxons, et actuellement aucune caractéristique phénotypique ou génotypique ne permet l'utilisation définitive du nom « *Helicobacter rappini* » (Dewhirst *et al.*, 2000)

Des arbres phylogénétiques des bactéries du genre *Helicobacter* ont été construits sur la base des homologues de séquence de l'ARNr 16S (Figure I.1). Les bactéries du genre *Helicobacter* partagent au moins 90% de séquences communes avec *H. pylori* (Simmons *et al.*, 2000).

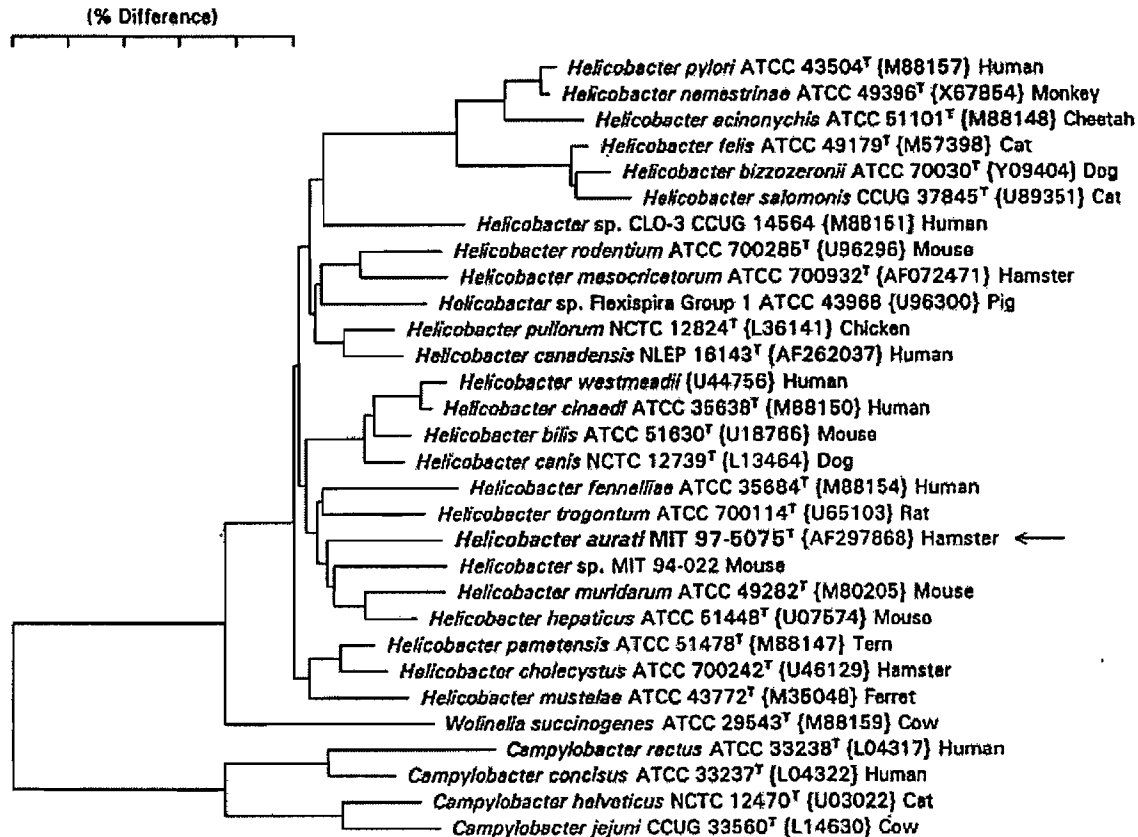


Figure I.1 : Arbre de Neighbor-Joining des bactéries du genre *Helicobacter* et de genres voisins (*Campylobacter* et *Wolinella*) basé sur des comparaisons de séquence de l'ARN ribosomique 16S. L'échelle indique une différence de 5% dans la séquence nucléotidique (Patterson *et al.*, 2000).

2.2. Quelques exemples d'espèces du genre *Helicobacter*

❖ Exemples d'*Helicobacter* gastriques

Parmi les bactéries du genre *Helicobacter*, outre *H. pylori*, seules deux espèces sont capables d'infecter l'estomac chez l'homme : il s'agit de *H. helmannii* (« *Gastrospirillum hominis* ») (McNulty *et al.*, 1989) et de *H. felis* (Paster *et al.*, 1991). *H. helmannii* est la bactérie gastrique la plus largement distribuée car elle franchit facilement la barrière d'espèce. Elle a été trouvée chez le chat, le chien, le singe, le babouin, le porc et le guépard. Elle serait transmise à l'homme par un animal de compagnie. *H. felis*, isolée chez le chat et le chien, pourrait

également être transmise à l'homme. Comme *H. pylori*, ces deux espèces sont capables de provoquer une gastrite chronique active, même si les sujets sont asymptomatiques (Lee, 1996).

H. mustelae infecte l'estomac du furet et cette espèce n'a jamais été trouvée chez un autre hôte. L'infection à *H. mustelae* est souvent rencontrée dans les élevages de furets aux Etats-Unis, mais beaucoup plus rarement dans les autres pays (Lee, 1996).

❖ Exemples d'*Helicobacter* non gastriques

H. hepaticus est une bactérie rencontrée dans l'intestin des rongeurs (Fox *et al.*, 1994). Elle est associée à une tumeur hépatique chez la souris (Ward *et al.*, 1994).

H. muridarum colonise également l'intestin des rongeurs (Lee *et al.*, 1992b), mais il arrive parfois qu'elle colonise l'estomac (Lee *et al.*, 1992a).

2.3. Morphologie des *Helicobacter*

Les bactéries du genre *Helicobacter* présentent une grande diversité morphologique. La morphologie spiralée de *H. pylori* ressemble à celle des bactéries du genre *Campylobacter*, ce qui explique que *H. pylori* ait été inclus dans ce genre au moment de sa découverte (Warren & Marshall, 1983). Cette morphologie spiralée est partagée par toutes les espèces du genre *Helicobacter*, à l'exception de *H. mustelae*.

Les *Helicobacter* ont une taille de 1,5 μm , pour *H. suis* (Mendes *et al.*, 1990), à 10 μm , pour *H. bizzozeronii* (Hanninen *et al.*, 1996). La taille de *H. pylori* est comprise entre 2 et 4 μm .

Tous les *Helicobacter* possèdent des flagelles. Ceux-ci assurent la motilité des bactéries, et constituent une caractéristique essentielle pour une colonisation efficace de la niche écologique. Le nombre (de 1 à 20, suivant les espèces) et la disposition (unipolaire, bipolaire ou pérित्रiche) des flagelles est propre à chaque espèce du genre *Helicobacter* (Owen, 1998). A la différence des *Campylobacter* entériques qui ne présentent qu'un seul flagelle non-engainé, une des caractéristiques communes des espèces du genre *Helicobacter* est la présence de un ou plusieurs flagelles engainés, excepté pour *H. mustelae* qui possède une configuration flagellaire différente (O'Rourke, Lee & Fox, 1992). Cette gaine flagellaire est en continu avec la paroi bactérienne. Celle-ci protégerait les filaments de flagelline de l'environnement, notamment des agressions acides dans le cas des *Helicobacter* gastriques (Lee, 1996). *H. pylori* possède de 4 à 8 flagelles unipolaires engainés, d'un diamètre d'environ 30 nm et de 12 à 15 nm de longueur (Owen, 1998) (Figure I.2).



Figure I.2 : Observation en microscopie électronique à transmission de *Helicobacter pylori* (d'après (Lee, 1996)).

Note : Cette coloration négative montre l'arrangement polaire des flagelles (barre : 0,5 μ m).

Dans les cultures anciennes, les *Helicobacter* passent de la forme bacillaire spiralée à une forme coccoïde (Figure I.3). Cette caractéristique est partagée par la plupart des bactéries spiralées, telles que *Borrelia*, *Campylobacter*, *Spirochaeta* (Kreig & Holt, 1984). Des formes coccoïdes de *H. pylori* ont été également retrouvées dans l'estomac humain (Chan *et al.*, 1994). Il a été suggéré que les formes coccoïdes seraient viables mais non cultivables (Bode, Mauch & Malfertheiner, 1993b) (Shahamat *et al.*, 1993). Cependant, rien n'indique que ces cellules soient capables de se diviser ou de retrouver une forme spiralée. De fait, leur rôle dans l'environnement et dans la transmission de l'infection à *H. pylori* demeure incertain (Kelly, 1998). En outre, l'absence d'un potentiel de membrane mesurable dans les cellules coccoïdes indique que ces cellules sont mortes (Kusters *et al.*, 1997).

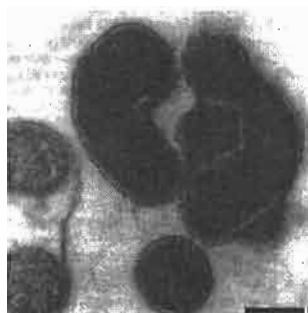


Figure I.3 : Forme coccoïde de *Helicobacter pylori* (d'après (Lee, 1996))

Note : Observation en microscopie électronique à transmission (coloration négative) (barre : 0,5 μ m).

Les bactéries du genre *Helicobacter* ne forment pas de spores.

2.4. Physiologie de *H. pylori*

Le glucose semble être le seul carbohydrate utilisé par *H. pylori*. Celui-ci peut être métabolisé à la fois par voie oxydative et par fermentation, bien que *H. pylori* soit un microorganisme microaérophile obligatoire (Mendz, Hazell & Burns, 1993). Le métabolisme glycolyse-néoglucogénèse constitue la principale source de production d'énergie et est le point de départ de nombreuses voies de biosynthèse. La biosynthèse des peptidoglycanes, des phospholipides, des acides aminés aromatiques, des acides gras et des cofacteurs est réalisée à partir de l'acetyl-CoA ou des métabolites intermédiaires de la glycolyse (Tomb *et al.*, 1997). *H. pylori* possède les enzymes de la voie de Entner-Doudoroff, une voie métabolique primitive alternative à la glycolyse. Le caractère primitif de cette voie métabolique suggère que *H. pylori* est une bactérie très ancienne qui a évolué avec l'homme au cours de son histoire (Mendz, Hazell & Burns, 1994a). Cette voie métabolique semble constitutive chez *H. pylori* (Marais *et al.*, 1999).

Le métabolisme du pyruvate reflète le caractère microaérophile de *H. pylori*. En effet, celui-ci présente des voies de fermentation mixtes et une réduction du fumarate, caractéristiques rencontrées chez les bactéries anaérobies (Tomb *et al.*, 1997) (Lee, 1996).

Le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs) est incomplet.

L'analyse des voies de dégradation, des systèmes de captation et des voies de biosynthèse des purines, des pyrimidines et de l'hème, suggère que *H. pylori* utilise de nombreux substrats, tels que l'urée, l'ammoniac, l'alanine, la sérine ou la glutamine, comme source d'azote (Tomb *et al.*, 1997). *H. pylori* utiliserait l'excès d'azote par un cycle de l'urée où l'uréase jouerait un rôle majeur pour éliminer l'azote de la cellule sous forme d'ion ammonium NH_4^+ . Un cycle de l'azote est caractéristique des parasites eucaryotes et non des bactéries (Mendz & Hazell, 1994).

En outre, la présence de voies particulières pour la biosynthèse des purines témoignerait d'un passé intracellulaire de la bactérie, comme *Mycobacterium leprae* (Mendz *et al.*, 1994b).

Toutes ces contradictions métaboliques montrent que *H. pylori* est une bactérie inhabituelle, qui s'est adaptée à une niche particulière durant son évolution et qui a acquis une variété d'activités métaboliques différentes des pathogènes bactériens habituels (Lee, 1996).

2.5. Ecologie de *H. pylori*

H. pylori colonise l'estomac chez l'homme. La muqueuse gastrique sécrète de l'acide chlorhydrique pour créer un milieu très acide – le pH est maintenu en dessous de 2 – qui facilite le processus de digestion. De plus, cette acidité gastrique crée une barrière protégeant

l'estomac des agents pathogènes microbiens. En effet, outre *H. pylori* qui s'est adaptée à cette niche écologique très hostile, seules s'implantent parfois de façon temporaire des espèces telles que *H. helmantii* (McNulty *et al.*, 1989).

Une uréase externe rend possible la colonisation de cet environnement par *H. pylori*. Celle-ci a la propriété d'avoir deux pH optimaux, dont un à pH acide. Au moment où la bactérie pénètre dans le milieu acide de la lumière gastrique, l'uréase externe hydrolyse les petites quantités d'urée qui diffusent de la paroi bactérienne. L'ammoniac libéré a pour effet de neutraliser l'environnement local de la bactérie, lui permettant ainsi de survivre (Ferrero & Lee, 1991). L'uréase est indispensable à la colonisation de la muqueuse gastrique : en effet, des mutants uréase négative de *H. pylori* sont incapables de coloniser l'estomac (Eaton *et al.*, 1991). En revanche, l'uréase ne semble pas nécessaire à la persistance de *H. pylori* au niveau de la muqueuse. En effet, si l'administration d'inhibiteurs d'uréase protège contre la colonisation, elle n'a aucun effet sur une infection déjà établie (Ferrero & Lee, 1991).

Un mucus tapisse les cellules épithéliales gastriques. Il constitue une barrière nécessaire au maintien de l'intégrité de la muqueuse, en l'isolant du contenu luminal riche en agents érosifs tels que la pepsine, et en la protégeant de l'invasion par des microorganismes pathogènes. *H. pylori* se déplace facilement dans ce milieu visqueux grâce à ses flagelles. La forme spiralée est accentuée quand les bactéries sont dans le mucus gastrique, et plus particulièrement quand elles se déplacent. Une fois arrivé dans l'estomac, *H. pylori* échappe à l'acidité gastrique grâce à cette mobilité particulière qui lui permet de se déplacer de la lumière gastrique vers les cellules épithéliales au travers de la couche de mucus (Lee, 1996). Des expériences utilisant des mutants non mobiles ont permis de confirmer le rôle des flagelles et de la mobilité dans la colonisation (Eaton, Morgan & Krakowa, 1992).

H. pylori présenterait une affinité préférentielle pour la muqueuse antrale (Figure I.4).

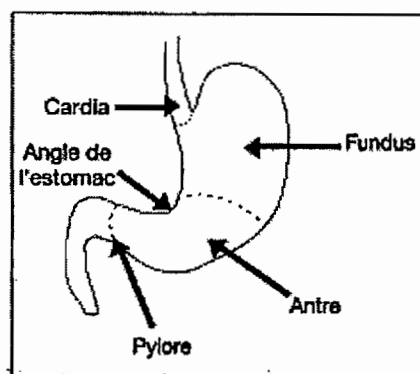


Figure I.4 : Schéma de l'estomac humain.

Cette affinité pour la muqueuse antrale s'expliquerait par le fait que les adhésines, provenant de la membrane bactérienne externe, reconnaissent les glycolipides des cellules cibles comme le lactosylcéramide sulfate et des gangliosides (Liau *et al.*, 1992). Or ces glycolipides seraient en quantité plus importante sur l'épithélium antral que sur l'épithélium fundique.

3. EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION A *HELICOBACTER PYLORI*

3.1. Prévalence de l'infection à *H. pylori*

L'infection à *H. pylori* est une des infections bactériennes les plus fréquentes dans le monde. La séroprévalence de l'infection a été déterminée dans la plupart des pays du monde (Pounder & Ng, 1995) (Mégraud *et al.*, 1995) (Bardhan, 1997). D'une façon générale, il apparaît que l'infection est acquise précocement pendant l'enfance, et qu'il y a un plus grand nombre d'individus infectés dans les pays en développement (pays du Sud, Europe de l'Est) (Figure 1.5).

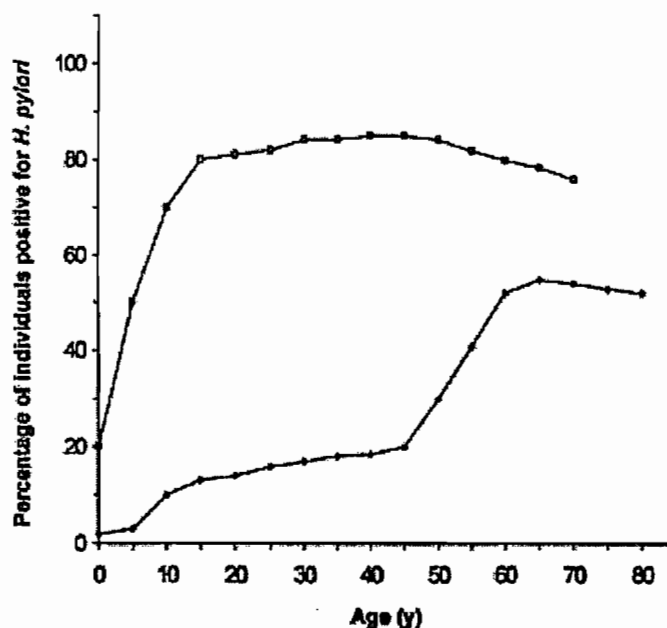


Figure 1.5 : Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* dans les pays industrialisés (courbe du bas : ◆) (Mégraud *et al.*, 1989) et dans les pays en développement (courbe du haut : □) (Klein *et al.*, 1994) en fonction de l'âge de la population (d'après Bardhan (1997)).

Dans les pays en développement, une majorité d'enfants est infectée tôt pendant l'enfance et l'infection chronique perdure pendant la vie d'adulte. L'infection touche 80 à 90% de la population globale.

Dans les pays industrialisés, une minorité d'enfants est infectée et la prévalence de l'infection augmente proportionnellement pendant la vie d'adulte. L'infection touche 20% de la population de moins de 40 ans et 50% de la population de plus de 60 ans (Marshall, 1994) (Parsonnet, 1995).

3.2. Incidence de l'infection à *H. pylori*

Bien que l'histoire naturelle de l'infection à *H. pylori* ne soit pas bien connue, les résultats des études sérologiques ou thérapeutiques suggèrent que, une fois l'infection acquise, elle persiste pendant des années et, possiblement, tout au long de la vie si elle n'est pas traitée.

La primo infection à *H. pylori* est le plus souvent asymptomatique ou faiblement symptomatique. De fait, le moment de l'acquisition de l'infection ne peut être déterminé que de façon indirecte à partir des données épidémiologiques (Bardhan, 1997).

Le taux d'incidence de l'infection à *H. pylori* dans les pays industrialisés est estimé entre 0,5% et 1%. Celui-ci est supérieur dans les pays en développement, avec par exemple un taux d'incidence de 5% en Thaïlande (Bardhan, 1997).

Il apparaît une différence de prévalence de l'infection à *H. pylori* dans les populations de même répartition d'âge, mais nées à des époques différentes. Ceci traduit un niveau d'exposition différent de l'hôte vis à vis de cet agent pathogène au cours du temps, probablement du à l'amélioration des conditions sanitaires. Un argument majeur en faveur de cet « effet cohorte » est l'acquisition de l'infection principalement pendant l'enfance, comme montré par de nombreuses études (Parsonnet, 1995).

Concernant les cas de réinfection après traitement, il est difficile de faire la part entre les réelles réinfections et les échecs du traitement. En effet, même en comparant par des outils moléculaires les souches avant et après traitement, et si un même génotype est retrouvé, il est difficile de savoir s'il s'agit d'une rechute de l'infection originelle ou d'une réinfection par la même souche (Broutet & Mégraud, 1996).

3.3. Facteurs de risque de l'acquisition de l'infection à *H. pylori*

Le facteur de risque le mieux établi est le bas niveau socio-économique, et ce, quel que soit le pays considéré (Graham *et al.*, 1991) (Bardhan, 1997). Un environnement surpeuplé, les conditions de vie dans l'enfance, la vie en communauté (crèche, école), les familles où un enfant

est infecté, ou, plus généralement, la promiscuité, constituent des facteurs de risque pour l'acquisition de l'infection à *H. pylori*. Les facteurs de risque chez l'adulte n'ont pratiquement pas été identifiés, au contraire de ceux de l'enfant.

Une plus forte prévalence de l'infection à *H. pylori* est retrouvée dans les populations à faible niveau d'éducation et de revenu : cette corrélation s'explique par le fait qu'un bas niveau socio-économique est associé à des conditions sanitaires précaires (facteurs confondants de l'analyse). Des tentatives de corrélation entre l'origine ethnique et la prévalence de l'infection se heurtent aux mêmes facteurs confondants, et, de fait, il paraît difficile d'attribuer une plus forte prévalence à une cause génétique.

Plusieurs études, validées sur les plans épidémiologiques et statistiques, ont trouvé une association entre l'infection à *H. pylori* et le sexe masculin. Toutefois, d'autres études sont nécessaires afin d'expliquer et de confirmer cette observation (Broutet & Mégraud, 1996) (plus forte proportion d'hommes en consultation dans les services de gastroentérologie ? vie en communauté plus fréquente chez les enfants de sexe masculin ?).

Aucune association n'a été trouvée entre l'infection à *H. pylori* et le groupe sanguin de l'hôte, qu'il s'agisse du groupe ABO (Hook-Nikanne, Sistonen & Kosunen, 1990) (Mentis *et al.*, 1991) ou du groupe Lewis (Clyne & Drumm, 1997) (Taylor *et al.*, 1998) (Heneghan, McCarthy & Moran, 2000).

L'influence des facteurs génétiques de l'hôte dans l'acquisition de l'infection à *H. pylori* a été appréhendée grâce à une étude réalisée sur des jumeaux monozygotes et dizygotes élevés ensemble ou séparément. Les auteurs de cette étude concluent à un effet génétique de l'hôte dans l'acquisition de l'infection du fait des plus grandes similarités observées entre les paires de jumeaux monozygotes. De plus, le fait de partager le même environnement éducationnel contribue à une tendance familiale pour l'acquisition de l'infection à *H. pylori* (Malaty *et al.*, 1994) (Malaty *et al.*, 1998).

L'influence des modes de vie et habits de l'hôte dans l'acquisition de l'infection à *H. pylori* a été recherchée. Il apparaît que la consommation d'alcool ou de tabac n'influe pas sur la prévalence de l'infection (Broutet & Mégraud, 1996).

3.4. Transmission de *H. pylori*

3.4.1. Réservoirs et sources d'infection

- ❖ Réservoir animal

Les modes de transmission de *H. pylori* restent mal connus et aucun réservoir non humain n'a été identifié.

Des études ont suggéré que *H. pylori* pourrait être transmis à l'homme par les animaux. Ainsi, une plus forte séroprévalence de l'infection a été rencontrée chez les personnes travaillant dans les abattoirs (Vaira *et al.*, 1988) (Husson *et al.*, 1991). Toutefois, il est vraisemblable que ce résultat est lié au niveau socio-économique plus faible que chez les témoins (personnels de bureau de la même entreprise) (Vincent, 1996).

H. pylori a été isolé chez des chats domestiques, tous provenant du même élevage, mais n'a pu être isolé chez les chats provenant des trois autres élevages considérés (Fox, 1995). En outre, les chats sauvages n'hébergeant pas la bactérie, il semble que la transmission de *H. pylori* se fasse plutôt de l'homme vers le chat (El-Zaatari *et al.*, 1997).

Par ailleurs, il a été proposé que les chiens de berger et les moutons pourraient être impliqués dans la transmission de l'infection à *H. pylori* aux bergers (Goodman *et al.*, 1996) (Dore *et al.*, 1999). Toutefois, les agneaux sont séronégatifs et la séropositivité des moutons adultes pourrait être due à une réaction croisée entre des bactéries possédant une activité uréase présentes dans le rumen des moutons (Dore *et al.*, 1999). Là aussi, la forte prévalence de l'infection à *H. pylori* chez les bergers serait plus vraisemblablement liée au niveau socio-économique.

La mouche (*Musca domestica*) a été proposée comme réservoir ou vecteur de *H. pylori* à la suite d'expériences menées en laboratoire (Grubel *et al.*, 1998). Ce mode de transmission dans les conditions naturelles est à présent réfuté (Osato *et al.*, 1998).

L'absence de réservoir non-humain plausible suggère donc fortement que le mode de transmission de *H. pylori* est inter-humain.

❖ Sources environnementales

La présence de *H. pylori* a été détectée par PCR dans des eaux d'épuration (Hulten *et al.*, 1996) (Hulten *et al.*, 1998), dans des eaux potables (puits, source) ou non potables (rivière, étang), ainsi que dans le sol (Sasaki *et al.*, 1999). En outre, la présence de *H. pylori* a été révélée dans des eaux de surface grâce à un anticorps couplé à un marqueur fluorescent (CTC : cyanoditoyl tetrazolium chloride) révélant l'activité d'enzymes du métabolisme respiratoire. Toutefois, la réduction du CTC ne permet pas de conclure de façon définitive à la présence de formes viables et infectieuses de *H. pylori* (Hegarty, Dowd & Baker, 1999). Ainsi, même s'il apparaît que *H. pylori* puisse persister dans un environnement pauvre en nutriments (West, Millar & Tompkins, 1992) (Shahamat *et al.*, 1993), à ce jour, aucune étude n'a trouvé de *H. pylori* cultivables dans l'environnement.

3.4.2. Transmissions inter-humaines

❖ Transmission féco-orale

La présence de *H. pylori* dans l'environnement serait d'origine fécale. En effet, *H. pylori* est détecté par PCR dans les selles (Saborio *et al.*, 1994), et est parfois même cultivé (Thomas *et al.*, 1992) (Kelly *et al.*, 1994).

❖ Transmission oro-orale

H. pylori peut atteindre la cavité orale par régurgitation du liquide gastrique. La cavité orale peut alors devenir un réservoir, et la salive un moyen de transmission de la bactérie (Bardhan, 1997). *H. pylori* a pu être isolée à partir de la salive et de la plaque dentaire (Majumbar *et al.*, 1990). Cependant la salive ne semble pas être un facteur de risque dans la transmission de *H. pylori* (Lin *et al.*, 1998), et à ce jour, seule la transmission par du liquide gastrique infecté a pu être mise en évidence (Vincent, 1996).

4. POUVOIR PATHOGENE DE *HELICOBACTER PYLORI*

4.1. Pathologies engendrées par *H. pylori*

H. pylori est impliqué dans la genèse de nombreuses maladies inflammatoires gastroduodénales. Cette bactérie est l'agent étiologique des gastrites chroniques antrales, qui, au cours du temps, pourront évoluer vers des formes pathologiques plus graves telles que l'ulcère gastrique ou l'ulcère duodénal, l'atrophie gastrique, précurseur des adénocarcinomes, ou le lymphome du MALT (Figure I.6).

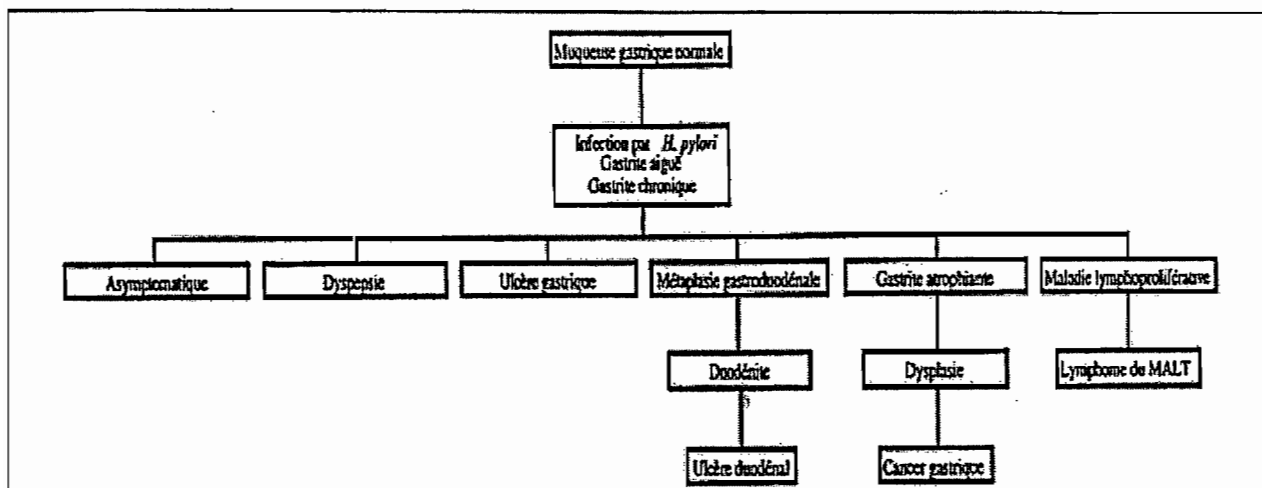


Figure I.6 : Histoire naturelle de l'infection à *H. pylori* (d'après Mégraud (1994))

4.1.1. Gastrite

❖ Gastrite aiguë

La forme aiguë de la gastrite est asymptomatique chez l'adulte, mais pourrait être symptomatique chez l'enfant. Elle est caractérisée par une infiltration de mono- et polynucléaires neutrophiles, une diminution de la sécrétion gastrique acide et une légère augmentation de la gastrine. La gastrite aiguë peut disparaître si la bactérie n'est pas retenue par la muqueuse gastrique ; elle évolue le plus souvent vers la gastrite chronique (Sobhani, Vallot & Mignon, 1995) (Sevin, Soussy & Tankovic, 1998).

❖ Gastrite chronique

La gastrite chronique s'installe en quelques semaines. Elle est caractérisée, au plan histologique, par une infiltration essentiellement mononucléée intéressant l'épithélium de revêtement de la muqueuse gastrique. Son incidence augmente avec l'âge, pour atteindre jusqu'à 60 à 70% des individus de plus de 60 ans dans les pays industrialisés.

Plus de 90% des ulcères duodénaux sont associés à une gastrite à *H. pylori*. Par ailleurs, cette forme de gastrite chronique évoluerait naturellement vers une atrophie glandulaire, et pourrait alors favoriser le développement du cancer gastrique (Sobhani *et al.*, 1995).

4.1.2. Ulcère duodéal et ulcère gastrique

La prévalence de l'infection à *H. pylori* est de 92% chez les sujets atteints d'ulcère duodéal et de 70% chez les sujets atteints d'ulcère gastrique. Toutefois, seule une personne sur six infectées par *H. pylori* développera un ulcère (Howden, 1996). La réponse de l'hôte à l'infection pourrait déterminer l'apparition de l'ulcère. En effet, une étude menée sur trois générations d'une famille atteinte de la maladie ulcéreuse duodénale suggère que la survenue de l'ulcère n'est pas liée à la souche bactérienne, mais à la réponse de l'hôte à la bactérie (Nwokolo *et al.*, 1992).

Cependant, même si *H. pylori* semble nécessaire mais non suffisant à la survenue de l'ulcère, son éradication constitue la base du traitement anti-ulcéreux. En effet, le traitement de l'ulcère par éradication de *H. pylori* conduit à un taux de rechute de 5 à 10%, alors que le

traitement par un antisécrétoire seul conduit à un taux de rechute de 50 à 70% (Sevin *et al.*, 1998).

4.1.3. Adénocarcinome gastrique

Le cancer gastrique est le deuxième cancer par ordre de fréquence dans le monde après le cancer du poumon. *H. pylori* a été déclaré agent carcinogène de classe I par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1994, devenant ainsi le premier agent bactérien reconnu comme facteur de risque dans l'apparition du cancer (IARC, 1994). Le risque relatif en cas d'infection par *H. pylori* est voisin de 3, et 60 à 70% des cancers gastriques pourraient être attribués à *H. pylori*. La gastrite chronique évolue après plusieurs décennies, et dans environ 10% des cas, vers l'atrophie glandulaire et la métaplasie intestinale : ce type de lésion favoriserait le développement d'un cancer. Toutefois, *H. pylori* n'est vraisemblablement qu'un des facteurs conduisant à cette maladie, à côté notamment des facteurs liés à l'hôte, à l'environnement et à l'âge d'acquisition de la bactérie (Sevin *et al.*, 1998).

4.1.4. Lymphome du MALT

Les lymphomes non-hodgkiniens (*i.e.* non-ganglionnaires) de l'estomac sont rares (3% des tumeurs malignes de l'estomac). Les lymphomes développés au dépend du tissu lymphoïde associé à la muqueuse (mucosa-associated lymphoid tissue : MALT) résultent d'une transformation maligne puis d'une prolifération d'un clone lymphocytaire. D'étroites relations ont été démontrées entre la survenue des lymphomes gastriques et l'infection par *H. pylori* (Sobhani *et al.*, 1995) (Sevin *et al.*, 1998).

4.1.5. Autres pathologies possiblement associées à l'infection à *H. pylori*

H. pylori serait également associée à des maladies extra-digestives.

❖ Maladies coronariennes

Il apparaît que la séroprévalence de l'infection à *H. pylori* est augmentée chez les patients atteints de maladies coronariennes. Toutefois, la controverse demeure quant à l'implication de *H. pylori* dans ces maladies, et une récente méta-analyse conduite sur le sujet a conclu à une possible faible association entre l'infection et la pathologie (Pellicano *et al.*, 1999).

Une autre étude souligne que le niveau socio-économique des patients pourrait être un facteur confondant des analyses conduites jusqu'à présent (Mayr *et al.*, 2000).

❖ Mort subite du nourrisson

Des données épidémiologiques ont suggéré que *H. pylori* serait une cause possible de la mort subite du nourrisson (Pattison & Marshall, 1997). Dans une étude récente, la présence de *H. pylori* a été détectée par amplification spécifique (PCR) dans 88% des 28 cas analysés. Les auteurs de cette étude suggèrent que la réaction immunitaire de l'hôte induite par *H. pylori* pourrait conduire à la mort du nourrisson (Kerr *et al.*, 2000).

4.2. Déterminants bactériens du pouvoir pathogène de *H. pylori*

4.2.1. Facteurs de l'infection à *H. pylori*

Le succès de la colonisation de la muqueuse gastrique par *H. pylori* implique que cet agent infectieux possède des propriétés qui lui permettent de survivre dans l'estomac, de se multiplier et de coloniser la muqueuse gastrique.

4.2.1.1. Uréase

Toutes les souches de *H. pylori* produisent une uréase qui possède des propriétés uniques dans le monde bactérien. En effet, cette enzyme est constituée de deux sous-unités (UreA et UreB) (Clayton *et al.*, 1990) (Labigne, Cussac & Courcoux, 1991) au lieu de trois comme cela est observé pour les autres uréases bactériennes. Cette propriété n'est retrouvée que chez les bactéries appartenant au genre *Helicobacter* qui colonisent la muqueuse gastrique de différents mammifères (Ferrero & Labigne, 1993) (Solnick *et al.*, 1995). Par ailleurs, à la différence des autres espèces bactériennes pour lesquelles l'uréase est seulement cytoplasmique, l'uréase de *H. pylori* est à la fois localisée dans le cytoplasme, dans le périplasme et à la surface de la bactérie (Hawtin, Stacey & Newell, 1990) (Bode *et al.*, 1993a).

L'uréase est une métallo-enzyme à ions nickel de haute masse moléculaire (MW UreA+UreB \approx 88kDa). Elle est extrêmement abondante puisqu'elle représente 5 à 10% des protéines cellulaires totales de *H. pylori* (Moblely, Island & Hausinger, 1995). L'activité uréasique de *H. pylori* présente deux pH optimaux, dont l'un à pH acide. La synthèse de l'uréase catalytiquement active nécessite l'expression d'au moins sept gènes qui ont été identifiés par clonage. Les gènes de structure, *ureA* et *ureB*, codent pour les deux sous-unités qui entrent

dans la constitution de l'apoenzyme ; l'expression des cinq autres gènes (*ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureH* et *ureI*) est nécessaire pour l'activation de l'apoenzyme en une métallo-enzyme par incorporation des ions nickel aux sites actifs du complexe enzymatique (Labigne & de Reuse, 1996).

L'uréase hydrolyse l'urée présente à des concentrations d'environ 3 à 5 mM dans le liquide gastrique en libérant de l'ammoniac (Hu & Mobley, 1990) : ceci a pour effet immédiat de neutraliser le micro- et le macro-environnement de la bactérie, lui permettant ainsi de survivre (Marshall *et al.*, 1990). Toutefois, il apparaît, d'après les infections expérimentales pratiquées chez les animaux, que la neutralisation de l'environnement n'est pas l'unique fonction de l'uréase (Labigne & de Reuse, 1996). L'uréase aurait également un rôle dans le métabolisme de la bactérie, l'urée devenant ainsi une source d'azote (Mendz & Hazell, 1994) (Garner, Fulkerson & Mobley, 1998).

L'uréase peut être considérée comme un facteur de virulence. En effet, l'ammoniac libéré par hydrolyse de l'urée peut provoquer directement la lésion des cellules épithéliales gastriques. Toutefois des expérimentations conduites chez la souris n'ont pas permis de montrer une association de l'uréase avec une destruction de la muqueuse gastrique (Ghiara *et al.*, 1995). En outre, l'uréase peut elle-même endommager l'épithélium gastrique de manière indirecte en recrutant des cellules du système immunitaire de l'hôte (McGee & Mobley, 1999).

Les gènes de l'uréase *ureA* et *ureB* présentent une très grande diversité de sites de restriction : cette diversité a été utilisée pour le typage moléculaire des souches par amplification suivie d'une restriction par des endonucléases (PCR-RFLP) (Akopyanz *et al.*, 1992a) (Foxall, Hu & Mobley, 1992) (Lopez, Owen & Desai, 1993) (Hurtado & Owen, 1994).

4.2.2.2. Flagelles

Des flagelles assurent la motilité de *H. pylori*, et lui permettent de coloniser la muqueuse gastrique. Les filaments flagellaires sont constitués de la polymérisation de deux sous-unités peptidiques : la flagelline majoritaire, FlaA (Leying *et al.*, 1992), et la flagelline minoritaire, FlaB (Suerbaum, Josenhans & Labigne, 1993). Ces deux sous-unités sont indispensables à la constitution des flagelles, qui sont eux-mêmes indispensables à l'établissement de l'infection. Les deux gènes (*flaA* et *flaB*) sont exprimés à partir de promoteurs différents suggérant que le filament flagellaire pourrait, en réponse à des stimuli de l'environnement, être constitué de plus ou moins de l'une ou de l'autre des sous-unités et conférer ainsi des propriétés de mobilité modulables en fonction des situations (Josenhans, Labigne & Suerbaum, 1995).

Les gènes de la flagelline, *flaA* et *flaB*, présentent une grande variabilité de séquence, qui peut être révélée par PCR-RFLP, méthode utilisée pour le typage moléculaire des souches (Akopyanz *et al.*, 1992a) (Hurtado, Owen & Desai, 1994) (Forbes, Fang & Pennington, 1995).

4.2.2.3. Autres facteurs requis pour l'infection à *H. pylori*

❖ Adhésines bactériennes et récepteurs cellulaires

Le succès de l'infection dépend de l'adhésion de *H. pylori* à l'épithélium gastrique. *H. pylori* se lie exclusivement à l'épithélium gastrique (*H. pylori* ne peut adhérer sur un épithélium gastrique ayant évolué vers une métaplasie intestinale) et presque uniquement chez l'homme (Solnick *et al.*, 1995). Ce spectre d'hôte et ce tropisme cellulaire restreints suggèrent l'existence de récepteurs à *H. pylori* sur les cellules gastro-épithéliales. L'adhésion étroite de *H. pylori* s'accompagne d'un effacement local des microvillosités, de réarrangements du cytosquelette juste sous la bactérie, de formations en piédestal au site de l'attachement et d'une phosphorylation des tyrosines des protéines de 105 et 145 kDa des cellules de l'hôte (Segal, Falkow & Tompkins, 1996). Toutefois, ces éléments restent à confirmer, et l'identité des récepteurs cellulaires de l'hôte et des adhésines de la bactérie n'est pas bien établie (Labigne & de Reuse, 1996). *H. pylori* pourrait se lier aux hémagglutinines, aux phosphatidyléthanolamines, à la laminine, et à l'antigène Lewis b, mais l'importance *in vivo* de ces récepteurs potentiels demeure elle aussi mal connue (Fallone *et al.*, 1998).

❖ Echappement au système immunitaire de l'hôte

La colonisation de la muqueuse gastrique est associée à une stimulation du système immunitaire de l'hôte qui se traduit par une réponse humorale spécifique et locale dirigée contre certains antigènes de *H. pylori*. En dépit de cette réponse immunitaire, *H. pylori* échappe aux défenses immunitaires par des mécanismes qui ne sont pas encore compris. Cet échappement n'est pas lié à une variation antigénique adaptative. La résistance à la phagocytose pourrait être conférée par deux enzymes élaborées par *H. pylori*, la catalase et la superoxyde dismutase, ou par l'uréase, qui en libérant de l'ammonium neutraliserait le compartiment phagolysosomal et empêcherait les cellules phagocytaires d'agir efficacement (Labigne & de Reuse, 1996).

4.2.2. Facteurs associés aux manifestations cliniques des maladies

4.2.2.1. Cytotoxine vacuolisante VacA

La cytotoxine vacuolisante VacA conduit à la formation de vacuoles dans le cytoplasme des cellules épithéliales (Leunk *et al.*, 1988). Bien que toutes les souches de *H. pylori* possèdent le gène *vacA*, seules 50% d'entre elles produisent une cytotoxine active (Cover & Blaser, 1992).

Les souches capables de produire la cytotoxine, dénommées Tox+, seraient associées à des pathologies plus graves : elles sont retrouvées dans 75 à 100% des cancers gastriques (Tee, Lambert & Dwyer, 1995), dans près de 65% des pathologies ulcéreuses et seulement dans près de 35% des pathologies non-ulcéreuses (Tee *et al.*, 1995) (Zhang *et al.*, 1996). Toutefois, 40% des patients asymptomatiques sont porteurs de souches Tox+ et 30% des patients ulcéreux sont porteurs de souches Tox-, non productrices de cytotoxine. En conséquence, VacA ne semble pas avoir de rôle direct dans la pathogénèse (Fallone *et al.*, 1998).

Le gène *vacA* code pour une protoxine de 140 kDa qui comporte, du côté N-terminal, une séquence signal de 33 acides aminés, puis un domaine C-terminal transmembranaire de 33 kDa impliqué dans l'exportation et la sécrétion de la toxine (Cover *et al.*, 1994). La sécrétion et la maturation de VacA est analogue à celles des protéases qui clivent les immunoglobulines IgA1 d'autres agents pathogènes tels que *Neisseria gonorrhoeae* (Schmitt & Haas, 1994).

Outre une hétérogénéité dans l'expression de VacA parmi les souches, le gène *vacA* montre de la variation génotypique : *vacA* a été décrit comme un gène mosaïque (Atherton *et al.*, 1995) (Figure I.7).

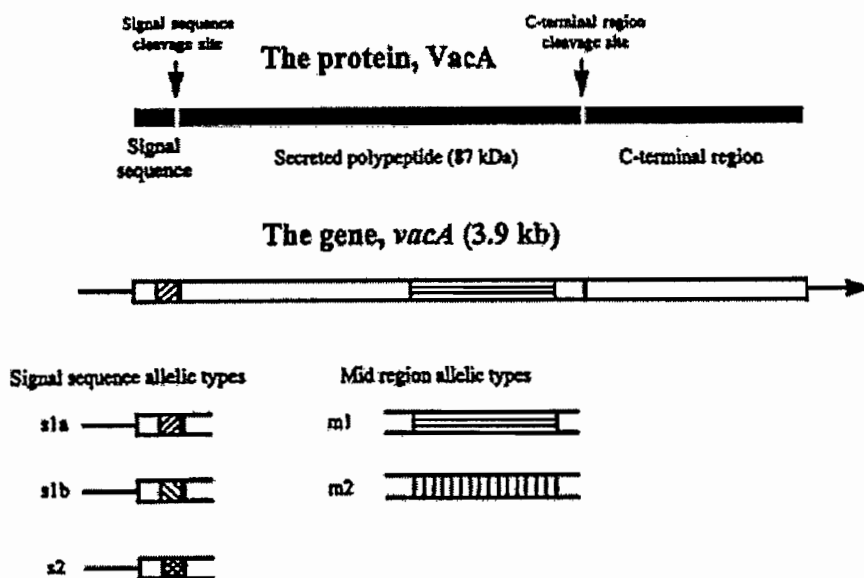


Figure I.7 : Schéma de la cytotoxine vacuolisante (VacA) et du gène codant (*vacA*) (d'après Atherton (1998))
 Note : Pour la protéine, le site de clivage de la séquence signal a été déterminé expérimentalement, mais le site de clivage C-terminal a été estimé à partir de la taille du polypeptide sécrété. Pour le gène, toutes les combinaisons entre les séquences signal et les séquences médiane sont possibles, sauf la combinaison s2/m1.

4.2.2.2. Antigène CagA associé à la cytotoxine et îlot de pathogénicité *cag*

❖ Antigène CagA associé à la cytotoxine

CagA, l'antigène associé à la cytotoxine, a ainsi été dénommé car toutes les souches produisant cette protéine de 128 kDa (Perez-Perez & Blaser, 1987) semblaient également produire la cytotoxine vacuolisante VacA, alors que les souches dépourvues du gène *cagA* ne produisaient pas la cytotoxine VacA (Tummuru, Cover & Blaser, 1993). L'antigène extracellulaire CagA est produit par toutes les souches possédant le gène *cagA*. La présence de ce gène est associée préférentiellement à la présence d'une séquence signal *vacA* de type s1 (Atherton *et al.*, 1995). Etant donné l'association entre *cagA*, *vacA* et la maladie ulcéreuse, il a été proposé que le gène *cagA* et la protéine CagA de 128kDa étaient des marqueurs de la présence de VacA, et que, par conséquent, ils étaient des marqueurs de virulence de la bactérie (Marshall, 1994). Toutefois, si l'association entre la présence du gène *cagA* et une sévérité accrue de la pathologie se vérifie dans les pays occidentaux (Blaser *et al.*, 1995), cette association n'est pas retrouvée au Japon, en Corée et en Chine (Miehlke *et al.*, 1996) (Pan *et al.*, 1997) (Maeda *et al.*, 1998). Par ailleurs, une étude conduite à Houston, Texas, a montré que 80% de porteurs asymptomatiques hébergeaient une souche de *H. pylori cagA+* (Miehlke *et al.*, 1996). En outre, l'inactivation de *cagA* ne semble affecter ni la production de la cytotoxine VacA, ni l'induction de la production d'interleukine 8 (IL-8) (Tummuru, Cover & Blaser, 1994) (Crabtree *et al.*, 1995) (Xiang *et al.*, 1995) (Miehlke *et al.*, 1996). Ainsi, même si *cagA* semble être le marqueur d'une virulence accrue, il n'est pas indispensable à la pathogénicité de *H. pylori*.

Le gène *cagA* est très conservé dans sa région 5', mais possède un nombre variable de séquences répétées dans sa région 3'. La variation ainsi produite dans la taille du gène est corrélée à la variation de la taille de la protéine CagA (Covacci *et al.*, 1993) (Tummuru *et al.*, 1993). Des amorces de PCR ont été construites dans la partie conservée du gène afin de déterminer le statut *cagA* des souches de *H. pylori* (Peek *et al.*, 1995a).

❖ Îlot de pathogénicité *cag*

Le gène *cagA* fait partie de la région *cag*. Cette région possède bon nombre des caractéristiques d'un îlot de pathogénicité (Censini *et al.*, 1996) (Hacker *et al.*, 1997), à savoir : un G+C% de 35 mol% alors que le G+C% moyen pour l'ensemble du génome de *H. pylori* est

de 39 mol%, des séquences flanquantes répétées directes impliquées dans l'intégration de ce locus de 40 kb dans le génome, des gènes de virulence potentiels et des gènes codant pour un système de sécrétion de type IV, et enfin des séquences d'insertion.

L'analyse de la séquence de l'îlot *cag* a révélé la présence d'une nouvelle séquence d'insertion : IS605 (Censini *et al.*, 1996). Cette séquence d'insertion porte deux gènes homologues de transposases. Le nombre de copies de IS605, ainsi que leur répartition sur le chromosome, varie suivant les souches (Censini *et al.*, 1996) (Tomb *et al.*, 1997) (Akopyants *et al.*, 1998) (Hook-Nikanne *et al.*, 1998).

Ainsi, la structure de l'îlot *cag* varie selon les souches : l'îlot *cag* peut constituer une unité ininterrompue, il peut être interrompu en deux régions, *cagl* et *cagII*, par une séquence IS605, il peut être interrompu en deux régions, *cagl* et *cagII*, par une portion d'ADN chromosomique flanquée par deux IS605, il peut enfin consister en des segments partiellement délétés de *cagl*, de *cagII*, ou de *cagl* et *cagII* (Censini *et al.*, 1996). Cette variation dans la structure de l'îlot *cag* est vraisemblablement due à l'insertion de la séquence IS605 suivie d'une recombinaison homologue, et, de fait, expliquerait que la souche présente l'îlot *cag*, partiellement ou en totalité, ou ne le présente pas (Censini *et al.*, 1996) (Covacci *et al.*, 1997).

L'îlot *cag* comporte une quarantaine de gènes (Censini *et al.*, 1996). Parmi ceux-ci, deux ont été caractérisés plus particulièrement, *picA* (correspondant en fait à deux gènes : *cagC* et *cagD*) et *picB* (aujourd'hui renommé *cagE*), et seraient associés à l'ulcère duodéal. Ainsi, *picB* induirait la production d'IL-8 et donc produirait une réaction pro-inflammatoire (Tummuru, Sharma & Blaser, 1995).

4.2.2.3. Autres facteurs de virulence possibles

Des variants alléliques du gène *iceA* seraient préférentiellement associés à la maladie ulcéreuse. Ce gène est exprimé par la bactérie au contact des cellules épithéliales gastriques, et interviendrait dans le système restriction-modification (Peek *et al.*, 1998).

Certaines souches de *H. pylori* ont *in vitro* un pouvoir d'activation et d'aggrégation des neutrophiles augmenté (Rautelin *et al.*, 1993). D'autre part, un gène, *napA*, est responsable de l'activation des neutrophiles (Evans *et al.*, 1995).

Le lipopolysaccharide (LPS) des souches altère la structure du mucus *in vitro* et de fait diminue les capacités de l'hôte à lutter contre les infections (Moran, 1995). Par ailleurs, le LPS de certaines souches contient des analogues de l'antigène Lewis x humain. Ceci lui permettrait à *H. pylori* d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte, mais ne lui conférerait aucun pouvoir pathogène (Sherbourne & Taylor, 1995).

Certaines protéines produites par *H. pylori*, dont HspA et HspB, pourraient induire une réaction auto-immune (Negrini *et al.*, 1991). Toutefois, leur rôle dans la pathogénèse est controversé (Kansau *et al.*, 1996).

5. DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT DE L'INFECTION A *HELICOBACTER PYLORI*

5.1. Diagnostic de l'infection à *H. pylori*

5.1.1. Méthodes invasives

Les méthodes dites « invasives » utilisent les biopsies gastriques (antrales, le plus souvent, mais parfois aussi, fundiques) et nécessitent donc une endoscopie digestive haute. Toutes ces méthodes ont une sensibilité et une spécificité élevées, mais qui n'atteignent 100% pour aucune d'entre elles.

❖ Test rapide à l'uréase

Des tests visant à mettre en évidence l'activité uréase de la bactérie ont été développés. Ils sont tous basés sur le virage d'un indicateur coloré, en général le rouge de phénol. Le test consiste à déposer un prélèvement gastrique dans un milieu riche en urée. La libération d'ammoniac par la bactérie conduit à une élévation du pH, qui est révélée par le virage de l'indicateur coloré (Sevin *et al.*, 1998).

❖ Détection par examen histologique

Outre la mise en évidence de *H. pylori*, l'examen anatomopathologique permet de caractériser dans le même temps la pathologie associée. Cet examen ne requiert pas de coloration particulière, les colorants habituellement utilisés étant le giemsa ou le crésyl violet. *H. pylori* est présent à la surface de l'épithélium et dans les cryptes glandulaires gastriques (Sevin *et al.*, 1998).

❖ Examen bactériologique standard

L'examen bactériologique standard comporte l'examen microscopique d'un frottis préparé à partir de l'échantillon à tester, et la culture des bactéries éventuellement présentes dans cet échantillon.

L'examen microscopique consiste en une coloration de Gram.

Le succès de la culture est conditionné par la bonne qualité du transport des biopsies. Avant d'être mises en culture, les biopsies sont broyées. Les milieux de culture comportent trois types de composants : la base (Wilkins-Chalgren, Trypticase soja, Columbia ou Cœur-Cervelle), le supplément de croissance (sang ou sérum) et le supplément sélectif (mélanges d'antibiotiques). Les bactéries sont cultivées à 37°C, sous atmosphère humide et microaéroophile et. En primoculture, les bactéries apparaissent au mieux après 3 jours d'incubation. L'analyse microbiologique standard n'est pas toujours demandée en première intention, mais elle est utile pour évaluer la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques (Sevin *et al.*, 1998) (Mégraud, 1996).

❖ Détection de *H. pylori* par amplification génique

Il est possible d'amplifier des séquences d'ADN spécifiques de *H. pylori* directement sur un broyat de biopsie, préalablement ou non lysé à l'aide d'un tampon spécifique. Ainsi, différents couples d'amorces ont été utilisés pour le diagnostic de *H. pylori* par PCR (Ho *et al.*, 1991) (Valentine *et al.*, 1991) (Hammar *et al.*, 1992). La détection de *H. pylori* par PCR peut donner des résultats légèrement supérieurs à la culture.

5.1.2. Méthodes non invasives

Ces méthodes ont une bonne sensibilité et une bonne spécificité.

❖ Sérologie

En cas d'infection par *H. pylori*, des anticorps sériques de types IgG, surtout, et IgA, à un moindre degré, apparaissent rapidement. La réponse est puissante et durable. En cas d'éradication de la bactérie, la décroissance du taux d'anticorps est lente : ils persistent au moins 6 mois à des taux importants. De nombreux tests sériques sont commercialisés, basés en majorité sur des méthodes immuno-enzymatiques de type ELISA ou sur des réactions d'agglutination. Des western-blots sont également pratiqués : ils permettent l'étude sélective de la réponse à certains antigènes (Aucher *et al.*, 1998) (Sevin *et al.*, 1998).

❖ Test respiratoire à l'urée marquée au ^{13}C

Le sujet ingère un aliment contenant de l'urée marquée au ^{13}C (isotope stable, non radioactif). L'urée est hydrolysée dans l'estomac par l'uréase des *H. pylori* éventuellement présents avec production d'ammoniac et de $^{13}\text{CO}_2$. Ce gaz est éliminé dans l'air expiré après passage dans le sang. Par spectrométrie de masse, le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ est mesuré dans l'air expiré, avant et 30 minutes après l'ingestion (Sevin *et al.*, 1998).

5.2. Traitement de l'infection à *H. pylori*

❖ Antibiothérapie

Le traitement de l'infection à *H. pylori* est aujourd'hui une trithérapie basée sur l'utilisation de deux antibiotiques (amoxicilline et/ou imidazolé et/ou clarythromycine) et d'un anti-sécrétoire (inhibiteur de pompe à proton). Le taux d'éradication de la bactérie va de 75 à 95% suivant les combinaisons d'antibiotiques utilisées. La durée du traitement préconisée est de sept jours (Sevin *et al.*, 1998).

La résistance aux antibiotiques constitue la cause principale de l'échec des traitements d'éradication. Cette résistance concerne essentiellement les macrolides (dont la clarythromycine) et les nitro-imidazolés. Le support génétique de ces résistances est essentiellement lié à des mutations ponctuelles chromosomiques. Ainsi, la résistance aux macrolides est due à une mutation (transition ou transversion) à la position 2142 ou 2143 au niveau des gènes codant pour l'ARN ribosomique 23S qui provoque une modification conformationnelle des ribosomes et ne permet plus la fixation des macrolides (Taylor *et al.*, 1997) (Versalovic *et al.*, 1997). La prévalence de cette résistance en France est de 14% (Mégraud, 2000).

❖ Développement de vaccins

Deux types de vaccins dirigés contre *H. pylori* sont en cours de développement : un vaccin prophylactique, pour prévenir l'infection, et un vaccin thérapeutique, pour traiter une infection déjà établie. Les antigènes protecteurs identifiés sont l'uréase, et possiblement HspA et HspB. L'utilisation de CagA et VacA comme antigène protecteur est à l'étude. Toutefois, une meilleure connaissance de la pathogénèse est nécessaire afin d'identifier les bons gènes candidats (Suerbaum & Josenhans, 1999).

6. ELEMENTS SUR LA STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS NATURELLES DE L'ESPECE *HELICOBACTER PYLORI*

6.1. Diversité génétique de *H. pylori*

H. pylori est retrouvé spécifiquement chez l'homme et les souches semblent remarquablement adaptées à un individu déterminé. Une telle capacité d'adaptation pourrait s'expliquer par la très grande diversité génétique rencontrée dans l'espèce. En effet, les différences entre les souches s'expriment par des variations dans la taille des génomes (Taylor *et al.*, 1992), des réarrangements chromosomiques (Jiang, Hiratsuka & Taylor, 1996), la présence ou non de plasmides (Oudbier *et al.*, 1990) (Simor *et al.*, 1990), des tailles de gènes variables (Covacci *et al.*, 1993), la présence de séquences d'insertion (Censini *et al.*, 1996) (Kersulyte *et al.*, 1998), des gènes spécifiques de souches (Alm *et al.*, 1999), des gènes mosaïques (Atherton *et al.*, 1995), la présence éventuelle de mutations ponctuelles et plus spécialement dans le gène de l'ARN ribosomique 23S conduisant à la résistance aux antibiotiques (Taylor *et al.*, 1997).

Toutefois, à l'importante diversité génétique observée entre les souches issues de patients distincts semble s'opposer une relative homogénéité au sein d'un même individu (Majewski & Goodwin, 1988) (Akopyanz *et al.*, 1992b). Ainsi, la souche ou les souches les mieux adaptées seraient sélectionnées et leur évolution serait dépendante des conditions physiologiques et du terrain immunogénétique du sujet infecté. Cette adaptation impliquerait l'établissement d'un équilibre entre l'hôte et la bactérie. Une telle capacité d'adaptation du microorganisme à son hôte ainsi que l'extrême variabilité génétique rencontrée dans l'espèce serait le résultat de modifications intervenues dans le génome de la bactérie par des mutations ponctuelles et/ou par des recombinaisons et des transferts génétiques inter- ou intra-spécifiques (Taylor *et al.*, 1995). Les souches dont le génome a été entièrement séquencé montrent des caractères compatibles avec l'existence de nombreuses possibilités de remaniement structural du génome (Tomb *et al.*, 1997) (Alm *et al.*, 1999). Ainsi, l'étude de la structure génétique des populations naturelles de l'espèce *H. pylori*, pour les renseignements qu'elle est susceptible d'apporter sur le taux de transfert horizontal entre souches, s'avère être un préalable nécessaire à la compréhension de la complexité des phénomènes écologiques et épidémiologiques qui conditionnent son adaptation à l'hôte.

6.2. Structure génétique des populations naturelles de *H. pylori*

La structure génétique de l'espèce *H. pylori* reste l'objet de débats. L'hypothèse de travail prédominante est celle d'une structure recombinante (Achtman *et al.*, 1999) (Go *et al.*, 1996) (Salaün *et al.*, 1998) (Suerbaum *et al.*, 1998). Toutefois, plus récemment, il a été proposé que l'espèce *H. pylori* aurait une structure clonale (Han *et al.*, 2000), comme c'est cas pour de très nombreuses espèces de bactéries (Ørskov & Ørskov, 1983) ou de protozoaires parasites (Tibayrenc, Kjellberg & Ayala, 1990).

La connaissance de la structure génétique des populations des microorganismes pathogènes est d'un intérêt majeur en médecine. En effet, afin d'estimer l'intérêt d'un génotype multilocus donné comme marqueur épidémiologique, il est nécessaire de mesurer la fréquence des échanges génétiques dans l'espèce considérée, qui conditionne la stabilité de ce génotype d'une génération à l'autre. D'après les travaux de Maynard-Smith *et al.* (1993), il ressort que toutes les populations bactériennes ne sont pas invariablement clonales mais qu'elles occupent un spectre allant de la structure fortement sexuée à la structure clonale quasiment stricte. Ainsi, pour un microorganisme dont la structure génétique est clonale, le suivi épidémiologique est aisé puisque les génotypes multilocus sont stables et se propagent de manière inchangée le temps que dure l'épisode épidémique. De plus, dans une espèce clonale, les différents clones ont tendance à accumuler des mutations divergentes susceptibles de gouverner le pouvoir pathogène ou la résistance aux antibiotiques. Dans ce cas, des corrélations entre les propriétés médicales et le type génétique de la souche peuvent être attendues. De plus, l'émergence d'un clone résistant à un antibiotique est contenu dans un seul groupe de clones et ne se propage pas à l'ensemble de la population. Dans le cas d'une espèce sexuée ou recombinante, c'est le schéma inverse qui est attendu (Tibayrenc, 1995b). Un cas spécial est constitué par les espèces à « clonalité épidémique ». Il s'agit d'espèces sexuées au sein desquelles on assiste à l'émergence et à la propagation de clones dont la durée de vie n'excède pas quelques mois, au plus quelques années (Maynard Smith *et al.*, 1993).

7. OBJECTIF ET MISE EN ŒUVRE DE CETTE ETUDE

L'objectif de ce travail est de tester l'hypothèse généralement avancée, mais encore controversée, d'une structure recombinante de l'espèce *H. pylori* en considérant un échantillon constitué de souches françaises, pour une grande part, et de souches provenant d'Amérique et d'Asie.

Pour étudier la structure génétique d'une population, plusieurs stratégies de typage sont possibles. Ainsi, il peut être fait appel à des marqueurs généralistes ou à des marqueurs spécialistes (Tibayrenc, 1995b).

Les marqueurs « spécialistes » concernent des régions du génome présentes uniquement chez une espèce ou une catégorie d'espèces donnée. L'analyse concomitante de plusieurs marqueurs « spécialistes » et la confrontation des classifications obtenues pour chacun d'entre eux permet d'appréhender la structure génétique d'une population (Desjardins *et al.*, 1995). Ainsi, cinq marqueurs « spécialistes » ont été mis en œuvre dans cette étude : ils considèrent le polymorphisme de gènes constitutifs (*ureA-ureB*, *flaA*, *vacA*), et détectent la présence de deux régions particulières (*cagA*, IS605).

Les marqueurs « généralistes » ne requièrent pas de connaissance préalable du génome du microorganisme étudié. En outre, ils présentent l'avantage d'être applicables à tout type de microorganismes et, de fait, des comparaisons entre microorganismes de différentes espèces sont possibles. Une telle approche comparative permettra notamment d'avoir une idée plus précise de l'étendue de la diversité génétique et de l'impact de la recombinaison dans l'espèce *H. pylori*. Par ailleurs, le choix de marqueurs plus ou moins résolutifs permet d'adapter l'horloge moléculaire (vitesse d'évolution du marqueur) à la question posée. Ainsi, trois marqueurs « généralistes » ont été mis en œuvre dans cette étude : ils considèrent le polymorphisme génétique global du microorganisme (Ribotypage et RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA) et le polymorphisme électrophorétique des enzymes (MLEE : MultiLocus Enzyme Electrophoresis).

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Brest (service du Pr. B. Picard), le laboratoire de Microbiologie A du CHU La Milétrie de Poitiers (service du Pr. J.-L. Fauchère) et le Centre d'Etude du Polymorphisme des Microorganismes (CEPM) de l'IRD de Montpellier (service du Dr. M. Tibayrenc).

MATERIEL ET METHODES

II. MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL BIOLOGIQUE

1.1. Souches étudiées

Quatre vingt sept souches de *Helicobacter pylori* ont été étudiées (Tableau II.1) (cf. Annexe 1). Soixante dix huit d'entre elles sont des isolats cliniques obtenus à partir de biopsies gastriques pratiquées, entre 1992 et 1998, chez des patients présentant des symptômes de diverses affections gastriques : gastrite (62,1%), ulcère (32,7%) et cancer (5,2%). Classiquement, les biopsies sont pratiquées au niveau de l'antra, et dans certains cas également au niveau du fundus.

Les souches proviennent pour près des deux tiers (65,5%) de deux hôpitaux français : Brest (31,0%) et Poitiers (34,5%). Les autres souches proviennent du Venezuela (9,2%) et d'Asie (14,9%). Neuf souches de référence (10,3%), parmi lesquelles les deux souches 26695 (Tomb *et al.*, 1997) et J99 (Alm *et al.*, 1999), entièrement séquencées, ont été incluses dans l'étude.

Tableau II.1 : Distribution géographique et pathologique des souches de *Helicobacter pylori* étudiées

	Origine géographique		Pathologie associée			Total
	Pays	Ville	Gastrite	Ulcère	n.d. ^b	
Pays non asiatiques						
	Souches de référence ^a		2	2	5	9
	Europe	France	14	8	5	27
		Brest	20	9	1	30
	Amérique du Sud	Venezuela	-	-	8	8
Pays d'Asie						
	Asie du Sud Est	Hong-Kong	-	-	3	3
		Chine	-	-	2	2
		Japon	-	-	5	5
	Asie du Sud	Inde	-	-	3	3
Total			36	19	32	87

^a Les souches de référence considérées dans cette étude sont : CIP 101260 (Mégraud *et al.*, 1985), ATCC 43579 (Langenberg *et al.*, 1986), 84-183 (Perez-Perez & Blaser, 1987), 85-456 (Fauchere & Blaser, 1990), 86-338 (Fauchere & Blaser, 1990), Tx30a (Cover & Blaser, 1992), Sydney strain SS1 (Lee *et al.*, 1997), 26695 (Tomb *et al.*, 1997) et J99 (Alm *et al.*, 1999).

^b n.d.: non déterminé.

Quatre souches appartenant à d'autres espèces (souches « outgroup ») ont été également étudiées : deux souches de référence du genre *Helicobacter*, *H. mustelae*

ATCC43772 et *H. hepaticus* ATCC51448, et deux isolats cliniques du genre *Campylobacter*, *C. jejuni* 855 et *C. coli* 85Y (Fauchère *et al.*, 1986).

1.2. Primoculture à partir des biopsies gastriques

Aussitôt prélevées, les biopsies sont déposées dans un milieu de transport de fabrication commerciale (Portagerm Pylori, BioMérieux, Marcy L'Etoile, France). Elles sont conservées dans ce milieu à 4°C, 24 heures au maximum avant leur mise en culture.

Les biopsies sont broyées dans un broyeur de Potter à usage unique, ou lacérées au scalpel. Le broyat obtenu estensemencé d'une part sur milieux gélosés non sélectifs : Columbia à 5% de sang de mouton (COS, BioMérieux, Marcy L'Etoile, France) et Trypcase-Soja à 10% de sang de cheval (TSH, BioMérieux), et d'autre part sur un milieu sélectif gélosé Pylori (BioMérieux). Les cultures sont incubées 2 à 10 jours à 37°C en conditions microaérophiles (5% O₂, 5% CO₂, 2% H₂, 88% N₂) en jarre (AnaéroJarre, Oxoid) contenant un générateur de CO₂ et de N₂ (CampyPak Plus, Becton, Dickinson). Une réactivation des cultures est parfois nécessaire : cette opération consiste à réétaler au moyen d'une pipette pasteur les morceaux de biopsie eux-mêmes ou les premières petites colonies translucides apparues.

Afin de contrôler la qualité des cultures, une coloration de Gram est effectuée : une culture de « bonne qualité » doit présenter un pourcentage de formes bacillaires supérieur ou égal à 70%. Des tests uréase (Pasteur Diagnostic), oxydase (Pasteur Diagnostic) et catalase (BioMérieux) sont également réalisés. Les souches sont conservées en bouillon Trypcase-Soja (BioMérieux) additionné de 50% de glycérol, à -80°C.

1.3. Production de biomasse

Différents milieux ont été testés afin de produire une biomasse suffisante notamment pour l'étude des isoenzymes.

1.3.1. Essais de culture en milieu liquide

Des souches de *H. pylori* sont mises en culture sur gélose Pylori et récoltées après 3 à 5 jours jusqu'à obtenir une densité de population suffisante (≥ 1 unité Mac Farland). Le pourcentage de formes bacillaires et la présence de contaminants éventuels sont contrôlés par coloration de Gram.

50 ml de milieu liquide sont inoculés par la biomasse récoltée. La quantité de cellules initialement présentes est évaluée par densitométrie. Quatre milieux de culture liquide différents ont été testés :

- bouillon Trypcase-Soja
- bouillon Trypcase-Soja + PolyVitex (BioMérieux) + sérum humain décomplémenté 10% v/v
- bouillon Cœur-Cervelle (BioMérieux) + PolyVitex (BioMérieux) + sérum humain décomplémenté 10% v/v
- bouillon IsoSensitest (Oxoid) + sérum de cheval décomplémenté 10% v/v (Oxoid) (Go *et al.*, 1996).

Le PolyVitex est un mélange d'enrichissement chimiquement défini destiné aux milieux de culture des microorganismes exigeants. De la même façon, le bouillon IsoSensitest est un milieu riche destiné à la culture des microorganismes exigeants.

Les cultures sont incubées 3 à 8 jours à 37°C en conditions microaérophiles, avec ou sans agitation, avec ou sans ajout de milieu frais.

La qualité des cultures obtenues (coloration de Gram, tests uréase, oxydase et catalase) et la densité cellulaire finale (densité cellulaire finale attendue ≥ 10 unités Mac Farland) sont contrôlées. Afin de révéler la présence d'éventuels contaminants, une gélose non sélective, COS ou TSH, estensemencée d'une goutte de la culture obtenue.

1.3.2. Essais de culture en milieu solide

Trois milieux de culture solides ont été testés :

- gélose Wilkins-Chalgren (Oxoid) + sang humain 10% v/v + 3 antibiotiques + 1 antiseptique (Monteiro, Cabrita & Mégraud, 1997)
- gélose Wilkins-Chalgren (Oxoid) + sérum humain 10% v/v + 3 antibiotiques + 1 antiseptique
- gélose Wilkins-Chalgren (Oxoid) + sérum humain décomplémenté 10% v/v + 3 antibiotiques + 1 antiseptique

Les 3 antibiotiques utilisés sont le triméthoprime (5 $\mu\text{g/ml}$), la vancomycine (10 $\mu\text{g/ml}$) et la cefsulodine (10 $\mu\text{g/ml}$), et l'antiseptique est le cycloheximidine (100 $\mu\text{g/ml}$).

Les cultures sont incubées 5 jours à 37°C en conditions microaérophiles. La qualité des cultures est contrôlée.

1.3.3. Préparation des culots cellulaires

Pour la production de biomasse, les milieux de culture finalement retenus sont les géloses commerciales sélectives Pylori et non sélectives COS et TSH, utilisées pour la primoculture. Chaque souche est mise en culture sur une dizaine de boîtes, pour moitié sur milieu sélectif et pour moitié sur milieu non sélectif. Les souches sont récoltées après 3 à 6 jours, alors que les cellules sont en phase stationnaire de croissance. Des réactivations des cultures sont parfois nécessaires.

Les cellules sont lavées par centrifugation (3000 g, 10 minutes, 4°C) dans 3 ml de PBS 1X (Na₂HPO₄ 7,2 mM, NaH₂PO₄ 2,8 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2). Le culot est resuspendu dans 1 ml de PBS 1X et centrifugé une nouvelle fois (12000 g, 10 minutes, 4°C). Le culot est alors pesé puis congelé à -80°C.

2. ANALYSE DU POLYMORPHISME DES GENES DE L'UREASE (*ureA-ureB*) ET DE LA FLAGELLINE (*flaA*)

L'analyse du polymorphisme de restriction des gènes de l'uréase, *ureA-ureB*, et de la flagelline, *flaA*, est réalisée selon la technique de Akopyanz *et al.* (1992a).

2.1. Extraction de l'ADN

L'extraction est réalisée à partir de la méthode de Akopyanz *et al.* (1992b).

Le culot est repris dans 200 µl de tampon GTEL (glucose 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 50 mM, lysozyme 10 mg/ml), et est incubé 1 heure à 37°C. Puis, 500 µl de tampon de lyse TESK (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 ; EDTA 50 mM ; SDS 1% ; protéinase K 0,5 mg/ml) sont ajoutés et la solution est incubée 2 heures à 55°C. La RNase est ajoutée à une concentration finale de 10 mg/ml et le tout est remis à incuber 10 minutes à 55°C. La solution est extraite de façon séquentielle avec des volumes égaux de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1)

et de chloroforme/alcool isoamylique (24:1). 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3 M est ajouté. L'ADN est précipité par 2 volumes d'éthanol, lavé par de l'éthanol à 70%, et dissous dans 500 µl d'une solution de dissolution de l'ADN (Tris-HCl 6 mM, pH 7,5 ; NaCl 6 mM ; EDTA 0,1 mM). La concentration en ADN est mesurée par un spectrophotomètre à U.V (GeneQuant RNA/DNA Calculator, Pharmacia).

2.2. Amorces

Les amorces utilisées pour l'amplification d'un fragment de 2,4 kb situé dans les gènes *ureA* et *ureB* ont été déterminées à partir de la séquence des gènes *ureA* et *ureB* de la souche de *H. pylori* 85P (Labigne, Cussac & Courcoux, 1991) : 5' AGGAGAATGAGATGA 3' (bp 308 à 322) et 5' ACTTTATTGGCTGGT 3' (bp 2718 à 2703) (Foxall, Hu & Mobley, 1992).

Les amorces utilisées pour l'amplification d'un fragment interne de 1,5 kb du gène *flaA* sont basées sur la séquence de la souche de *H. pylori* 898-1 (Leying *et al.*, 1992) : 5' ATGGCTTTTCAGGTCAATAC 3' (bp 139 à 158) et 5' GCTTAAGATATTTTGTGAACG 3' (bp 1659 à 1638).

2.3. Amplification par PCR des gènes *ureA-ureB* et *flaA*

10 ng d'ADN sont ajoutés à 100 µl d'un mélange réactionnel contenant du tampon 10X (Tris-HCl 67 mM, pH 8,8 ; (NH₄)₂SO₄ 16 mM), 3 mM de MgCl₂, 250 mM de chaque dNTP, 2,5 U de *Taq* polymérase (Eurobio, Les Ulis, France) et 20 pmoles de chaque amorce. Pour éviter l'évaporation, le mélange est recouvert de 60 µl d'huile minérale. La réaction de PCR est réalisée dans un thermocycleur Techne PHC-3. Le programme d'amplification consiste en une dénaturation initiale de l'ADN à 95°C pendant 5 minutes, suivie de 30 cycles comprenant une étape de dénaturation à 95°C pendant 1 minute, une étape d'hybridation des amorces à 50°C pour *ureA-ureB* ou 55°C pour *flaA* pendant 1 minute et une étape d'extension des amorces à 72°C pendant 2 minutes; puis une extension finale à 72°C pendant 10 minutes.

Les fragments amplifiés attendus sont révélés en soumettant un aliquot des produits d'amplification à une électrophorèse en gel d'agarose (Gibco-BRL) à 1% w/v dans un tampon TBE 0,5X (Tris 45 mM, Borate 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3) pendant 1 heure à 90 Volts, puis le gel est coloré par du bromure d'éthidium (1 µg/ml), exposé aux U.V. et photographié.

2.4. Analyse par RFLP des fragments amplifiés

Les produits d'amplification sont additionnés de $1/10^{\text{ème}}$ de volume d'acétate de sodium 3 M et sont précipités par 2 volumes d'éthanol. Après une incubation de 2 heures à -20°C , l'ensemble est centrifugé (13000 g, 30 minutes, 4°C), puis l'éthanol est éliminé. Après séchage au speed-vac, le culot est repris dans 25 μl de solution de dissolution de l'ADN. Puis 10 μl (soit 1 à 5 μg) de produit amplifié sont digérés par 10 U d'enzyme de restriction à 37°C pendant 16 heures dans le tampon recommandé par le fabricant pour un volume final de 50 μl . Les enzymes de restriction *HaeIII* (Boehringer Mannheim) (site de restriction reconnu: GGCC) et *NdeI* (Boehringer Mannheim) (site de restriction reconnu: GATC) sont utilisées. Les produits de digestion sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose (Gibco-BRL) à 2% w/v dans un tampon TBE 0,5X pendant 1 heure 30 à 90 Volts, puis le gel est coloré par du bromure d'éthidium (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La taille des fragments obtenus est calculée à partir des distances de migration en utilisant le marqueur VI (Boehringer Mannheim) comme marqueur de masse moléculaire.

2.5. Lecture et interprétation des profils

Les produits d'amplification digérés par *HaeIII*, d'une part, et par *NdeI*, d'autre part, sont considérés comme deux caractères génétiques distincts dans la mesure où les sites de restriction de ces deux endonucléases sont indépendants.

3. RECHERCHE DES GENES CODANT POUR LES FACTEURS DE VIRULENCE *vacA* ET *cagA* ET LA SEQUENCE D'INSERTION IS605

3.1. Génotypage du gène *vacA* par PCR

Des fragments codant pour la région interne (m) et pour la séquence signal (s) de la cytotoxine vacuolisante *VacA* sont amplifiés par PCR en utilisant différents couples d'amorces selon la méthode de Atherton *et al.* (1995) (Tableau II.2).

5 ng d'ADN, également extrait suivant la méthode de Akopyanz *et al.* (1992b), sont ajoutés à 100 μl d'un mélange réactionnel contenant du tampon 10X (67 mM Tris-HCl, pH 8,8, 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 2 mM MgCl_2 , 250 mM de chaque dNTP, 2,5 unités de *Taq* polymérase (Eurobio) et 20 pmoles de chaque amorce. Le mélange est recouvert de 60 μl d'huile minérale.

Le programme d'amplification consiste en une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes, suivie de 30 cycles: 95°C pendant 1 minute, hybridation des amorces à 52°C pour l'amplification de la région interne m1 et m2, ou 55°C pour l'amplification de la séquence signal s1/s2, s1a, s1b ou s2 pendant 1 minute et une étape d'extension des amorces à 72°C pendant 2 minutes; puis une extension finale à 72°C pendant 5 minutes. Les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose (Gibco-BRL) à 2% w/v dans un tampon TBE 0,5X pendant 1 heure à 90 Volts, puis le gel est coloré par du bromure d'éthidium (1 µg/ml) et exposé aux U.V.

Tableau II.2 : Amorces utilisées pour le typage des allèles *vacA* de *Helicobacter pylori* (Atherton *et al.*, 1995)

Région amplifiée	Désignation des amorces	Séquence des amorces	Taille et localisation des produits de PCR
m1	VA3-F	5' GGTCAAAATGCGGTCATGG 3'	290 bp (2741-3030) ^a
	VA3-R	5' CCATTGGTACCTGTAGAAAAC 3'	
m2	VA4-F	5' GGAGCCCCAGGAAACATTG 3'	352 bp (976-1327) ^b
	VA4-R	5' CATAACTAGCGCCTTGACAC 3'	
s1	VA1-F ^c	5' ATGGAAATACAACAAACACAC 3'	259 bp (797-1055) ^a
	VA1-R ^c	5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	
s2	VA1-F ^c	5' ATGGAAATACAACAAACACAC 3'	286 bp (284-569) ^d
	VA1-R ^c	5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	
s1a	SS1-F ^e	5' GTCAGCATCACACCGCAAC 3'	190 bp (866-1055) ^a
s1b	SS3-F ^e	5' AGCGCCATACCGCAAGAG 3'	187 bp ^f
s2	SS2-F ^e	5' GCTAACACGCCAAATGATCC 3'	199 bp (371-569) ^d

^a Localisation dans la séquence *vacA* de la souche de *H. pylori* 60190 (Cover *et al.*, 1994).

^b Localisation dans la séquence *vacA* de la souche de *H. pylori* 87-203 (Cover *et al.*, 1994).

^c Les produits amplifiés utilisant cette paire d'amorces sont différenciés sur la base de leur masse moléculaire.

^d Localisation dans la séquence *vacA* de la souche de *H. pylori* Tx30a, GenBank sequence U29401.

^e Utilisée avec l'amorce VA1-R.

^f La localisation n'a pas été publiée pour les souches de ce type.

3.2. Amplification par PCR d'un fragment du gène *cagA*

Le couple d'amorces, 5' GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG 3' (bp 1228 à 1249) et 5' CTGCAAAAGATTGTTTGCAGAGA 3' (bp 1555 à 1576), basé sur la séquence de la souche de *H. pylori* 84-183 (Tummuru, Cover & Blaser, 1993), permet l'amplification d'un fragment de 349 bp du gène *cagA* (Peek *et al.*, 1995a), *cagA* étant le gène codant pour l'antigène CagA associé à la cytotoxine vacuolisante VacA. Le mélange réactionnel, le thermocycleur ainsi que le programme de PCR sont les mêmes que ceux utilisés pour l'amplification des différents fragments du gène *vacA*, avec cependant une température d'hybridation des amorces de 57°C.

3.3. Amplification par PCR de la séquence d'insertion IS605

Le couple d'amorces, 5' CGCCTTGATCGTTTCAGGATTAGC 3' et 5' CAACCAACCGAAGCAAGCATAATC 3', décrit par Höök-Nikanne *et al.* (1998), permet l'amplification d'un fragment de 360 bp de la séquence d'insertion IS605 mise en évidence dans la région du gène *cagA* (Censini *et al.*, 1996). Le mélange réactionnel, le thermocycleur ainsi que le programme de PCR sont les mêmes que ceux utilisés pour l'amplification du fragment du gène *cagA*.

4. ANALYSE DU POLYMORPHISME DE RESTRICTION DES GENES DE L'ARN RIBOSOMIQUE (RIBOTYPAGE)

4.1. Principe

La technique du ribotypage consiste à repérer sur un profil de restriction d'ADN total les régions codant pour les ARN ribosomiques, à l'aide d'une sonde d'ADN complémentaire de l'ARN ribosomique.

Les gènes codant pour l'ARN ribosomique étant très conservés dans l'ensemble des eubactéries (Pace, Olsen & Woese, 1986), il a été proposé d'utiliser l'ARN ribosomique de *Escherichia coli* comme sonde universelle pour l'étude des profils de restriction (Grimont & Grimont, 1986). Cette technique, d'abord décrite à des fins taxonomiques, est également un outil intéressant en épidémiologie (Stull, LiPuma & Edlind, 1988).

Pour la mise en œuvre de la technique du ribotypage, une collaboration a été établie avec le laboratoire de Recherche en Bactériologie Pédiatrique de l'Hopital Robert Debré de Paris (service du Professeur E. Bingen).

4.2. Digestion de l'ADN et électrophorèse

L'ADN (3 µg), extrait suivant la méthode de Akopyanz *et al.* (1992b), est digéré, d'une part, par l'endonucléase de restriction *Hind*III (Boehringer Mannheim) (site de restriction reconnu: AAGCTT) (1 unité par µg d'ADN), et d'autre part, par l'endonucléase *Hae*III (Boehringer Mannheim) (site de restriction reconnu: GGCC) pendant 16 heures à 37°C, dans le tampon recommandé par le fabricant. L'ADN digéré est soumis à une électrophorèse en gel d'agarose (Gibco-BRL) à 0,8% w/v dans un tampon TBE 1X (Tris 89 mM, Borate 89 mM, EDTA

2 mM, pH 8,3) sous une tension de 30 Volts, pendant 16 heures. Après électrophorèse, le gel est coloré par le bromure d'éthidium (1 µg/ml), exposé aux U.V. puis photographié.

4.3. Préparation de la sonde d'ADN complémentaire marquée à la digoxigénine

La sonde d'ADN complémentaire marquée à la digoxigénine est préparée à partir de 500 ng d'ARN ribosomique 16S+23S de *E. coli* (Boehringer Mannheim) en utilisant la transcriptase inverse de M-MLV (Gibco-BRL), et est marquée par incorporation de dig-11-dUTP (Boehringer Mannheim).

4.4. Transfert de l'ADN et hybridation

Après électrophorèse, le gel est dénaturé dans un tampon (NaOH 0,4 M, NaCl 0,6 mM) (30 minutes) puis neutralisé dans un tampon (Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5 ; NaCl 1,5 M) (2 x 30 minutes). L'ADN est transféré sur une membrane de nylon Hybond-N+ (porosité 0,45 µm) (Amersham International) par capillarité avec un tampon SSC 20X (3 M NaCl, 0,3 M Na₃Citrate, pH 7,2) à 20°C pendant 2 heures. L'ADN est fixé à la membrane par exposition aux U.V. puis la membrane est incubée dans un tampon de préhybridation (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; NaCl 1 M, SDS 1%, Agent bloquant 1%) pendant 2 heures puis hybridée dans ce même tampon additionné de 5,5% de sulfate de dextran et de la sonde préalablement dénaturée par la chaleur, pendant 16 heures à 65°C. La réaction d'hybridation est révélée par un système de détection non-radioactif des acides nucléiques, le CSPD (disodium 3 - (4 - methoxyspiro {1,2 - dioxetane 3,2' (5' chloro) tricyclo [3,3,1,13,7] decan} 4 - yl) phenyl phosphatase, Boehringer Mannheim) qui produit une réaction colorimétrique au contact de la phosphatase alcaline couplée à l'anticorps anti-digoxigénine. La membrane est alors exposée 2 heures en cassette avec un film Hyperfilm-ECL (Amersham International) (Bingen, Denamur & Elion, 1994).

4.5. Lecture et interprétation des profils

Les ribotypes obtenus après digestion par *Hind*III, d'une part, et après digestion par *Hae*III, d'autre part, sont considérés comme deux caractères génétiques indépendants dans la mesure où les sites de restriction de ces deux endonucléases sont indépendants.

5. ANALYSE DU POLYMORPHISME DE L'ADN REVELE PAR AMPLIFICATION ALEATOIRE (RAPD) ET HYBRIDATIONS MOLECULAIRES

5.1. Principe

La technique RAPD est inspirée de la technique PCR classique : elle s'en distingue par l'utilisation de conditions de faible stringence et d'amorces uniques de séquence oligonucléotidique choisie arbitrairement (Williams *et al.*, 1990) (Welsh & McClelland, 1990). Les profils générés révèlent des régions anonymes du génome, et, de fait, sont difficiles à interpréter en terme d'allèles sauf si l'on peut faire des expériences de croisement ou des généalogies.

La technique RAPD est susceptible de détecter le polymorphisme engendré par différents événements mutationnels : une substitution, une délétion ou une insertion dans le site d'appariement de l'amorce. Cette mutation provoque un changement de taille du ou des fragments amplifiés.

De plus, en utilisant un grand nombre d'amorces la technique RAPD permet d'obtenir un sondage théoriquement aléatoire du génome et donc de caractériser les individus et d'estimer des relations génétiques globales entre individus.

5.2. Technique RAPD

Quatre vingt trois amorces décamériques différentes ont été testées sur un panel de référence de souches de *H. pylori*. Ces amorces appartiennent aux kits A, B, F, N, R et U d'Operon Technologies (Operon Technologies, Alameda, USA) (cf. Annexe 2). Il s'agit d'amorces non palindromiques ayant un GC% de 60 à 70%.

20 ng d'ADN sont ajoutés à 60 µl d'un mélange réactionnel contenant 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCL, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 100 µM de chaque dNTP, 200 nM d'amorce et 0,9 unité de *Taq* polymérase (Boehringer Mannheim).

Le programme d'amplification consiste en une dénaturation initiale de la matrice d'ADN à 94°C pendant 5 minutes, suivie de 45 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 minute, une étape d'hybridation à 36°C pendant 1 minute et une étape d'extension des amorces à 72°C pendant 2 minutes ; puis d'une extension finale à 72°C pendant 7 minutes. Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur PTC-100 (MJ Research Inc, USA) à couvercle chauffant, ce qui rend inutile l'ajout d'huile minérale pour éviter l'évaporation.

Les produits d'amplifications sont révélés par électrophorèse en gel d'agarose (Gibco-BRL) à 1,6% dans un tampon TAE 0,5X pendant 1 heure à 50 Volts, puis le gel est coloré par du bromure d'éthidium (0,5 µg/ml), exposé aux U.V. puis photographié.

Les 12 amorces donnant les profils les plus reproductibles ont été retenues : A-11 5'-CAATCGCCGT-3', A-13 5'-CAGCACCCAC-3', A-17 5'-GACCGCTTGT-3', B-01 5'-GTTTCGCTCC-3', B-05 5'-TGCGCCCTTC-3', B-15 5'-GGAGGGTGTT-3', F-07 5'-CCGATATCCC-3', N-04 5'-GACCGACCCA-3', N-05 5'-ACTGAACGCC-3', N-09 5'-TGCCGGCTTG-3', R-10 5'-CCATTCCCCA-3' et U-12 5'-TCACCAGCCA-3'.

5.3. Lecture et interprétation des profils

Chaque souche est caractérisée par un ensemble de 12 profils, chacun des profils correspondant à l'amplification par une amorce RAPD donnée. Compte tenu du fait que les amorces RAPD amplifient des régions anonymes du génome, il n'est fait aucune interprétation allélique des profils obtenus.

Chaque marqueur RAPD utilisé est assimilé à un caractère génétique, même si chaque amorce est susceptible d'amplifier plusieurs locus chez une même souche, et/ou d'amplifier des locus différents d'une souche à l'autre. La combinaison de la totalité des profils d'amplification obtenues avec toutes les amorces constitue le génotype de la souche. Pour les tests de génétique des populations mis en œuvre dans la suite du travail, ce traitement des données est admis (Tibayrenc, 1995b) car les risques que deux amorces amplifient les mêmes locus sont négligeables. En effet, ce qui importe c'est que deux amorces différentes amplifient des séries de locus indépendants les unes des autres ; cette vérification est apportée par les tests d'hybridations moléculaires.

5.4. Test de l'indépendance des marqueurs RAPD

5.4.1. Principe

Une condition d'application des études de structure génétique de population est l'indépendance des marqueurs utilisés. La technique RAPD permettant l'amplification de séquences d'ADN non définies, il était utile de vérifier que les fragments amplifiés à l'aide d'amorces distinctes représentent des séquences non chevauchantes, même si c'est la notion communément admise. Ceci peut être vérifié par hybridation moléculaire des produits d'amplification obtenus avec certaines amorces sur les produits d'amplification obtenus avec d'autres amorces.

Ainsi, les produits d'amplification obtenus avec certaines amorces sont déposés sur une membrane de nylon par la technique du dot-blot. Cette membrane est hybridée avec une sonde radiomarquée et composite, constituée de l'ensemble des fragments amplifiés par une autre amorce. L'absence de signal démontre qu'aucun des fragments d'un profil RAPD donné n'est présent dans un autre profil et que par conséquent, ces marqueurs RAPD sont indépendants. Des expériences de southern-blot sont également réalisées.

5.4.2. Préparation des membranes et dépôts des échantillons

5.4.2.1. Dot-Blot

Pour cette étude, 48 produits d'amplification, correspondant à 8 souches amplifiées par 6 amorces différentes, ont été retenus.

90 µl de produit d'amplification RAPD sont purifiés par chromatocentrifugation sur colonne Wizard (Promega) suivant les indications du fabricant. 10 ng de ce produit purifié sont dénaturés par une solution NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M. La membrane de nylon Hybond-N+ (Amersham International) ainsi qu'une feuille de papier 3MM (Whatmann), préalablement imbibées dans cette même solution de dénaturation, sont placées entre les deux parties du dispositif de dot-blot. Le vide (400 mbar) est réalisé à l'aide d'une pompe à eau, et les 48 échantillons sont alors déposés. La membrane est ensuite rincée dans un tampon SSC 2X (NaCl 0,3 M, Na₃Citrate 0,03 M, pH 7,2), puis séchée rapidement sur une feuille de papier filtre (Oury *et al.*, 1997).

5.4.2.2. Southern-Blot

Après électrophorèse des produits de RAPD bruts, réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, le gel est dénaturé dans un tampon NaOH 0,4 M, NaCl 0,6 M (30 minutes), puis neutralisé dans un tampon Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5 ; NaCl 1,5 M (2 x 30 minutes). L'ADN est transféré sur une membrane de nylon Hybond-N+ (Amersham International) par capillarité avec un tampon SSC 20X à 20°C pendant 16 heures. Après transfert, l'ADN est dénaturé en plaçant la membrane sur des papiers 3MM imbibées d'une solution de NaOH 0,4 M (20 minutes). La membrane est ensuite rincée dans un tampon SSC 5X, puis séchée rapidement sur une feuille de papier filtre.

5.4.3. Préparation de la sonde composite radiomarquée

Les produits de RAPD purifiés des 8 souches amplifiées par la même amorce sont regroupés. 500 ng de ce mélange sont marqués par la radioactivité par le procédé de Nick-Translation en présence de 10 μCi de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (kit Nick-translation, Boehringer Mannheim). Le mélange réactionnel est incubé 35 minutes à 15°C et la réaction est stoppée en ajoutant 1/10^{ème} de volume d'une solution d'EDTA 0,5 M. Le volume est alors complété à 100 μl par addition d'eau distillée stérile, et les molécules de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP non incorporées sont éliminées par chromatographie d'exclusion sur colonne QuickSpinTM Sephadex G-50 (Boehringer Mannheim). Le rendement du marquage est estimé par scintillométrie.

5.4.4. Hybridation moléculaire

La membrane est incubée dans un tampon de préhybridation (SSPE 5X (NaCl 3,6 M, Sodium Phosphate 0,2 M, EDTA 0,02 M, pH 7,7), Denhardt 5X (BSA 2% w/v, FicollTM 2% w/v, Polyvinylpyrrolidone 2% w/v), SDS 5%, sperme de hareng 100 $\mu\text{g/ml}$, pH 7,7) pendant 2 heures à 65 °C (50 μl de tampon/ cm^2). Après dénaturation (10 minutes, 100°C), la sonde radiomarquée est ajoutée au tampon (10 ng de sonde/ μl de tampon d'hybridation). L'hybridation est conduite pendant 16 heures à 65°C.

Des lavages successifs dans des tampons à stringence croissante (SSPE 5X, SDS 0,1% à SSPE 0,1X, SDS 0,1% ; de 20°C à 65°C, de 10 minutes à 1 heure) sont réalisés. L'excès de liquide est éliminé par application rapide sur du papier 3MM (Whatmann), puis la membrane est enveloppée dans une feuille de cellophane. La membrane est alors mise à exposer en cassette pourvue d'écrans intensificateurs avec un film Curix (Agfa). L'exposition est réalisée à -80°C pendant 2 à 24 heures.

6. ELECTROPHORESE DES ISOENZYMES

6.1. Principe

L'électrophorèse des isoenzymes, ou Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE), permet d'étudier la migration d'enzymes métaboliques dans un champ électrique. Le terme d'isoenzyme désigne des protéines présentant une même fonction enzymatique mais une migration différente en électrophorèse. Cette différence de mobilité électrophorétique est fonction de la masse moléculaire, de la conformation et de la charge électrique de la protéine

(Murphy *et al.*, 1990). La charge électrique globale d'une protéine est la résultante des charges électriques élémentaires des acides aminés qui la constituent. Des différences de charge électrique entre deux protéines traduisent en règle générale des différences dans leurs structures primaires, et partant, dans la séquence des gènes qui codent pour ces protéines. Les isoenzymes sont donc considérées comme des marqueurs génétiques puisqu'elles permettent la mise en évidence indirecte des variations de la séquence du génome.

Pour cette étude, les migrations ont été conduites sur deux types de supports : acrylamide-agarose et acétate de cellulose.

6.2. Préparation des extraits protéiques

Deux protocoles d'extraction des protéines ont été mis en œuvre selon le support de migration utilisé par la suite.

6.2.1. Migration en gel d'acrylamide-agarose

Pour la migration en gel d'acrylamide-agarose, les cellules sont lysées par action des ultra-sons.

Ainsi le culot cellulaire est repris dans un volume égal de tampon Tris 75 mM, Glycine 62 mM, pH 8,7. L'insonation est réalisée à froid dans de la glace fondante à raison de 3 fois 20 secondes et 2 fois 15 secondes en laissant refroidir 5 minutes entre chaque impulsion. Le lysat est centrifugé (12000 g, 10 minutes, 4°C). Le surnageant, qui constitue l'extrait protéique, est aliquoté et conservé à -80°C.

6.2.2. Migration sur support acétate de cellulose

Pour la migration sur support acétate de cellulose, les cellules sont lysées chimiquement.

Ainsi, les cellules sont lysées à froid, dans de la glace, par addition d'un volume égal (1 µl/mg de culot) d'une solution stabilisatrice (NADP 0,01% (w/v), β-mercaptoethanol 0,1% (v/v), Triton X100 0,1% (v/v)) (Richardson, Baverstock & Adams, 1986). Après 20 minutes dans la glace, le lysat est centrifugé (12000 g, 10 minutes, 4°C). Le surnageant est aliquoté et conservé à -80°C.

6.3. Systèmes enzymatiques étudiés

6.3.1. Migration en gel d'acrylamide-agarose

Parmi les 10 activités enzymatiques recherchées par migration en gel d'acrylamide-agarose (cf. Annexe 3), seules ont été retenues celles appartenant à la famille des estérases.

6.3.2. Migration sur support acétate de cellulose

Parmi les 30 activités enzymatiques recherchées sur support acétate de cellulose (cf. Annexe 3), 9 seulement ont été retenues, car les autres présentaient un pourcentage excessif d'allèles nuls, qui auraient rendu malaisée l'interprétation des résultats.

Finalement, parmi les 30 systèmes enzymatiques différents recherchés sur les deux supports, 10 ont été retenus (Tableau II.3).

Tableau II.3 : Systèmes enzymatiques retenus pour l'étude par Multilocus Enzyme Electrophoresis

Enzymes et voies métaboliques	Abbréviations	Code EC
Biosynthèse des acides aminés		
Aspartate aminotransférase	GOT	EC 2.6.1.1
Glutamate deshydrogénase (NADP+)	GDH (NADP+)	EC 1.4.1.4
Détoxification		
Superoxyde dismutase	SOD	EC 1.15.1.1
Métabolisme énergétique		
Glucose 6 phosphate deshydrogénase	G6PD	EC 1.1.1.49
Isocitrate deshydrogénase	IDH	EC 1.1.1.42
Conservation et conversion des nucléosides et nucléotides		
Adenylate kinase	AK	EC 2.7.4.3
Nucléoside phosphorylase	NP	EC 2.4.2.1
Dégradation des protéines		
Peptidase leu-leu-leu	PEP 1	EC 3.4.22.3
Autres		
Diaphorases (NADH)	DIA (NADH)	EC 1.6.2.2
Estérases	EST	EC 3.1.1.1

Note : EC : Enzyme Collection.

6.4. Dépôts et migration

6.4.1. Migration en gel d'acrylamide-agarose

6.4.1.1. Préparation du gel

La migration des estérases a été réalisée en gel d'acrylamide-agarose (dimension : 24 cm x 18,5 cm).

Une solution d'acrylamide (7% w/v) – NN'-méthylène-bisacrylamide (0,18% w/v) – agarose (0,8% w/v) additionnée de Temed (0,06% v/v) et de persulfate d'ammonium (0,15% w/v), et préalablement placée à 50°C, est coulée entre deux plaques de verre placées horizontalement. L'ensemble est maintenu à 60°C pendant 35 minutes, pour permettre la polymérisation de l'acrylamide ; puis est placé à 4°C pendant 45 minutes, pour permettre à l'agarose de gélifier entre les mailles du gel d'acrylamide. Après démoulage, le gel, de 3 mm d'épaisseur, est immergé dans le tampon d'imbibition Tris 75 mM, Glycine 62 mM, pH 8,7 pendant 13 jours. Vingt quatre heures avant l'électrophorèse, le gel est immergé dans du tampon d'imbibition frais (Uriel, 1966).

6.4.1.2. Electrophorèse

Le dispositif de migration est constitué de deux bacs sur lesquels repose une plaque support en plastique. Les deux bacs sont remplis avec 1 litre de tampon de migration Tris 10 mM, Glycine 333 mM, pH 8,7.

Avant l'électrophorèse, le gel est rincé à l'eau, puis séché entre deux feuilles de papier filtre. Le gel est ensuite placé sur la plaque, les bords du gel trempant dans le tampon de migration. Les 10 puits de dépôt sont découpés à l'emporte-pièce.

100 µl d'extrait enzymatique sont mélangés à 100 µl d'une solution d'agarose 1,6% w/v additionnée d'une goutte de bleu de bromophénol et maintenue à 42°C. 60 µl de chacun des mélanges échantillon-agarose sont déposés dans chacun des puits. Le gel est recouvert d'une feuille de cellophane pour éviter les pertes d'eau par évaporation lors de l'électrophorèse. Des pains de glace sont placés sous la plaque support afin de refroidir le système de migration. La migration est réalisée sous une tension de 10 Volts/cm, et est stoppée quand le bleu de bromophénol a parcouru 13 cm, soit après environ 3 heures.

6.4.2. Migration sur support acétate de cellulose

6.4.2.1. Préparation du support

La majorité des électrophorèses ont été réalisées sur des plaques d'acétate de cellulose (dimension : 9,5 cm x 7,5 cm) (Helena®, Beaumont, Texas, USA) prêtes à l'emploi. La quantité d'extrait cellulaire nécessaire est très faible, la migration est rapide et dure au plus 30 minutes.

La plaque est imbibée pendant 20 minutes dans le tampon d'imbibition, qui est fonction de l'enzyme étudiée (Tableau II.4). L'excès de liquide est éliminé par application rapide sur du papier absorbant et les échantillons sont déposés à l'aide d'un peigne (Helena). Le peigne est constitué de 12 dents permettant le dépôt d'environ 0,3 µl d'extrait pour 12 souches différentes. Un ou plusieurs dépôts sont nécessaires suivant le système enzymatique étudié.

Tableau II.4 : Conditions de migration en gel d'acétate de cellulose des systèmes enzymatiques de *Helicobacter pylori*.

Enzymes	Tampon d'imbibition (facteur de dilution) ^a	Tampon de migration (facteur de dilution) ^a	Voltage (V)	Temps (min)	Nombre de dépôt
Adenylate kinase	0.25	0.50	200	30	3
Aspartate amino-transférase	0.25	0.50	160	30	3
Diaphorase (NADH)	0.50	0.70	200	30	3
Glucose-6-phosphate deshydrogénase	0.25	0.50	160	30	3
Glutamate deshydrogénase (NADP+)	0.35	0.50	200	30	3
Isocitrate deshydrogénase	0.25	0.40	200	30	1
Nucléoside Phosphorylase	0.25	0.50	200	20	3
Peptidase L-leu-leu-leu	0.70	0.70	200	30	1
Superoxide dismutase	0.25	0.50	200	20	3

^a Le tampon de migration et d'imbibition utilisé pour tous les systèmes enzymatiques étudiés est le tampon TBE (Tris 1 M, Borate 1,3 M, EDTA 0,03 M, pH 8).

6.4.2.2. Electrophorèse

L'électrophorèse est réalisée dans une cuve constituée de deux compartiments internes et deux compartiments externes. Les deux compartiments externes sont remplis avec 50 ml de tampon de migration, de même nature que le tampon d'imbibition mais dont la concentration

peut être différente. Les deux compartiments internes sont remplis de glace fondante. Le passage du courant est assuré par des bandelettes de papier-filtre qui sont mises en contact avec le tampon de migration.

La plaque est placée entre les électrodes ainsi constituées, immédiatement après le dépôt des extraits enzymatiques. Une plaque de verre fait pression sur la plaque d'acétate de cellulose afin d'assurer un passage régulier du courant sur toute la largeur de la plaque. La migration s'effectue dans une pellicule de tampon à la surface de la plaque. Les conditions de migration sont indiquées dans le tableau II.4.

6.5. Révélation

Les isoenzymes sont révélées par des procédés biochimiques. En présence de leur substrat spécifique et des cofacteurs nécessaires à leur activité (coenzymes, enzymes de liaison, ions), les isoenzymes transforment le substrat à l'emplacement où elles se trouvent dans le gel : il suffit que l'un des composés de la réaction soit colorable pour mettre en évidence la position de l'enzyme. Certaines réactions enzymatiques produisent un corps qui se combine directement à un chromogène (Fast Blue BB salt) pour donner un précipité coloré. D'autres, comme c'est le cas pour la plupart des deshydrogénases, catalysent le transfert d'un atome d'hydrogène du substrat à une coenzyme : cet atome peut être transféré sur un sel de tétrazolium pour donner un précipité de couleur bleue, le formazan.

6.5.1. Coloration après migration en gel d'acrylamide-agarose

Les estérases sont révélées selon la technique de Uriel (Uriel, 1961), en plaçant le gel dans une solution de coloration. La coloration est effectuée à température du laboratoire pendant 30 minutes à 1 heure, sous agitation et à l'obscurité, pour éviter les phénomènes d'oxydation dus à la lumière. La coloration est arrêtée en plaçant les gels dans un bain fixateur (Acide acétique 5% v/v, Méthanol 20% v/v, Glycérol 2,5% v/v) pendant 24 heures. Enfin, les gels sont mis à sécher entre deux feuilles de cellophane sur une plaque de verre.

6.5.2. Coloration après migration sur support acétate de cellulose

La révélation s'effectue sur un milieu solide constitué d'un mélange de 10 ml d'agarose à 1,2% w/v et de 10 ml de solution de coloration spécifique de l'enzyme. La solution de coloration

est ajoutée à l'agarose 1,2% w/v maintenu à 60°C. Le mélange est coulé dans une boîte de Petri et refroidi à l'obscurité.

En fin de migration, la plaque d'acétate de cellulose est déposée sur le gel d'agarose, et l'ensemble est incubé à 37°C. Après un temps de révélation jugé suffisant (de 3 à 15 minutes), les plaques sont plongées dans un bain fixateur (acide acétique 5% v/v, 5 minutes), puis rincées à l'eau et séchées à l'air libre.

6.6. Lecture et interprétation des profils

Chaque souche est caractérisée par un génotype résultant des variants électrophorétiques de chaque enzyme, et donc de chaque locus.

Une lecture allélique des zymogrammes a pu être réalisée pour 8 des systèmes enzymatiques étudiés. En effet, pour ces 8 systèmes enzymatiques, les variants électrophorétiques correspondaient à une seule bande de mobilité, celle-ci pouvant être différente suivant les souches. En revanche, pour l'activité diaphorase et l'activité estérase, une ou plusieurs bandes électrophorétiques ont été obtenues pour chaque souche, et chaque combinaison de bandes a été considérée comme un variant électrophorétique distinct ou comme un génotype de composition allélique inconnue.

7. METHODES D'ANALYSE DES RESULTATS

7.1. Indices de variabilité génétique

7.1.1. Diversité génétique moyenne

La diversité génétique (h_j) pour un locus j donné est calculée telle que :

$$h_j = 1 - \sum x_{ij}^2 [n/(n-1)] \quad (\text{Nei, 1978})$$

avec x_{ij}^2 : fréquence relative du $i^{\text{ème}}$ allèle au locus j

n : nombre d'isolats considérés ou nombre de types électrophorétiques (ET) dans l'échantillon

et $[n/(n-1)]$: correction de biais pour les échantillons de petite taille.

La diversité génétique moyenne par locus (H) est la moyenne arithmétique de (h_j) pour tous les locus considérés :

$$H = \sum h_j / r \quad \text{où } r : \text{ nombre de locus considérés}$$

La formule de la diversité génétique moyenne est mathématiquement identique à celle de l'hétérozygotie théorique moyenne, qui est une mesure de la fréquence théorique moyenne des génotypes à l'état hétérozygote dans un échantillon.

Cette formule peut être appliquée dans le cas du RAPD en assimilant le produit d'amplification obtenu pour chaque amorce comme un locus bien que chaque amorce amplifie un nombre particulier de locus, et qu'il n'est pas certain que pour une amorce donnée, les locus amplifiés soient les mêmes d'une souche à l'autre. Cette approche qui consiste à grouper les données de plusieurs locus n'entraîne pas de biais mais seulement une perte d'information (Tibayrenc, 1995a). De la même façon, la formule de la diversité génétique moyenne peut être appliquée dans le cas de la PCR-RFLP et du ribotypage en assimilant le produit de restriction obtenu avec chaque endonucléase comme un locus.

La diversité génétique à chaque locus (h_j) et la diversité génétique moyenne (H) sont calculées à partir du calcul des fréquences alléliques généré par le logiciel Genetics ToolBox (Noël, CEPM, IRD, Montpellier).

7.1.2. Diversité génotypique et indice de diversité génotypique

La diversité génotypique est calculée selon la même formule que la diversité génétique (h_j), où x_{ij}^2 est la fréquence relative du $i^{\text{ème}}$ ET au locus j et n est le nombre de ET.

L'indice de diversité génotypique est le rapport entre le nombre de génotypes différents et le nombre total de génotypes. Il peut être calculé pour un locus ou pour un ensemble de locus.

7.1.3. Distance génétique de Jaccard

La distance de Jaccard est une mesure qui permet d'apprécier le niveau de dissemblance entre deux individus (Jaccard, 1908). Seuls deux états de caractères sont

comparés : l'absence et la présence d'électromorphes ou de fragments électrophorétiques, dans le cas de MLEE, RAPD, RFLP ou PCR.

La distance de Jaccard (D_j) est reliée à l'indice de similitude de Jaccard (S_j) par la relation :

$$D_j = 1 - S_j \quad \text{avec} \quad S_j = a / (a + b + c)$$

- où
- a : nombre de caractères présents dans les deux génotypes
 - b : nombre de caractères présents dans le premier génotype et absents dans le second
 - c : nombre de caractères présents dans le second génotype et absents dans le premier.

L'indice de similitude de Jaccard considère comme non-informative la présence conjointe chez deux individus de l'un des deux états de caractères. Ainsi, ne sont pas considérés les fragments absents chez deux individus. En effet, dans le cas des RAPD et des RFLP, l'absence conjointe d'un fragment peut avoir pour origine plusieurs événements évolutifs indépendants (« homoplasie »). Dans le cas du MLEE, l'absence conjointe d'un électromorphe chez deux individus n'est pas informative puisqu'elle se traduit par la présence d'autres électromorphes. Prendre en compte l'absence conjointe d'un électromorphe reviendrait à donner plus de poids aux locus présentant le plus grand nombre d'allèles.

La distance de Jaccard est calculée à partir des données brutes à l'aide du logiciel Genetics ToolBox (Noël, CEPM, IRD, Montpellier).

7.2. Tests statistiques classiques

Des tests de Student ont été mis en œuvre afin de comparer les distances génétiques moyennes et les diversités génétiques moyennes obtenues pour différents groupes. Compte tenu que le test de Student (test t) est suffisamment robuste pour supporter des écarts relativement grands par rapport aux conditions d'application de la distribution binomiale (distribution normale et variances égales) (Scherrer, 1984), ce test a été jugé applicable dans la mesure où les distributions observées obéissaient globalement à une loi normale.

Par ailleurs, des tests de χ^2 ont été mis en œuvre afin de comparer les distributions observées et attendues des génotypes.

7.3. Méthodes de classification

7.3.1. Méthodes phénétiques

Les méthodes phénétiques se proposent de reconstruire des arbres en partant des similitudes globales observées entre chaque paire de souches. Elles reposent donc sur l'estimation d'une distance entre deux souches. La distance utilisée ici est la distance de Jaccard (Jaccard, 1908).

7.3.1.1. Méthodes agglomératives

Les méthodes agglomératives regroupent entre elles les souches qui se ressemblent le plus et situent des niveaux de hiérarchie entre elles sur la base de l'intensité de leur ressemblance.

La méthode UPGMA (unweighted pair-group method of arithmetic average) (Sneath & Sokal, 1973) est une méthode de classification hiérarchique où les souches les plus ressemblantes sont regroupées successivement. Cette méthode ne peut être considérée comme une méthode phylogénétique que si l'on fait l'hypothèse d'un taux d'évolution constant dans toutes les branches de l'arbre (ultramétrie des distances).

La méthode du « Neighbor-Joining » (Saitou & Nei, 1987) se fonde sur une stratégie différente d'agglomération et ne fait pas l'hypothèse d'un taux d'évolution constant dans toutes les branches de l'arbre. Elle produit un arbre non enraciné. La racine peut cependant être localisée par l'utilisation d'un groupe externe (« outgroup »), c'est à dire d'une souche dont on sait qu'elle a divergé antérieurement aux autres souches de l'étude.

La construction des dendrogrammes UPGMA et Neighbor-Joining a été réalisée à l'aide du programme Neighbor du logiciel PHYLIP, version 3.5c (Felsenstein, 1993). Les dendrogrammes ainsi construits peuvent être considérés comme des arbres phylogénétiques dans la mesure où les hypothèses de travail sont respectées (Darlu & Tassy, 1993).

Les arbres UPGMA et Neighbor-Joining ont été dessinés grâce au programme TreeView, version 1.4 (Page, 1996).

7.3.1.2. Méthode de parcimonie

Afin d'évaluer la confiance que l'on peut accorder à l'arbre obtenu, aux éventuels groupes qui se distinguent, ou à la longueur des branches, des procédures de ré-échantillonnages peuvent être mises en œuvre, et parmi celles-ci la méthode du bootstrap (Efron, 1979) (Felsenstein, 1985). Ces méthodes supposent que les caractères ont évolué indépendamment les uns des autres et suivent tous une même loi de distribution.

La méthode du bootstrap consiste à tirer au hasard avec remise en jeu un ensemble de k caractères parmi les K caractères que constituent les données brutes ; les caractères sont ainsi pondérés de manière aléatoire. Le nouvel échantillon est soumis à une analyse phylogénétique par la méthode du maximum de parcimonie conduisant à l'obtention d'arbres. Cette procédure de ré-échantillonnage peut être effectuée n fois ($n = 100$, dans la présente étude), suivie chaque fois d'une recherche d'arbre. A partir des n arbres ainsi obtenus, un arbre est construit selon le principe de consensus majoritaire. Cet arbre consensus présente à chaque nœud les valeurs de « bootstrap » qui indiquent le nombre de fois où les mêmes regroupements ont été retrouvés parmi les n arbres. Le seuil de significativité des valeurs de « bootstrap » a été fixé à 90%.

Les procédures de bootstrap et de construction de l'arbre consensus ont été réalisées à l'aide des programmes Seqboot Mix et Consense du logiciel PHYLIP, version 3.5c (Felsenstein, 1993). L'arbre consensus a été dessiné grâce au programme TreeView, version 1.4 (Page, 1996).

7.3.2. Méthode d'analyses factorielles : analyse des correspondances multiples

Les méthodes d'analyse factorielle ont pour objectif de repérer les structures les plus fortes dans les populations que l'on étudie et d'éliminer les particularités ponctuelles qui gênent la perception générale des phénomènes. Elles peuvent ainsi être d'une très grande utilité lorsqu'on aborde l'étude de la diversité d'une espèce ou d'une population.

L'objet de ces méthodes est de produire une représentation géométrique des mesures de dissemblance entre les unités. Cette représentation permet de manipuler de manière concrète la notion de diversité. On aboutit ainsi à une décomposition hiérarchisée de la diversité, qui permet de distinguer les tendances fondamentales des variations particulières (Perrier, Flori & Bonnot, 1999).

L'analyse des correspondances multiples (ACM), aussi appelée analyse factorielle des correspondances (AFC), permet d'étudier des individus décrits par des variables qualitatives à modalités (Greenacre, 1984) (Lebart, Morineau & Warwick, 1984) (Tenenhaus & Young, 1985).

Cette méthode calcule les distances entre individus par la distance du χ^2 sur le tableau disjonctif complet (TCD). Dans le TCD, les lignes représentent les individus et les colonnes représentent les modalités des variables : à l'intersection de la ligne i et de la colonne k on trouve x_{ik} qui vaut 1 ou 0, selon que l'individu possède la modalité k ou non (Escoufier & Pagès, 1993).

L'ACM décrit la dispersion sous forme d'un nuage de points correspondant aux n individus ou p variables dans un espace multidimensionnel en remplaçant l'ensemble des données originales par un nouvel ensemble de coordonnées linéaires orthogonales dans un espace de plus petite dimension. Le plan factoriel est défini par les deux premiers axes principaux de l'analyse ; le premier axe F1 rend compte de la plus grande variance et le second axe F2, perpendiculaire à l'axe F1, rend compte de la plus grande part de la variance qui n'est pas prise en compte par l'axe F1. Ainsi, dans cette représentation, deux individus seront d'autant plus distants l'un de l'autre qu'ils présentent de nombreuses modalités différentes et que ces modalités sont rares (Perrier *et al.*, 1999).

L'analyse des correspondances multiples (ACM) a été réalisée sur le logiciel ADE-4 (Thioulouse et Chessel, Laboratoire de Biométrie, Université Claude Bernard Lyon I) (Thioulouse *et al.*, 1997).

7.4. Méthodes d'analyse de génétique des populations

Afin d'estimer l'impact des échanges génétiques au sein d'une population, différentes méthodes statistiques ont été décrites. Celles-ci prennent comme hypothèse nulle une situation où les échanges génétiques se produisent de manière aléatoire (panmixie). Parmi ces méthodes, certaines sont applicables ou ont été décrites chez les organismes haploïdes, et n'imposent pas une interprétation allélique des données.

7.4.1. Indice d'association entre les locus (I_A)

L'indice I_A , proposé par Maynard-Smith *et al.* (1993) sur la base des travaux de Brown *et al.* (1980), répond à la nécessité de mesurer de façon non équivoque l'étendue de la clonalité dans les populations bactériennes, et de pouvoir ainsi comparer la structure des populations d'espèces occupant des niches écologiques différentes.

Ainsi, le déséquilibre de liaison multilocus dans une population haploïde est calculé sur la base de la distribution des différences alléliques entre les paires d'isolats bactériens sur l'ensemble des locus examinés. Le rapport de la variance observée parmi les différences alléliques, (V_o), sur la variance attendue dans le cas d'une population panmictique, (V_e), fournit une mesure du déséquilibre de liaison qui est exprimée telle que :

$$I_A = V_o / V_e - 1$$

avec $V_e = \sum h_j (1 - h_j)$

où $h_j = 1 - \sum x_{ij}^2$, qui est l'expression de la diversité génétique de Nei (sans la correction biais pour les petits échantillons) (Nei, 1978).

Dans le cas où les locus sont totalement indépendants (hypothèse d'une population panmictique), la valeur I_A attendue est 0. Dans le cas où il existe un déséquilibre de liaison entre les locus, la valeur I_A diffère significativement de 0.

Toutefois, la seule valeur absolue de l'indice I_A n'est pas suffisante pour conclure au degré de clonalité d'une population car dans une population non recombinante la valeur de I_A augmente avec le nombre de locus étudiés. En conséquence, l'indice I_A s'exprime en ajoutant la valeur de l'erreur standard à la valeur I_A ($I_A \pm SE$).

Sur la base de la mesure de l'indice I_A , trois grand types de structure des populations bactériennes ont été décrites : la clonalité « stricte », la clonalité épidémique et la structure recombinante (Maynard Smith *et al.*, 1993).

L'indice I_A est calculé à partir des données brutes à l'aide du logiciel Genetics ToolBox (Noël, CEPM, IRD, Montpellier).

7.4.2. Tests de déséquilibre de liaison

A la différence des tests de ségrégation basés sur l'équilibre de Hardy-Weinberg, les tests de déséquilibre de liaison sont applicables sur des espèces haploïdes et sur des marqueurs dont l'interprétation peut ne pas être allélique, comme c'est le cas des marqueurs RAPD et RFLP (Tibayrenc, Kjellberg & Ayala, 1990).

Le test f calcule la probabilité d'observer un niveau de déséquilibre de liaison au niveau de l'ensemble des locus égal ou supérieur à celui qui est effectivement observé dans l'échantillon.

Le test f' calcule la probabilité d'observer un niveau de déséquilibre de liaison entre deux locus ou deux profils électrophorétiques donnés, égal ou supérieur à celui qui est effectivement observé.

Les tests f et f' sont basés sur une simulation de Monte-Carlo avec 10^4 tirages aléatoires et comptabilisent le nombre d'occurrences du paramètre considéré. Le seuil de significativité des tests f et f' a été fixé à 1%.

Le test g calcule la probabilité d'obtenir une corrélation entre deux séries de marqueurs génétiques indépendants égale ou supérieure à celle effectivement observée dans l'échantillon. Le test g repose sur un test non paramétrique (Mantel, 1967). Ce test consiste à comparer deux matrices de distances construites sur la base de deux jeux de caractères indépendants. Il fait appel à une simulation de Monte-Carlo avec 10^4 tirages, qui permutent au hasard les différentes cellules de l'une des deux matrices de distances. Il ne fait aucune inférence quant au degré de liberté, à la différence d'un test de corrélation classique. Le seuil de significativité du test g a été fixé à 5%.

Chacun de ces tests explore l'association non aléatoire de génotypes d'un locus à l'autre, et permet de mettre en évidence l'existence éventuelle d'une entrave aux flux géniques, qu'il s'agisse de clonalité, clonalité épidémique, spéciation biologique non reconnue, ou structuration géographique ou temporelle.

Les tests f , f' et g sont réalisés à l'aide du logiciel Genetics ToolBox (Noël, CEPM, IRD, Montpellier).

RESULTATS

III. RESULTATS

1. ESSAIS DE DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE

Des essais de culture sur différents milieux liquides et solides ont été réalisés. Ces essais visaient à obtenir une quantité de cellules bactériennes suffisante, notamment pour la mise en œuvre de la technique MLEE, grande consommatrice de biomasse.

1.1. Essais de culture en milieu liquide

Six essais de culture en milieu liquide ont été réalisés. Pour chaque essai, 3 souches de *H. pylori* ont été mises en culture. Les résultats des différents tests sont présentés dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Essais de culture de *Helicobacter pylori* en milieu liquide

Milieu de culture	Temps d'incubation (jours)	Agitation	Résultat
Trypcase-soja	3	Non	faible culot cellulaire ≤ 30% de formes bacillaires
Trypcase-soja	8	Non	faible culot cellulaire ≤ 30% de formes bacillaires
Trypcase-soja	2 + 2 + 3 ^a	Non	faible culot cellulaire ≤ 30% de formes bacillaires
Trypcase-soja + Polyvitex + sérum humain décomplémenté (10% v/v)	5	Oui	faible culot cellulaire ≤ 30% de formes bacillaires
Bouillon Cœur-Cervelle+ Polyvitex + sérum humain décomplémenté (10% v/v)	5	Oui	faible culot cellulaire ≈ 100% de formes coccoïdes
Bouillon Isosensitest + sérum de cheval décomplémenté (10% v/v)	5	Non	faible culot cellulaire ≈ 100% de formes coccoïdes

^a Dans cet essai, le milieu de culture Trypcase-soja est ajouté de façon séquentielle (5 ml + 50 ml + 25 ml) de façon à obtenir un volume de culture conséquent.

Quel que soit le milieu de culture liquide testé, quel que soit le temps d'incubation, que du milieu frais ait été ajouté ou non, que le milieu ait été agité ou non, la pousse de *H. pylori* a été très faible. Dans tous les cas, peu de formes bacillaires ont été obtenues, suggérant une perte de viabilité des bactéries. En outre, les contaminations ont été fréquentes.

1.2. Essais de culture en milieu solide Wilkins-Chalgren modifié

Quatre essais en milieu solide Wilkins-Chalgren modifié ont été réalisés. Pour chaque essai, 3 souches de *H. pylori* ont été mises en culture. Les résultats des différents tests sont résumés dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Essais de culture de *Helicobacter pylori* en milieu solide Wilkins-Chalgren modifié

Milieu de culture	Temps d'incubation (jours)	Résultat
Wilkins-Chalgren + Antibiotiques + sang humain (10% v/v)	5	important culot cellulaire ≤ 30% de formes bacillaires
Wilkins-Chalgren + Antibiotiques + sérum humain (10% v/v)	5	important culot cellulaire ≤ 30% de formes bacillaires
Wilkins-Chalgren + Antibiotiques + sérum humain décomplémenté (10% v/v)	5	important culot cellulaire ≤ 30% de formes bacillaires
Wilkins-Chalgren + Antibiotiques + sérum humain décomplémenté (10% v/v)	3	important culot cellulaire ≤ 30% ou ≥ 70% de formes bacillaires suivant les souches

Le milieu Wilkins-Chalgren modifié permet une pousse rapide de *H. pylori*. Toutefois, il s'avère difficile de standardiser les cultures des différentes souches. En effet, certaines cultures passent très rapidement sous forme coccoïde.

Devant la difficulté de mise au point de ces méthodes de culture, aucune d'entre elles n'a été retenue. Finalement, les cultures ont été réalisées sur des géloses commerciales sélectives, Pylori (BioMérieux, Marcy L'Etoile, France), et non sélectives, COS et TSH (BioMérieux, Marcy L'Etoile, France).

2. ETUDE DE LA STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS NATURELLES DE *HELICOBACTER PYLORI*

Pour étudier la structure génétique des populations naturelles de *H. pylori*, il a été fait appel à des marqueurs « spécialistes », c'est à dire des marqueurs génétiques spécifiquement présents dans l'espèce *H. pylori*, et des marqueurs « généralistes », c'est à dire des marqueurs génétiques applicables à l'étude de tout type de microorganismes.

L'ensemble des résultats bruts est indiqué dans les annexes 4a à 4e. Certaines des valeurs citées dans ce chapitre sont récapitulées dans l'annexe 5.

2.1. Etude de la structure génétique de *H. pylori* par des marqueurs « spécialistes »

2.1.1. Polymorphisme des gènes de l'uréase (*ureA-ureB*) et de la flagelline (*flaA*)

Dans un premier temps, des gènes présents et exprimés dans toutes les souches de *H. pylori*, *ureA-ureB* et *flaA*, ont été considérés. L'expression de ces gènes est, notamment, indispensable à l'établissement de l'infection.

2.1.1.1. Polymorphisme des gènes de l'uréase (*ureA-ureB*) étudié par PCR-RFLP

❖ Profils observés

Chacune des souches de *H. pylori* de l'étude présente un unique produit de PCR de 2,4 kb, correspondant à l'amplification d'une région comprise dans la séquence *ureA-ureB* (Labigne, Cussac & Courcoux, 1991) (Figure III.1a). Afin d'analyser le polymorphisme de la séquence amplifiée, les deux endonucléases *HaeIII* et *NdeII* ont été retenues. Ces deux endonucléases sont les plus couramment décrites pour le suivi épidémiologique des souches de *H. pylori* basé sur l'analyse de ces gènes.

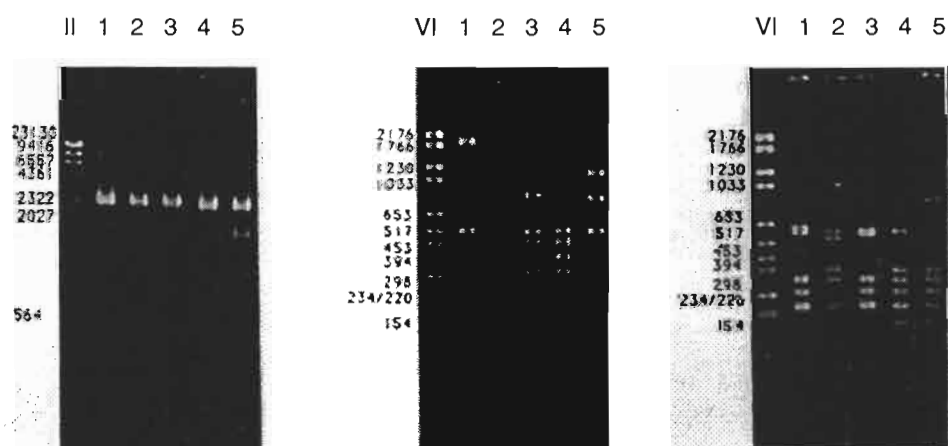


Figure III.1 : Analyse par PCR-RFLP des gènes de l'uréase (*ureA-ureB*) de souches de *Helicobacter pylori*.
 (a) Electrophorèse en gel d'agarose à 1% du produit amplifié correspondant à un fragment de 2,4 kb situé dans les gènes *ureA-ureB*.
 (b) Electrophorèse en gel d'agarose à 2% du produit amplifié digéré par *HaeIII*.
 (c) Electrophorèse en gel d'agarose à 2% du produit amplifié digéré par *NdeII*.
 Note : (II) et (VI) : marqueurs de masse moléculaire II et VI (Boehringer Mannheim) ; pistes 1 à 5 : souches de *H. pylori* P1, P5, P6, P15 et P25.

La digestion par *HaeIII* du produit de 2,4 kb distingue des profils composés de 2 à 7 fragments de masse moléculaire comprise entre 300 bp et 1800 bp (Figure III.1b). Un total de 17 fragments de masses moléculaires différentes est détecté parmi les souches, et la présence d'un fragment de 520 bp est notée dans 77 des 87 souches étudiées (88,5%). La combinaison de ces fragments permet de caractériser 51 profils de restriction différents. Un même profil de restriction est au plus partagé par 7 souches, sans distinction d'origine géographique ni clinique. La fréquence du type le plus représenté est de 8%.

La digestion par *NdeI* du produit de 2,4 kb distingue des profils composés de 1 à 8 fragments de masse moléculaire comprise entre 200 bp et 700 bp (Figure III.1c). Un total de 12 fragments de masses moléculaires différentes est détecté parmi les souches, et la présence de deux fragments de 350 bp et de 250 bp est notée dans 84 et 86 des 87 souches étudiées (soit 96,6% et 98,9% respectivement). La combinaison de ces fragments permet de caractériser 24 profils de restriction différents. Un même profil de restriction est au plus partagé par 34 souches, sans distinction d'origine géographique ni clinique. La fréquence du type le plus représenté est de 39%.

La masse moléculaire des différents fragments de restriction a été estimée afin de déterminer si la totalité de produit de départ était retrouvée après digestion. Comme attendu, la somme de la masse moléculaire des différents fragments obtenus après digestion par *HaeIII* est égale, aux erreurs de mesure près, à la masse du produit amplifié. En revanche, des différences de taille par rapport au produit de départ sont observées après digestion par *NdeI*. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la digestion peut donner lieu à des fragments de même taille qui migrent à la même position, et pour lesquels l'image d'un seul fragment apparaît. En outre, les bandes électrophorétiques de masse moléculaire inférieure à 100 bp ne sont pas considérées. Quoiqu'il en soit, cette lecture des profils électrophorétiques ne gêne en rien l'analyse consécutive des résultats.

❖ Diversité génétique moyenne

Pour l'analyse des résultats, la digestion par *HaeIII* du produit d'amplification *ureA-ureB* et la digestion par *NdeI* peuvent être considérés comme deux « locus » indépendants.

La diversité génétique au locus « *ureA-ureB/HaeIII* », calculée selon Nei [$H=1-\sum x_i^2(n/n-1)$] (Nei, 1978), est de 0,968, et la diversité génétique au locus « *ureA-ureB/NdeI* » est de 0,799. La diversité génétique moyenne dans l'échantillon est de 0,895.

❖ Diversité génotypique

L'analyse du polymorphisme de restriction des gènes *ureA-ureB* par les deux endonucléases révèle 73 génotypes « multilocus » *ureA-ureB* distincts, c'est à dire 73 génotypes résultant de la combinaison des profils de restriction obtenus par chacune des deux endonucléases (cf. annexe 5).

La diversité génotypique est de 0,998.

❖ Distance génétique de Jaccard moyenne

Pour ces marqueurs, la distance génétique de Jaccard moyenne pour les 87 souches de *H. pylori* analysées est de $0,477 \pm 0,146$.

2.1.1.2. Polymorphisme du gène de la flagelline (*flaA*) étudié par PCR-RFLP

❖ Profils observés

Chacune des souches de *H. pylori* de l'étude présente un unique produit de PCR de 1,5 kb, comme attendu d'après la séquence nucléotidique du gène *flaA* (Leying *et al.*, 1992) (Figure III.2a). Ce produit d'amplification a été soumis à l'action de deux endonucléases *HaeIII* et *NdeI*, et le polymorphisme de restriction a été analysé.

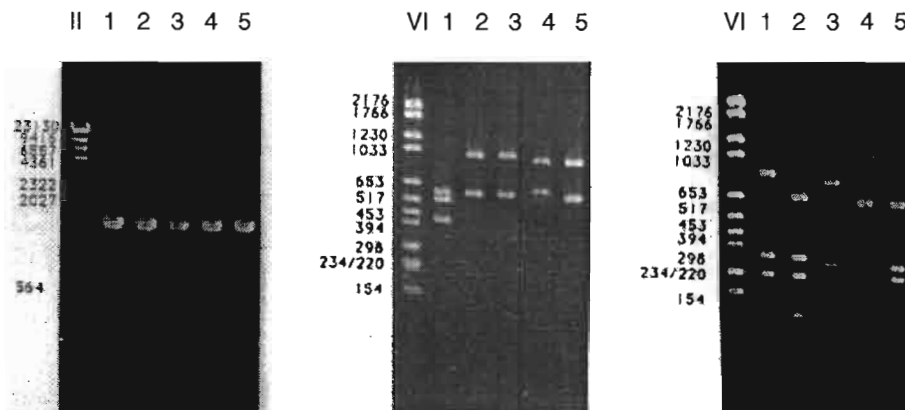


Figure III.2 : Analyse par PCR-RFLP du gène de la flagelline (*flaA*) de souches de *Helicobacter pylori*.
 (a) Electrophorèse en gel d'agarose à 1% du produit amplifié correspondant à un fragment de 1,5 kb situé dans le gène *flaA*.
 (b) Electrophorèse en gel d'agarose à 2% du produit amplifié digéré par *HaeIII*.
 (c) Electrophorèse en gel d'agarose à 2% du produit amplifié digéré par *NdeI*.
 Note : (II) et (VI) : marqueurs de masse moléculaire II et VI (Boehringer Mannheim) ; pistes 1 à 5 : souches de *H. pylori* P91, P122, P123, P124 et P127.

La digestion par *HaeIII* du produit de 1,5 kb distingue des profils composés de 2 à 3 fragments de masse moléculaire comprise entre 400 bp et 1100 bp (Figure III.2b). Comme

attendu la somme de la masse moléculaire des différents fragments est égale, aux erreurs de mesure près, à la masse du produit amplifié. Un total de 9 fragments de masses moléculaires différentes est détecté parmi les souches, et la présence d'un fragment de 600 bp est notée dans 84 des 87 souches étudiées (96,6%). La combinaison de ces fragments permet de caractériser 7 profils de restriction différents. Un même profil de restriction est au plus partagé par 63 souches, sans distinction d'origine géographique ni clinique. La fréquence du type le plus représenté est de 72,4%.

La digestion par *Nde*II du produit de 1,5 kb distingue des profils composés de 1 à 5 fragments de masse moléculaire comprise entre 200 bp et 850 bp (Figure III.2c). Comme attendu la somme de la masse moléculaire des différents fragments est égale, aux erreurs de mesure près, à la masse du produit amplifié. Un total de 13 fragments de masses moléculaires différentes est détecté parmi les souches, et la présence d'un fragment de 300 bp est notée dans 71 des 87 souches étudiées (81,6%). La combinaison de ces fragments permet de caractériser 29 profils de restriction différents. Un même profil de restriction est au plus partagé par 16 souches, sans distinction d'origine géographique ni clinique. La fréquence du type le plus représenté est de 18,3%.

❖ Diversité génétique moyenne

La diversité génétique moyenne dans l'échantillon est de 0,691.

❖ Diversité génotypique

L'analyse du polymorphisme de restriction du gène *flaA* par les deux endonucléases révèle 42 génotypes « multilocus » *flaA* distincts.

La diversité génotypique est de 0,962.

❖ Distance génétique de Jaccard moyenne

La distance génétique de Jaccard moyenne pour les 87 *H. pylori* de l'étude est de $0,473 \pm 0,249$.

2.1.1.3. Polymorphisme comparé des gènes *ureA-ureB* et *flaA*

❖ Diversité génétique moyenne

La diversité génétique moyenne observée pour les gènes *ureA-ureB* est supérieure à la diversité génétique moyenne observée pour le gène *flaA*. La distribution des données obéissant globalement à une loi normale, les diversités génétiques révélées par l'étude des gènes *ureA-ureB* et par l'étude du gène *flaA* ont été comparées par des tests de Student. Ainsi, il apparaît que les diversités génétiques révélées par les marqueurs *ureA-ureB* et *flaA* ne sont pas significativement différentes. A la différence du gène *ureA-ureB*, le polymorphisme de restriction du gène *flaA* mis en évidence par l'endonucléase *HaeIII* est moindre que le polymorphisme de restriction mis en évidence par l'endonucléase *NdeI*.

❖ Analyses phénétiques de classification

Les distances génétiques de Jaccard observée pour les gènes *ureA-ureB* et *flaA* obéissent globalement à une loi normale. Ceci suggère que l'ensemble des souches considérées forme un seul groupe taxonomique.

La distance génétique de Jaccard moyenne observée pour les gènes *ureA-ureB* n'est pas significativement différente de la distance génétique de Jaccard moyenne observée pour le gène *flaA*, d'après les tests de Student.

La méthode phénétique de construction d'arbres UPGMA (Sneath & Sokal, 1973) a été employée pour représenter les relations hiérarchiques entre les souches de *H. pylori* à partir de la matrice des distances génétiques de Jaccard. Les dendrogrammes ainsi construits à partir de l'analyse de chacun de ces gènes ne montrent pas de structuration au sein de l'échantillonnage étudié (figures non présentées).

L'analyse combinée des données obtenues pour les gènes *ureA-ureB* et *flaA* conduit à une distance génétique de Jaccard moyenne ($0,475 \pm 0,149$) similaire à celles calculées pour l'analyse de ces gènes indépendamment, mais a une distance génétique maximale réduite. De la même façon que pour l'analyse indépendante des données obtenues pour ces gènes, il n'apparaît aucune structuration sur le dendrogramme (Figure III.3).

❖ Analyse de génétique des populations

La fréquence des recombinaisons dans les populations naturelles peut être estimée en mettant en œuvre des tests de déséquilibre de liaison : soit l'indice d'association entre les locus (I_A) (Brown, Feldman & Nevo, 1980) (Maynard Smith *et al.*, 1993), soit les tests spécifiques proposés par Tibayrenc *et al.* (1990).

Les indices d'association entre les locus (I_A) calculés pour les 87 souches de *H. pylori* de l'étude à partir de l'analyse du polymorphisme de restriction des gènes *ureA-ureB* et *flaA* sont de $-0,078 \pm 0,033$ et de $0,023 \pm 0,014$, respectivement, et ne sont pas significativement différents de zéro. L'analyse combinée des données obtenues pour les gènes *ureA-ureB* et *flaA* conduit au

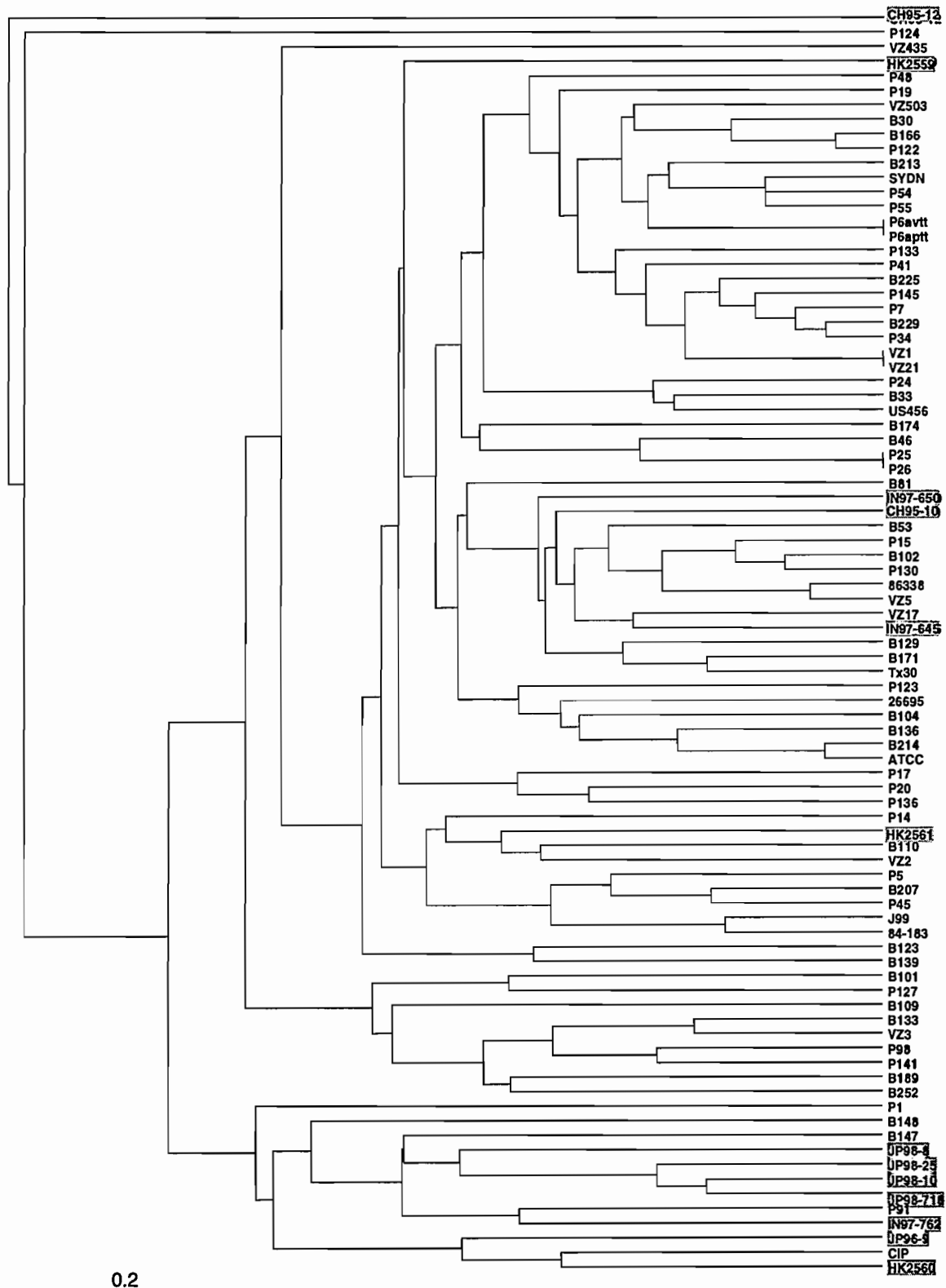


Figure III.3 : Dendrogramme UPGMA construit pour les 87 souches de *Helicobacter pylori* de l'étude à partir des données de PCR-RFLP des gènes *ureA-ureB* et *flaA*.

Note : L'échelle indique la distance génétique de Jaccard le long des branches de l'arbre. L'origine géographique des souches est indiquée : B=Brest (France), P=Poitiers (France), VZ=Venezuela, HK=Hong-Kong, CH=Chine, JP= Japon, IN= Inde. Les souches asiatiques sont indiquées en gris.

même résultat ($I_A=0,019\pm0,019$). Ces résultats répondent au modèle panmictique décrit par Maynard-Smith *et al.* (1993).

Les tests de déséquilibre de liaison f et f' calculent respectivement les associations entre l'ensemble des locus et les associations entre les locus pris deux à deux. Ces tests réalisés sur les données brutes obtenues pour les deux marqueurs séparément sont non significatifs. L'analyse combinée des données obtenues pour les gènes *ureA-ureB* et *flaA* conduit au même résultat.

Par ailleurs, il n'existe aucune congruence entre les données *ureA-ureB* et les données *flaA* d'après le test g conduit sur les matrices de distance.

2.1.2. Polymorphisme des gènes codant pour les facteurs de virulence *vacA* et *cagA* et la séquence d'insertion IS605

Dans un deuxième temps, les gènes *vacA* et *cagA* et la séquence d'insertion IS605 ont été considérés. Le gène *vacA* est présent dans toutes les souches de *H. pylori*, mais n'est exprimé que par certaines d'entre elles. Le gène *cagA* s'exprime dans toutes les souches possédant le gène ; le gène *cagA* est un marqueur de l'îlot de pathogénicité *cag*. Les gènes *vacA* et *cagA* sont considérés comme des marqueurs de virulence dans les populations de souches occidentales. La séquence d'insertion IS605 est retrouvée à plusieurs endroits sur le chromosome de la bactérie, et est parfois retrouvée dans l'îlot *cag* où elle est susceptible d'affecter la virulence conférée par la présence de celui-ci.

2.1.2.1. Polymorphisme du gène *vacA* révélé par PCR

La distribution des types alléliques m1 et m2 a été déterminée par PCR pour l'ensemble des souches de l'étude, grâce aux couples d'amorces définis par Atherton *et al.* (1995) (Figure III.4a). Parmi les 87 souches de *H. pylori*, 33 (37,9%) présentent le type m1 et 50 (57,5%) présentent le type m2. Quatre souches (4,6%) ne peuvent être typées m1 ou m2 et sont alors désignées m0 (Tableau III.3).

De la même façon, le type s1 ou s2 de la séquence signal a été déterminé pour chacune des souches. Soixante sept souches (77,0%) présentent le type s1 et 20 souches (23,0%) présentent le type s2. Pour différencier les séquences signal de type s1a et s1b, et pour confirmer la présence de la séquence s2, trois couples d'amorces ont été utilisés : l'amorce sens (SS1-F, SS3-F et SS2-F) a une séquence basée sur la région codant pour la seconde moitié de la séquence signal et l'amorce antisens (VA1-R) est conservée. Ainsi ce second couple

d'amorces apporte la confirmation du type s2 décrit pour 20 souches (Figure III.4b). Parmi les 87 souches de l'étude, 43 sont de type s1a (49,4%) et 18 sont de type s1b (20,7%). Pour 6 souches (6,9%) de types s1, le sous type s1a ou s1b n'a pu être déterminé, en raison d'une absence d'amplification (Tableau III.3).

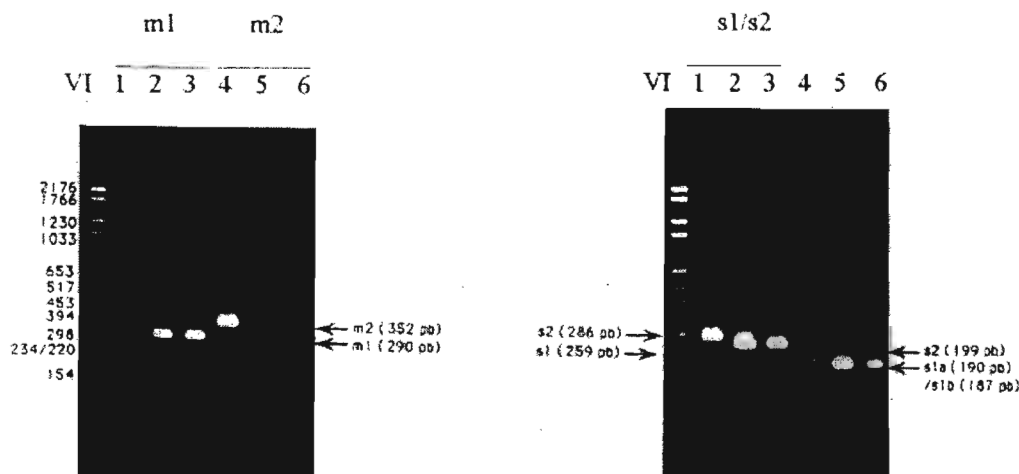


Figure III.4 : Typage par PCR des allèles du gène *vacA* de souches de *Helicobacter pylori*.

- (a) Recherche de l'allèle m1 amplifié par le couple d'amorces VA3-F/VA3-R
Recherche de l'allèle m2 amplifié par le couple d'amorces VA4-F/VA4-R
- (b) Recherche des allèles s1 et s2 amplifiés par le couple d'amorces VA1-F/VA1-R
Recherche de l'allèle s2 amplifié par le couple d'amorces SS2-F/VA1-R
Recherche de l'allèle s1a amplifié par le couple d'amorces SS1-F/VA1-R
Recherche de l'allèle s1b amplifié par le couple d'amorces SS3-F/VA1-R

Note : (VI) : marqueur de masse moléculaire VI (Boehringer Mannheim) ; pistes 1 et 4 : B104 (m2/s2), pistes 2 et 5 : B109 (m1/s1a), pistes 3 et 6 : B110 (m1/s1b).

Tableau III.3 : Répartition des fréquences des génotypes *vacA* pour les 87 souches de *Helicobacter pylori* de l'étude

	Séquence signal (%)				Total
	s1a	s1b	s1	s2	
Séquence médiane					
m1	18,4	14,9	4,6	0,0	37,9
m2	27,6	4,6	2,3	23,0	57,5
m0	3,4	1,1	0,0	0,0	4,6
Total	49,4	20,7	6,9	23,0	100,0

Ainsi, à l'exception de la combinaison allélique s2/m1, toutes les combinaisons alléliques possibles pour le gène *vacA* sont trouvées.

Afin de déterminer s'il existe une association particulière des différents sous-types *vacA* s et m, des tests de χ^2 ont été réalisés. Ainsi, comme observé, il apparaît que le type *vacA* s2 est strictement associé au type *vacA* m2 ($p < 0,001$). Au seuil de 2%, il apparaît que le sous-type s1b est préférentiellement associé au sous-type m1.

2.1.2.2. Détection du gène *cagA* par PCR

La présence du gène *cagA* a été détectée, grâce au couple d'amorces défini par Peek *et al.* (1995b), pour 55 des 87 souches de l'étude (63,2%) (Tableau III.4). Comme attendu, l'amplification du gène *cagA* révèle, dans le cas où le gène est présent, un unique produit de 349 bp.

2.1.2.3. Détection de la séquence d'insertion IS605 par PCR

La présence de la séquence d'insertion IS605 a été détectée grâce au couple d'amorces défini par Höök-Nikanne *et al.* (1998) pour 41 souches des 87 souches de l'étude (47,1%) (Tableau III.4). Comme attendu, l'amplification de l'IS605 révèle, dans le cas où la séquence d'insertion est présente, un unique produit de 360 bp.

2.1.2.4. Analyse comparée des gènes *vacA* et *cagA* et de la séquence d'insertion IS605

- ❖ Relation entre les génotypes *vacA* et la présence du gène *cagA* et de la séquence d'insertion IS605

Des tests de χ^2 ont été réalisés afin de déterminer s'il existe d'éventuelles associations entre ces facteurs spécifiques de l'espèce *H. pylori*. En effet, de telles associations peuvent être attendues dans la mesure où le gène *cagA* code pour un antigène associé à la cytotoxine vacuolisante VacA, et dans la mesure où la présence de la séquence d'insertion IS605 a été décrite dans l'îlot de pathogénicité *cag* qui porte le gène *cagA*.

Ainsi, il apparaît que la présence du gène *cagA* est préférentiellement associée au génotype *vacA* s1m1 ($p < 0,001$), qu'il s'agisse du sous-type s1a ou s1b.

En revanche, la présence de la séquence d'insertion IS605 ne semble associée ni au statut *cagA* de la souche, ni à son génotype *vacA* s ou m (Tableau III.4).

Le sous-type s1a ou s1b n'a pu être déterminé pour 6 des 67 souches de type s1 (soit 8,9% des souches s1), et, au sens du χ^2 , les associations entre les locus *vacA*, *cagA* et IS605, quand elles existent, sont indépendantes du sous-type s1. En conséquence, dans la suite de l'analyse, les sous-types s1a ou s1b du gène *vacA* n'ont pas été considérés ; seuls ont été pris

en compte les types s (1 ou 2) et m (1 ou 2) du gène *vacA*, les statuts *cagA* (présence ou absence) et IS605 (présence ou absence).

Tableau III.4 : Relation entre le type *vacA* et le statut *cagA* pour les 87 souches de *Helicobacter pylori* de l'étude

	type <i>vacA</i> (%)				Total
	s1m1	s1m2	s1m0	s2m2	
statut <i>cagA</i>					
<i>cagA</i> +	35,6	19,5	4,6	3,4	63,2
<i>cagA</i> -	2,3	14,9	0,0	19,5	36,8
Total	37,9	34,5	4,6	23,0	100,0
χ^2					<10 ⁻⁴
statut IS605					
IS605+	17,2	20,7	1,1	8,0	47,1
IS605-	20,7	13,8	3,4	14,9	52,9
Total	37,9	34,5	4,6	23,0	100,0
χ^2					NS

❖ Diversité génétique moyenne

La diversité génétique moyenne dans l'échantillon est de 0,454.

❖ Analyses phénétiques de classification

La distance génétique de Jaccard moyenne pour les 87 souches de *H. pylori* de l'étude est de 0,443±0,282.

L'arbre UPGMA construit à partir de la matrice des distances génétiques de Jaccard montre une structure dichotomique (Figure III.5). Les deux grappes principales scindent l'échantillon suivant le statut *cagA* des souches (à 2 exceptions près : B33 et P7).

❖ Analyses de génétique des populations

L'indice I_A apparaît significativement différent de zéro ($I_A=0,304\pm0,017$). Ceci suggère, d'après les modèles de Maynard-Smith *et al.* (1993), une association non aléatoire des locus *vacA*, *cagA* et IS605.

Le test *f* est significatif (à $p<10^{-4}$) ; ceci est en accord avec les tests du χ^2 qui révèlent une association entre le statut *cagA* et le type *vacA* s de la souche.

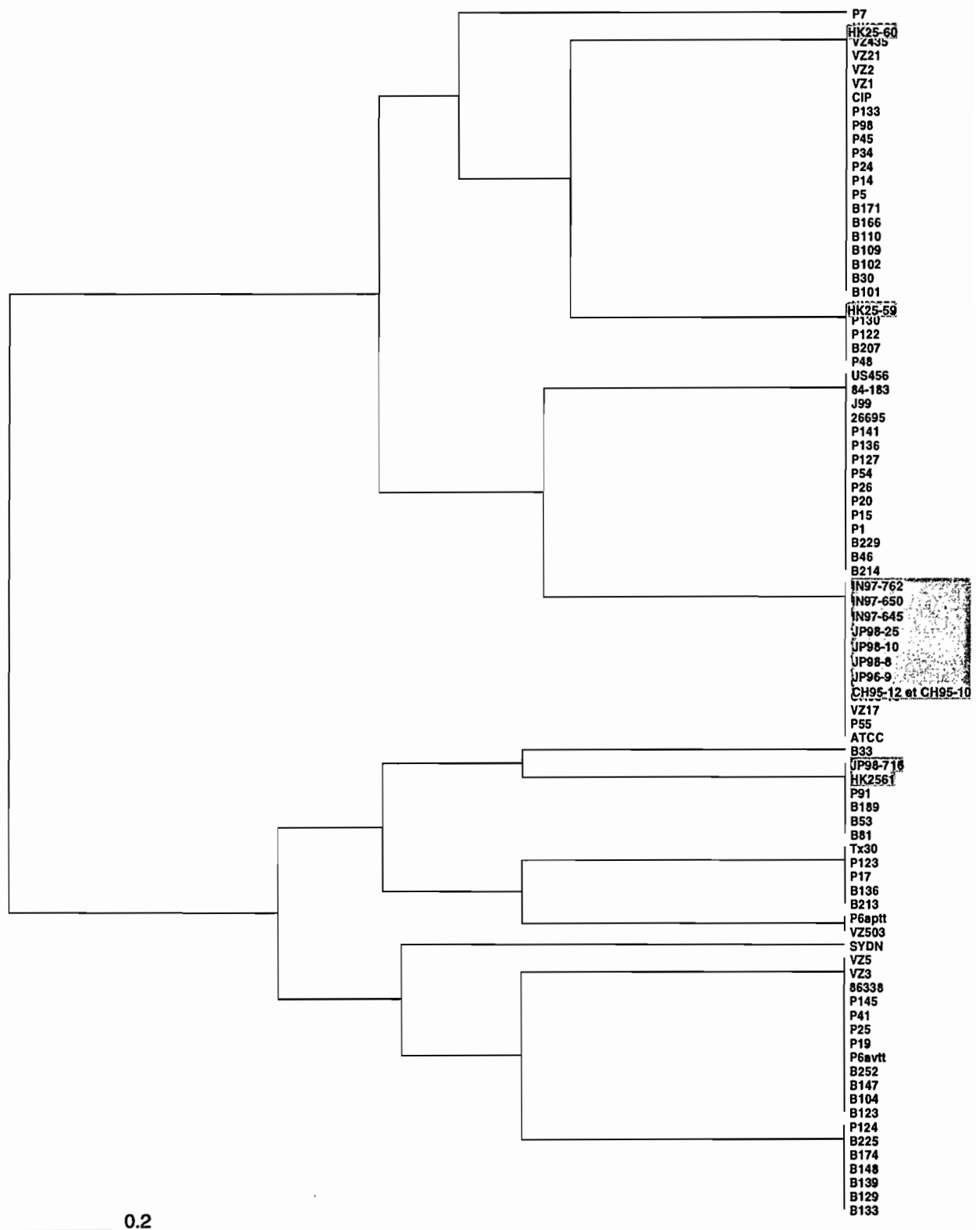


Figure III.5 : Dendrogramme UPGMA construit pour les 87 souches de *Helicobacter pylori* de l'étude à partir des données du typage des facteurs *vacA*, *cagA* et IS605.

2.1.3. Analyse comparée des données obtenues pour les marqueurs « spécialistes » de *H. pylori*

❖ Diversité génétique moyenne

La diversité génétique moyenne observée pour les facteurs *vacA*, *cagA* et IS605 est inférieure à la diversité génétique observée pour les facteurs *ureA-ureB* et *flaA*. Ce résultat s'explique par le petit nombre d'allèles rencontrés dans l'étude des facteurs *vacA*, *cagA* et IS605.

❖ Analyses phénétiques de classification

La distance génétique de Jaccard moyenne calculée à partir des données des facteurs *vacA*, *cagA* et IS605 n'est pas significativement différente, d'après les tests de Student, de celle calculée à partir de la matrice des distances bâtie sur les données combinées du typage des gènes *ureA-ureB* et *flaA*. De fait, les souches de *H. pylori* sont tout aussi dispersées sur l'arbre UPGMA construit à partir des données des facteurs *vacA*, *cagA* et IS605 que sur l'arbre UPGMA construit à partir des données de PCR-RFLP sur les gènes *ureA-ureB* et *flaA*.

Aucune corrélation n'apparaît visuellement de la comparaison des arbres UPGMA construits à partir des données de PCR-RFLP sur les gènes *ureA-ureB* et *flaA* et à partir des données des facteurs *vacA*, *cagA* et IS605 (Figures III. 3 et III.5).

Considérant le dendrogramme établi sur les données des facteurs *vacA*, *cagA* et IS605, il se dessine 4 grappes à une distance génétique de Jaccard de 0,29. Si à chaque souche est assigné un numéro d'appartenance à une grappe, et que les souches sont ensuite repérées par ce numéro sur le dendrogramme construit à partir des données des gènes *ureA-ureB* et *flaA*, il apparaît que les grappes établies sur le premier arbre se retrouvent totalement éclatées sur le second.

Une illustration de cette absence de congruence entre les classifications obtenues sur les données des facteurs *vacA*, *cagA* et IS605 et sur les données des gènes *ureA-ureB* et *flaA* est donnée dans l'article « Panmictic structure of *Helicobacter pylori* demonstrated by the comparative study of six genetic markers » (Salaün *et al.*, 1998). Cet article présente les classifications ascendantes hiérarchiques obtenues pour 39 des 87 souches de la présente étude.

En outre, le dendrogramme construit à partir des données de l'ensemble des marqueurs spécifiques a une structure totalement obscurcie par rapport à l'arbre construit sur les données des facteurs *vacA*, *cagA* et IS605.

❖ Analyse de génétique des populations

L'indice I_A apparaît significativement différent de zéro ($I_A=0,201\pm 0,020$). Ceci suggère que l'association non aléatoire des locus *vacA*, *cagA* et *IS605* est suffisamment forte pour n'être pas obscurcie par l'association aléatoire des génotypes *ureA-ureB* et *flaA*.

Le test *f* conduit sur les données combinées des marqueurs spécifiques *ureA-ureB*, *flaA*, *vacA*, *cagA* et *IS605* est significatif (à $p < 10^{-4}$). Il apparaît que la significativité du test *f* est soutenue par l'existence d'un déséquilibre de liaison entre *vacA* s et *vacA* m, entre *cagA* et *vacA* s, et entre *cagA* et *vacA* m révélé par le test *f'* et par les tests de χ^2 .

Toutefois, malgré cet apparent déséquilibre de liaison, le test *g* est non significatif (à $p < 10^{-4}$). Cette non-congruence des matrices de distances construites à partir des données de PCR-RFLP sur les gènes *ureA-ureB* et *flaA*, et à partir du typage des facteurs *vacA*, *cagA* et *IS605*, est également révélée par la comparaison des arbres UPGMA.

En définitive, même si les facteurs *vacA*, *cagA* et *IS605* tendent à montrer une association non aléatoire, l'étude des marqueurs spécifiques *ureA-ureB*, *flaA*, *vacA*, *cagA* et *IS605* de *H. pylori* ne parvient pas à déceler de structuration génétique nette au sein de l'espèce.

Dans la mesure où ces gènes codent pour des protéines excrétées ou exposées à la surface de la bactérie (*ureA-ureB*, *flaA* et *vacA*), ils sont susceptibles d'être soumis à des pressions de sélection. Ainsi, ces marqueurs génétiques pourraient avoir une « horloge moléculaire » (ou « vitesse d'évolution ») trop rapide qui, de fait, obscurcirait une éventuelle structuration au sein de l'espèce *H. pylori*.

En conséquence, de nouvelles études ont été conduites en considérant cette fois des marqueurs généralistes, qui, choisis plus ou moins résolutifs, permettent d'adapter l'horloge moléculaire à la question posée.

2.2. Etude de la structure génétique de *H. pylori* par des marqueurs « généralistes »

2.2.1. Ribotypage

Quarante et une souches de *H. pylori* ont été analysées par la technique du ribotypage. Cette technique n'a pas été étendue à l'ensemble des souches de l'étude en raison des difficultés rencontrées pour sa mise en œuvre et des résultats obtenus.

Parmi ces 41 souches, 38 sont des isolats cliniques d'origine française (10 isolats de Brest et 28 isolats de Poitiers) et 3 sont des souches de référence (CIP101260, SS1 et ATCC43579).

Après digestion de l'ADN total de ces souches par *Hind*III, d'une part, et par *Hae*III, d'autre part, les régions codant pour les ARN ribosomiques ont été repérées à l'aide d'une sonde d'ADN complémentaire de l'ARN ribosomique 16S+23S de *E. coli*.

❖ Profils observés

L'analyse par l'endonucléase *Hind*III distingue des profils composés de 2 à 13 fragments. Un total de 20 fragments est détecté parmi les souches, et la présence de deux fragments est notée dans 35 des 41 souches étudiées par cette technique (85,4%). La combinaison de ces fragments permet de caractériser 25 profils de restriction différents. Un même profil est au plus partagé par 9 souches, sans distinction d'origine géographique ni clinique. La fréquence du type le plus représenté est de 22%.

L'analyse par l'endonucléase *Hae*III a été possible sur 29 des 41 souches de *H. pylori* considérées (soit 70,7%), l'ADN des autres souches n'ayant pu être digéré par cette enzyme de restriction (Figure III.6). Pour ces 29 souches, l'analyse par l'endonucléase *Hae*III distingue des profils composés de 1 à 10 fragments. Un total de 33 fragments est détecté parmi les souches, et la présence d'un fragment est notée dans 24 des 29 souches digérées par *Hae*III (82,7%). Chacune de ces souches présente un ribotype différent, hormis les souches P6 prélevées chez un même patient avant et après antibiothérapie qui présentent le même ribotype.

❖ Diversité génétique moyenne

Les ribotypes obtenus par digestion par *Hind*III et par *Hae*III sont considérés comme deux locus indépendants.

La diversité génétique moyenne dans l'échantillon est de 0,929.

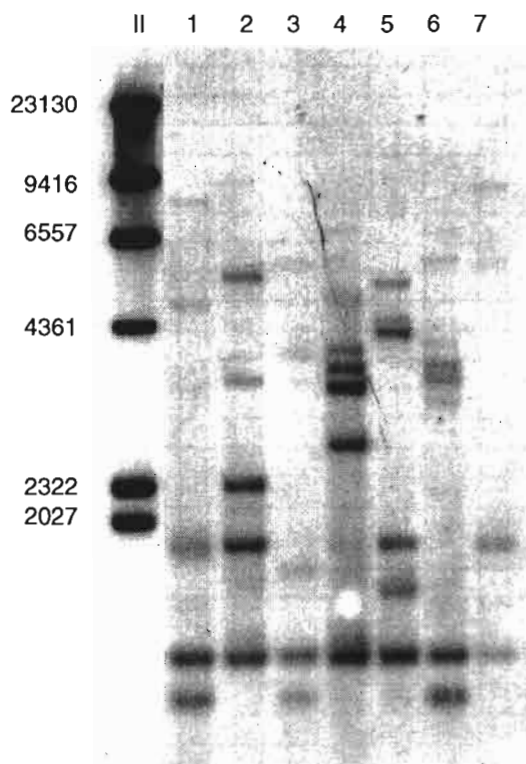


Figure III.6 : Profils de restriction des gènes codant pour l'ARN ribosomique (ribotypes) obtenus pour six souches de *Helicobacter pylori* après digestion de l'ADN par l'endonucléase *HaeIII* et hybridation avec une sonde d'ADNc ribosomique 16S+23S de *Escherichia coli*.

Note : (II) : marqueur II (Boehringer Mannheim) ; pistes 1 à 7 : B101, B102, B104, B109, B110, P7 et P14.

❖ Diversité génotypique

Le ribotypage, conduit avec les deux endonucléases, révèle pour chaque souche un ribotype particulier, hormis P91 et P133 qui partagent le même ribotype après digestion par *HindIII* et sont non digérées par *HaeIII*. La diversité génotypique est de 0,975.

❖ Distance génétique de Jaccard moyenne

La distance génétique de Jaccard moyenne pour les 41 *H. pylori* est de $0,711 \pm 0,182$.

❖ Analyse phénétique de classification

A partir de la matrice des distances génétiques de Jaccard, des dendrogrammes UPGMA ont été construits (Figure III.7). Aucune structuration n'apparaît sur les arbres construits à partir des données obtenues avec *HindIII* et avec *HaeIII*, mais aussi sur les données combinées de ces deux « locus », sans considérer les souches non digérées par *HaeIII*.

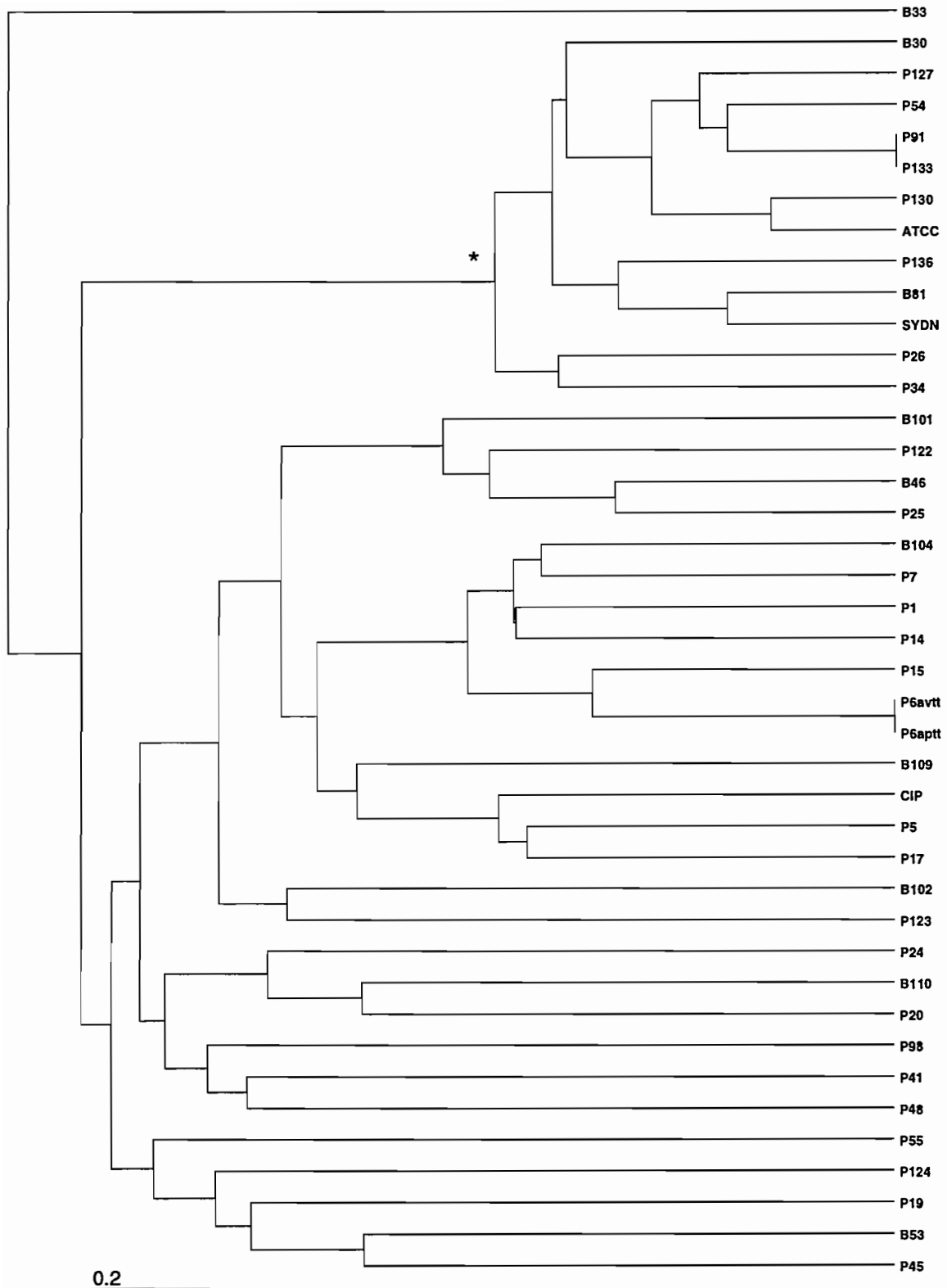


Figure III.7 : Dendrogramme UPGMA construit à partir des données du ribotypage (combinant les résultats des deux endonucléases *Hind*III et *Hae*III) pour les 41 souches de *Helicobacter pylori*.

Note : * les 12 souches de *H. pylori* dont l'ADN n'est pas digéré par *Hae*III se trouvent regroupées.

❖ Analyses de génétique des populations

L'indice d'association entre les locus ($I_A = -0,251 \pm 0,118$) calculé sur les 41 souches de *H. pylori* analysées par les deux endonucléases n'est pas significativement différent de zéro. Par ailleurs, les tests f et f' ne sont pas significatifs.

Ainsi, la mise en œuvre du ribotypage ne met en évidence aucun déséquilibre de liaison au sein de l'échantillonnage des 41 souches de *H. pylori* analysées par cette méthode.

2.2.2. Amplification génique aléatoire (RAPD)

Les 87 souches de *H. pylori* ainsi que les 4 souches « outgroup », *H. mustelae*, *H. hepaticus*, *C. jejuni* et *C. coli*, de l'étude ont été analysées par la technique RAPD.

2.2.2.1. Choix des marqueurs RAPD

83 amorces décarnériques du kit Operon Technologies ont été testées sur 4 souches de *H. pylori* et la souche « outgroup » *C. coli*. Toutes ces amorces ont conduit, pour les souches analysées, à l'obtention d'un profil électrophorétique. Toutefois, seulement 12 amorces ont permis l'obtention de profils reproductibles et, de fait, ont été retenues pour la suite de l'étude.

2.2.2.2. Analyses conduites sur les données générées par les 12 marqueurs RAPD

2.2.2.2.1. Variabilité génétique révélée par les 12 marqueurs RAPD

❖ Profils observés

Au total, pour l'analyse des 87 souches de *H. pylori*, 157 bandes électrophorétiques sont révélées par les 12 amorces RAPD sélectionnées. Chaque amorce génère un nombre total de fragments compris entre 7 et 18, pour les amorces U-12 et A-13 respectivement, ce qui représente une moyenne de 13 fragments par amorce RAPD.

Chacune des 12 amorces sélectionnées conduit à des profils électrophorétiques très polymorphes, plus ou moins complexes. Ainsi, le nombre de bandes par profil va de 1 à 3 pour l'amorce générant le moins de variabilité (U-12), et de 1 à 8 pour l'amorce générant le plus de variabilité (A-13) (Figure III.8).

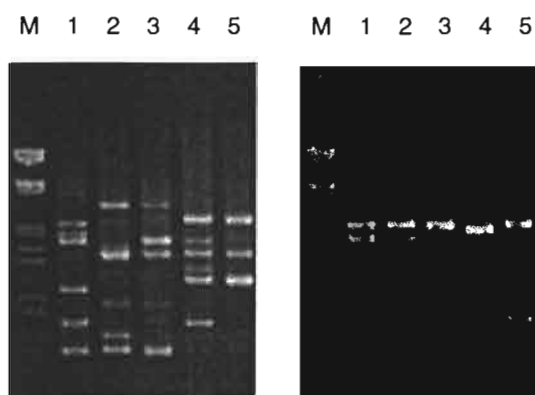


Figure III.8 : Analyse par amplification génique aléatoire (RAPD) de souches de *Helicobacter pylori*
 (a) par l'amorce A-13
 (b) par l'amorce U-12
 Note : (M) marqueur de masse moléculaire (λ DNA/*EcoRI*+*HindIII*) (Promega) ; pistes 1 à 5 : CIP101260, B30, B33, B46 et B53.

Le nombre moyen de profils électrophorétiques par marqueur RAPD est de 41,7, avec un nombre de profils électrophorétiques par marqueur RAPD compris entre 18 pour U-12 et 83 pour A-13 (Tableau III.5).

Concernant les souches « outgroup », 81,3% des profils RAPD de ces souches sont différents de ceux obtenus pour les souches de *H. pylori*. 20,9% des bandes constituant les profils électrophorétiques des souches « outgroup » ne sont pas retrouvées dans les souches de *H. pylori*.

En outre, 83,3% des profils RAPD des souches de *Helicobacter* non *H. pylori* sont différents de ceux obtenus pour les souches de *H. pylori*. 20% des bandes constituant les profils électrophorétiques des souches de *Helicobacter* non *H. pylori* ne sont pas retrouvées dans les souches de *H. pylori*.

De même, 79,2% des profils RAPD des souches de *Campylobacter* sont différents de ceux obtenus pour les souches de *H. pylori*. 21,8% des bandes constituant les profils électrophorétiques des souches de *Campylobacter* ne sont pas retrouvés dans les souches de *H. pylori*.

❖ Diversité génétique moyenne

Pour l'analyse des résultats, chaque marqueur RAPD est considéré comme un locus, même si chaque amorce est susceptible d'amplifier plusieurs locus chez une même souche, et/ou d'amplifier des locus différents d'une souche à l'autre.

La diversité génétique moyenne dans l'échantillon *H. pylori* est de 0,893 (Tableau III.5).

Tableau III.5 : Nombre de types et diversité génétique rencontrés pour les 87 souches de *Helicobacter pylori* lors de l'analyse par les 12 marqueurs RAPD.

Marqueur RAPD	Nombre de types RAPD	Diversité génétique
A-11	26	0,871
A-13	83	0,999
A-17	37	0,937
B-01	26	0,704
B-05	51	0,969
B-15	38	0,886
F-07	33	0,825
N-04	73	0,996
N-05	44	0,940
N-09	50	0,976
R-10	21	0,838
U-12	18	0,775
Moyenne	41,7	0,893

❖ Diversité génotypique

A chaque souche étudiée correspond un génotype RAPD particulier : la diversité génotypique est donc égale à 1.

❖ Distance génétique de Jaccard moyenne

La distance génétique de Jaccard moyenne pour les 87 souches de *H. pylori* de l'étude est de $0,667 \pm 0,090$.

2.2.2.2. Méthodes de classification

A partir des matrices des distances génétiques de Jaccard, des arbres UPGMA et Neighbor-Joining ont été construits. Ces deux méthodes se fondent sur deux hypothèses différentes : la méthode UPGMA repose sur l'hypothèse d'un taux d'évolution constant dans toutes les branches de l'arbre, au contraire de la méthode Neighbor-Joining qui admet des taux d'évolution variable. Cette dernière méthode produit un arbre non enraciné ; la racine de l'arbre peut cependant être définie par l'utilisation d'un groupe externe. Ainsi, pour la construction de l'arbre Neighbor-Joining, parmi les quatre souches « outgroup » incluses dans l'étude, c'est la souche de *C. coli*, la plus éloignée phylogénétiquement de *H. pylori*, qui a été choisie comme groupe externe.

Les arbres UPGMA et Neighbor-Joining, ainsi construits, révèlent une absence de structuration au sein de l'échantillonnage *H. pylori* analysé, avec une grande longueur de branches entre les différents isolats (Figure III.9). Ainsi, il apparaît que quelle que soit l'hypothèse posée pour la construction des arbres, taux d'évolution constant ou non dans les différentes branches de l'arbre, aucune structuration ne se dessine dans l'échantillonnage *H. pylori* considéré.

Par ailleurs, la position taxonomique des souches « outgroup » semble globalement respectée, quelle que soit la construction adoptée, avec toutefois la souche de *H. hepaticus* qui se trouve mêlée aux isolats *H. pylori* dans la construction Neighbor-Joining. Ce résultat confirme le test de Student ($p < 10^{-4}$) révélant que les distances génétiques de Jaccard séparant les souches de *H. pylori* des souches « outgroup » sont significativement différentes des distances génétiques de Jaccard séparant les souches de *H. pylori* entre elles.

Afin de tester la solidité des nœuds des arbres construits, des procédures de rééchantillonnage, pratiquées sur la matrice des données brutes, ont été mises en œuvre suivant la méthode du bootstrap. Ainsi, aucune valeur significative (>90%) n'est obtenue parmi les isolats *H. pylori*, sauf entre les souches P6 prélevées chez un même patient avant et après antibiothérapie, et entre deux souches prélevées chez deux patients du Venezuela (VZ1 et VZ21). De plus, aucune valeur de bootstrap significative ne distingue les souches « outgroup » des souches de *H. pylori*. Ce résultat pourrait s'expliquer par des phénomènes d'homoplasie entre les différents groupes taxonomiques considérés, homoplasie causée par le fait que les marqueurs RAPD sont « saturés » pour les distances évolutives élevées, du fait de leur horloge moléculaire trop rapide.

2.2.2.3. Vérification expérimentale de l'indépendance des marqueurs RAPD : tests d'hybridations moléculaires

Afin de s'assurer que les amorces RAPD amplifient des régions indépendantes du génome, ce qui est un prérequis pour les analyses de déséquilibre de liaison, des expériences d'hybridation moléculaire ont été réalisées. Pour ce test, 6 des 12 amorces, A-17, B-01, N-05, N-09, R-10 et U-12, et 7 souches, dont 6 souches de *H. pylori* (J99, 26695, B109, B110, P26 et P34) et la souche « outgroup » *H. mustelae*, ont été retenues (Figure III.10).

Une seule hybridation croisée apparaît entre les produits d'amplification de la souche de référence 26695 amplifiée par les amorces B-01 et U-12. D'après le Southern-blot, il apparaît que cette hybridation croisée se produit entre une bande de 2000 bp du profil de d'amplification RAPD de la souche 26695 avec l'amorce U-12 et une bande de 500 bp du profil d'amplification

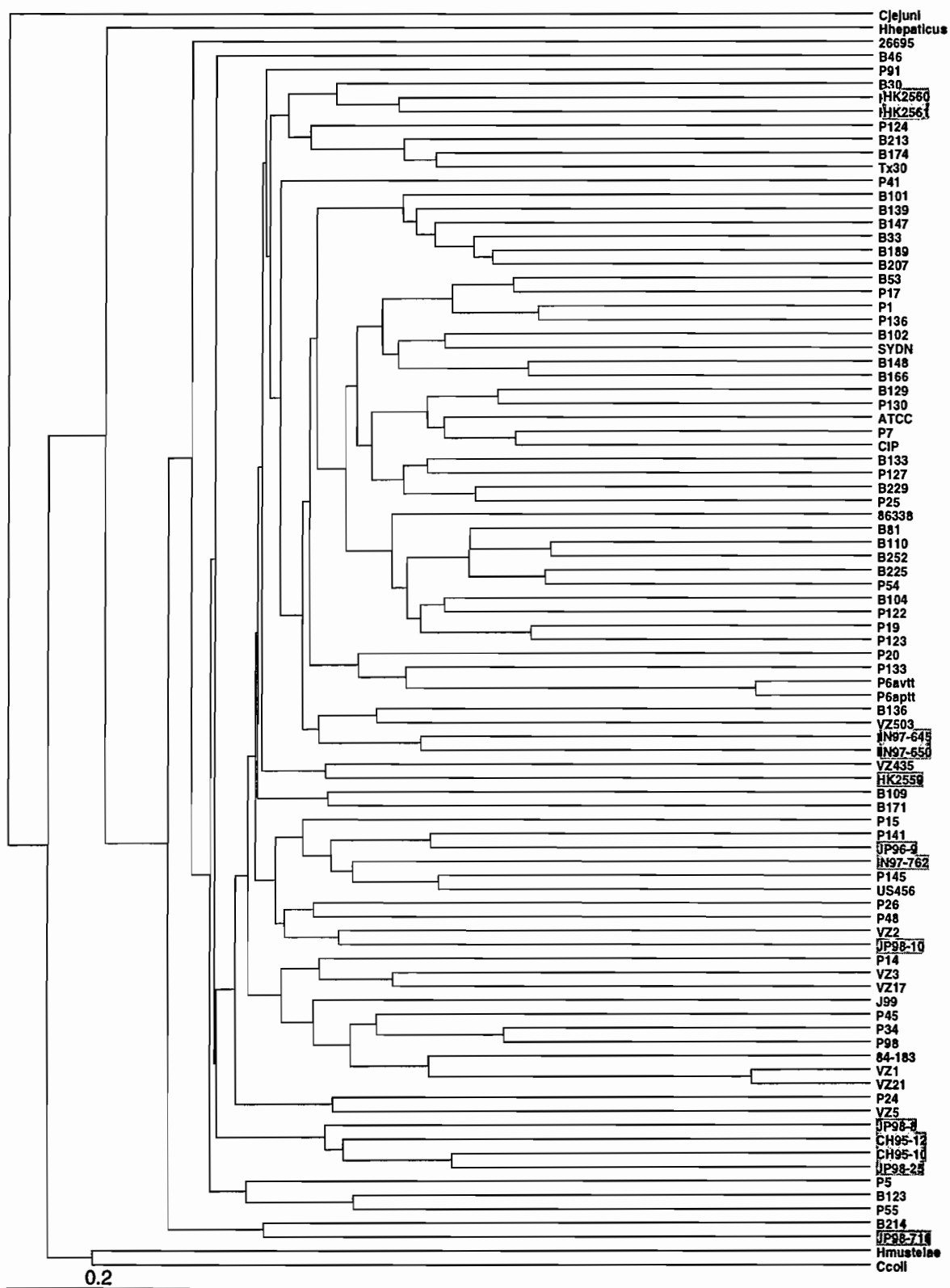


Figure III.9a : Dendrogramme UPGMA construit à partir des matrices de distances génétiques de Jaccard établies sur les données des 12 marqueurs RAPD pour l'ensemble des 87 souches de *Helicobacter pylori* et les 4 souches « outgroup » (*H. mustelae*, *H. hepaticus*, *Campylobacter jejuni* and *C. coli*) de l'étude.

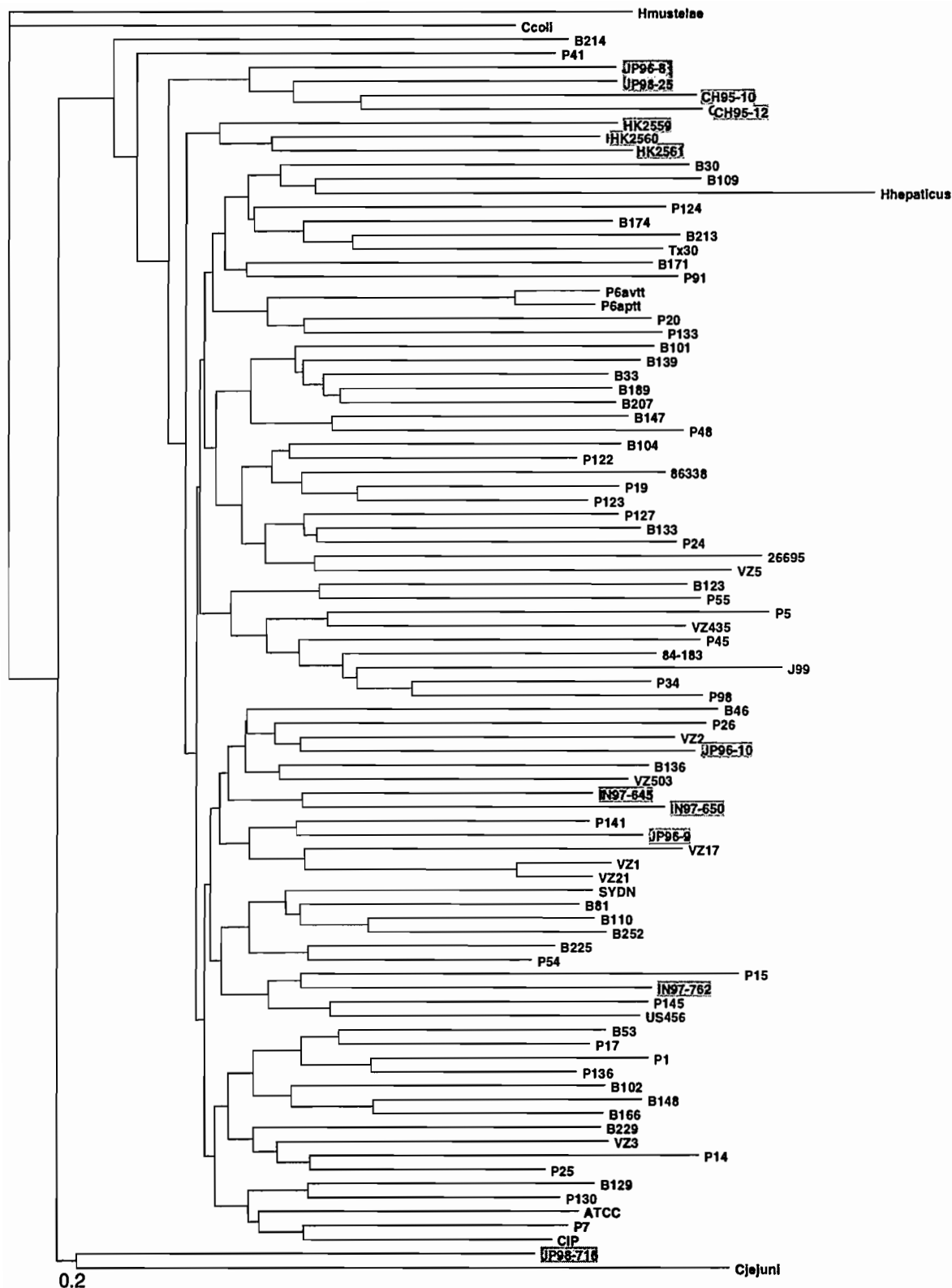


Figure III.9b : Dendrogramme Neighbor-Joining construit à partir des matrices de distances génétiques de Jaccard établies sur les données des 12 marqueurs RAPD pour l'ensemble des 87 souches de *Helicobacter pylori* et les 4 souches « outgroup » (*H. mustelae*, *H. hepaticus*, *Campylobacter jejuni* and *C. coli*) de l'étude.

RAPD de cette même souche avec l'amorce B-01. Cet événement d'hybridation croisée représente 0,7% de l'ensemble des résultats. Hormis ce résultat, l'ensemble des données confirme la notion généralement admise que les amorces RAPD utilisées amplifient des régions du génome indépendantes.

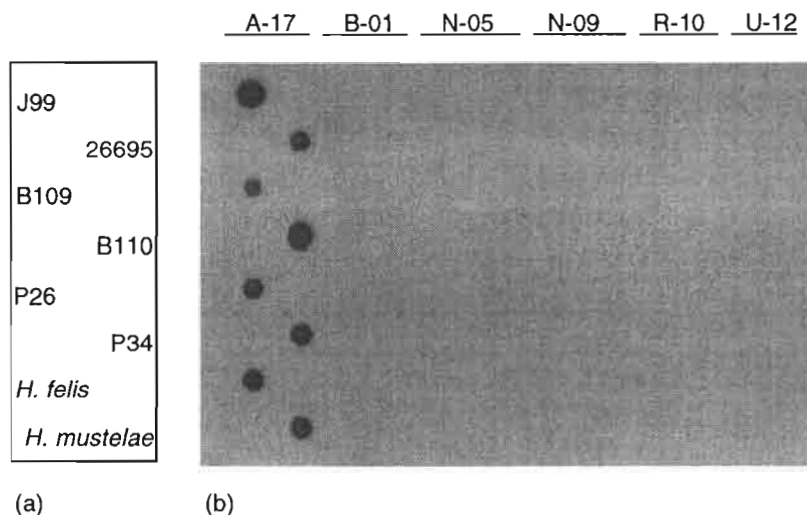


Figure III.10 : Vérification expérimentale de l'indépendance de six marqueurs RAPD mis en œuvre dans l'étude
 (a) Disposition des 48 produits d'amplification sur la membrane de nylon.

(b) Résultat de l'hybridation de la membrane avec la sonde composite A-17 marquée au $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$.

Note : 48 dépôts de 10 ng d'ADN amplifié sont réalisés; ces dépôts correspondent à 8 souches amplifiées par 6 amorces (A-17, B-01, N-05, N-09, R-10 et U12). La sonde composite est constituée des produits des 8 souches amplifiées par la même amorce RAPD. Dans cet exemple, seuls sont révélés les produits d'amplification obtenus par l'amorce A-17. Il n'apparaît aucune hybridation croisée entre la sonde A-17 et les produits d'amplification obtenus par d'autres amorces. Ceci indique que le marqueur RAPD A-17 est indépendant des autres marqueurs RAPD considérés.

2.2.2.4. Analyses de génétique des populations

L'indice I_A d'association entre les locus RAPD n'est pas significativement différents de zéro ($I_A = 0,039 \pm 0,024$).

Les tests de déséquilibre de liaison f et f' ne sont pas significatifs. Ces résultats suggèrent donc une association aléatoire des locus RAPD.

2.2.2.5. Analyses conduites sur les données générées par les marqueurs RAPD les moins variables

Afin de vérifier si les résultats obtenus pouvaient être dus à une saturation des marqueurs RAPD, de nouvelles analyses ont été réalisées en considérant cette fois les 4

marqueurs les moins variables (A-11, B-01, R-10 et U-12), c'est à dire ceux ayant révélés le moins de génotypes unilocus différents.

La diversité génétique de Jaccard moyenne ($H=0,797$) de l'échantillon *H. pylori* analysé par les 4 marqueurs RAPD les moins variables n'est pas significativement différente de celle obtenue pour l'analyse par les 12 marqueurs RAPD, d'après le test de Student (ou « test *t* ») ($p<10^{-3}$).

La diversité génotypique reste égale à 1, chaque souche de *H. pylori* présentant un génotype qui lui est propre.

En revanche, la distance génétique de Jaccard moyenne ($MD\pm SD=0,575\pm 0,178$) est significativement différente ($p<10^{-3}$, test *t*) de celle obtenue par l'analyse des 12 marqueurs RAPD. Ainsi, il apparaît sur les arbres UPGMA et Neighbor-Joining que la longueur des branches au sein de l'échantillon *H. pylori* soit réduite par rapport aux arbres dessinés précédemment. Toutefois, ceux-ci ne montrent pas non plus de structuration dans l'échantillon *H. pylori* (Figure III.11).

Les souches « outgroup » se distinguent mieux des souches de *H. pylori* sur les arbres UPGMA et Neighbor-Joining construits à partir des données des marqueurs RAPD les moins variables que sur ceux construits à partir des données de tous les marqueurs RAPD (Figure III.11). Toutefois, les distances génétiques de Jaccard moyennes séparant les souches « outgroup » des souches de *H. pylori*, générées en considérant les 12 marqueurs RAPD ou les 4 marqueurs RAPD les moins variables, ne sont pas significativement différentes ($p<10^{-4}$, test *t*).

2.2.3. Analyse du polymorphisme enzymatique (MLEE)

2.2.3.1. Mise en œuvre de la technique MLEE

❖ Choix des systèmes enzymatiques étudiés

30 systèmes enzymatiques différents ont été recherchés sur la base des travaux MLEE menés sur *H. pylori* (Go *et al.*, 1996) (Hazell *et al.*, 1997) et sur la base des enzymes identifiées à partir du séquençage des souches 26695 (Tomb *et al.*, 1997) et J99 (Alm *et al.*, 1999). Ces enzymes appartiennent à différentes voies du métabolisme général (biosynthèse des acides aminés, détoxification, métabolisme énergétique, conservation et conversion des nucléosides et nucléotides, dégradation des protéines, etc...).

❖ Choix du système d'extraction

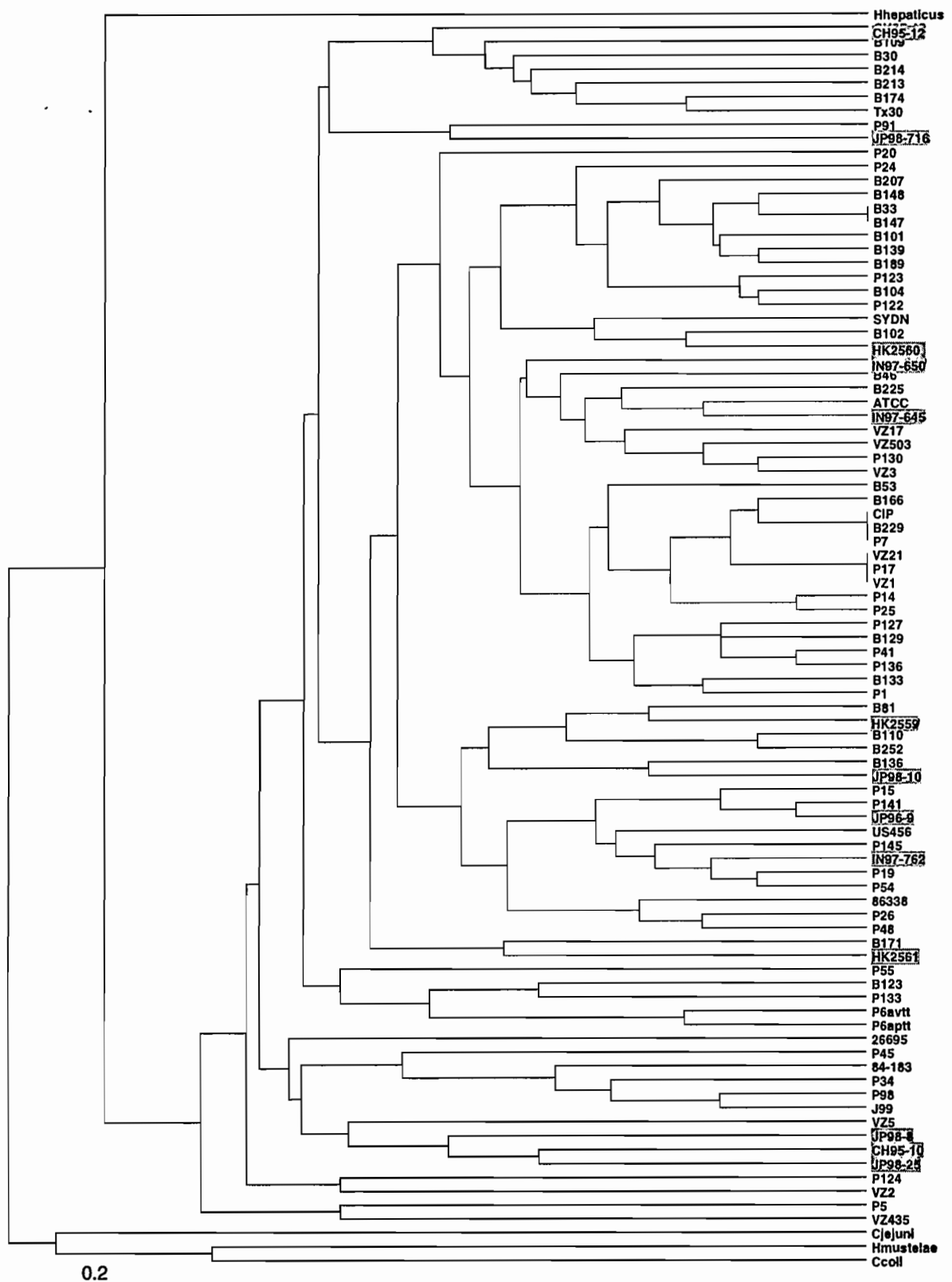


Figure III.11a : Dendrogramme UPGMA construit à partir des matrices de distances génétiques de Jaccard établies sur les données des 4 marqueurs RAPD les moins variables (A-11, B-01, R-10 et U-12) pour l'ensemble des 87 souches de *Helicobacter pylori* et les 4 souches « outgroup » (*H. mustelae*, *H. hepaticus*, *Campylobacter jejuni* and *C. coli*) de l'étude.

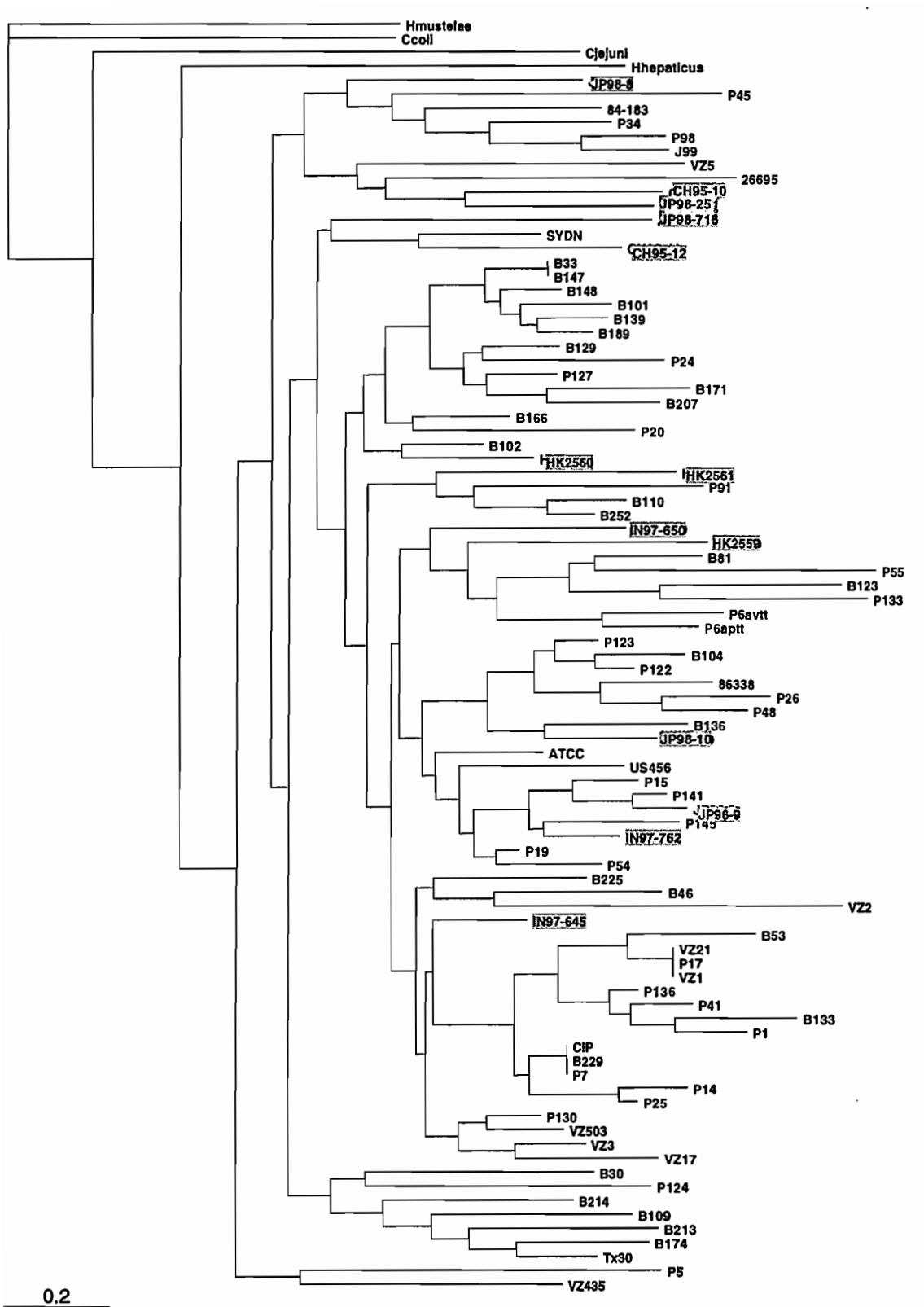


Figure III.11b: Dendrogramme Neighbor-Joining construit à partir des matrices de distances génétiques de Jaccard établies sur les données des 4 marqueurs RAPD les moins variables (A-11, B-01, R-10 et U-12) pour l'ensemble des 87 souches de *Helicobacter pylori* et les 4 souches « outgroup » (*H. mustelae*, *H. hepaticus*, *Campylobacter jejuni* and *C. coli*) de l'étude.

Le système d'extraction retenu pour la technique MLEE réalisée en gel d'acrylamide-agarose est une lyse par insonation.

Pour la migration en gel d'acétate de cellulose, trois systèmes d'extraction des protéines ont été testés : l'insonation, une lyse chimique utilisant du lysozyme et une lyse chimique utilisant un détergent. Les techniques d'extraction par insonation et lyse chimique par lysozyme ont conduit à une dégradation de l'échantillon se traduisant par des traînées sur les plaques d'acétate de cellulose après migration et révélation. C'est donc le système d'extraction utilisant un détergent (Richardson, Baverstock & Adams, 1986) qui a été retenu.

❖ Choix du système de migration

En gel d'acrylamide-agarose, parmi les 10 activités enzymatiques recherchées, 7 ont été détectées : GDH, IDH, G6PDH, ADK, NP, SOD et estérases. Ce système de migration a été mis en œuvre pour 41 des souches de *H. pylori* de l'échantillon.

En gel d'acétate de cellulose, parmi les 30 activités enzymatiques recherchées, 9 ont été retenues pour la faible fréquence des allèles nuls rencontrés. Les 87 souches de *H. pylori* et les 4 souches « outgroup » de l'échantillon ont été analysées en gel d'acétate de cellulose. Les 41 souches de *H. pylori* analysées une première fois en gel d'acrylamide-agarose ont été à nouveau analysées en gel d'acétate de cellulose pour la détection des mêmes enzymes. Toutefois, la détection de l'activité estérase sur le support acétate de cellulose a échoué.

Il apparaît que la migration en gel d'acrylamide agarose a un meilleur pouvoir de séparation des électromorphes. Toutefois, la mise en œuvre de la migration sur ce support a été abandonnée au profit du système acétate de cellulose. En effet, le support acétate de cellulose nécessite moins de biomasse, ce qui, dans le cas d'un microorganisme aussi difficile à cultiver que *H. pylori* est un avantage considérable, et est également moins consommateur de réactifs lors de l'étape de révélation. En outre, la migration en gel d'acétate de cellulose permet un gain de temps considérable par rapport à la migration en gel d'acrylamide-agarose.

❖ Reproductibilité des profils électrophorétiques

Quel que soit le système de migration utilisé, acrylamide-agarose ou acétate de cellulose, et, de fait, quel que soit le système d'extraction utilisé, insonation ou méthodes d'extraction chimique, les résultats obtenus pour les systèmes enzymatiques GDH, IDH, G6PDH, ADK, NP et SOD sont les mêmes.

La migration d'extraits protéiques réalisés à partir de différentes cultures d'une même souche conduit au même résultat : le profil de migration électrophorétique des isoenzymes reste inchangé après passage de la souche plusieurs fois en culture.

La préparation de la biomasse à partir de différents milieux de culture (cf. chapitre III.1) n'affecte pas le profil électrophorétique de la souche quelle que soit l'enzyme étudiée.

❖ Allèles nuls

Soixante dix neuf des 87 souches de *H. pylori* (soit 90,8%) ont une activité pour chacune des 9 enzymes. En revanche, 7 souches (soit 8,0%) ne présentent pas une des activités enzymatiques recherchées, et une souche (soit 1,2%) ne présente pas deux des activités enzymatiques recherchées.

Le défaut d'activité enzymatique pour ces souches reflète une véritable absence d'activité décelable de l'enzyme, et non un problème expérimental lié à la qualité du lysat cellulaire. En effet, pour une souche présentant un allèle nul pour un système enzymatique donné, les autres systèmes enzymatiques recherchés sont détectés, et ce à partir d'un même extrait cellulaire. De plus, la préparation de nouveaux extraits cellulaires (plus concentrés) pour les souches présentant des allèles nuls, à partir de nouvelles cultures bactériennes, n'a pas permis de détecter l'activité enzymatique recherchée.

2.2.3.2. Variabilité génétique révélée par MLEE

2.2.3.2.1. MLEE en gel d'acrylamide-agarose sur 41 souches de *H. pylori*

❖ Profils observés

Quarante et une souches de *H. pylori*, parmi lesquelles 10 isolats cliniques de Brest, 28 isolats cliniques de Poitiers et 3 souches de référence, ont été analysées en gel d'acrylamide-agarose. L'analyse portait sur 10 systèmes enzymatiques.

Ainsi pour les estérases, 4 locus (a, b, c, d) sont révélés sur les 5 substrats mis en œuvre (Tableau III.6). Le substrat acétate d'indoxyle révèle trois types isoenzymatiques (a, b, d), dont deux sont fortement chargés (a,b) positivement et un fortement chargé négativement (d). Les substrats acétate d' α -naphtyl (α NA) et butyrate d' α -naphtyl (α NB) permettent la détection de 4 locus (a, b, c et d), le locus (c) présentant 3 allèles (c1, c2 et c3). Les substrats acétate de β -naphtyl (β NA) et butyrate de β -naphtyl (β NB) permettent la détection d'un seul locus (d).

Toutes les souches analysées ont le même type électrophorétique révélé par les substrats acétate d'indoxyle, β NA et β NB, mais ont un type électrophorétique différent révélé par les substrats α NA et α NB. Ainsi, le polymorphisme des estérases n'est révélé qu'avec les substrats α NA et α NB (Figure III.12).

Tableau III.6 : Substrats spécifiques des estérases de *Helicobacter pylori*

Estérase	Activité sur				Acétate d'indoxyle
	Ester d' α -naphtyl		Ester de β -naphtyl		
	Acétate	Butyrate	Acétate	Butyrate	
Estérase a	+		+		+
Estérase b	+		+		+
Estérase c	+		+		+
Estérase d	+	+	+	+	+

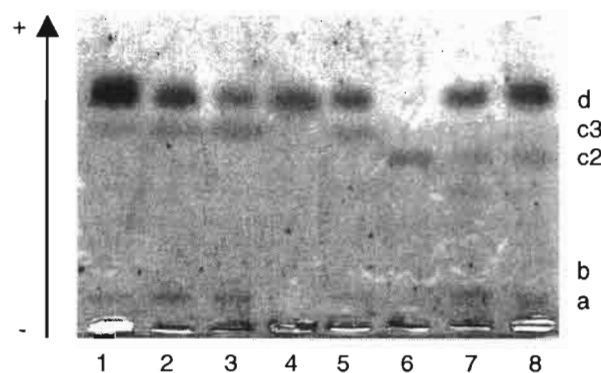


Figure III.12 : Polymorphisme des estérases de souches de *Helicobacter pylori* révélé en présence du substrat acétate d' α -naphtyl

Note : Quatre locus différents sont révélés (notés a, b, c et d). La migration est réalisée en gel d'acrylamide-agarose. Pistes 1 à 8 : souches de *H. pylori* P20, P24, P25, P26, P34, P41, P45 et P48.

En conséquence, considérant pour les estérases les locus révélés par les substrats α NA et acétate d'indoxyle, le nombre moyen de types alléliques par locus enzymatique est de 5,6, avec un nombre d'allèles par locus compris entre 2 pour PEP et 10 pour ADK. Le nombre moyen de types électrophorétiques par système enzymatique est de 6,3.

❖ Diversité génétique moyenne

La diversité génétique moyenne dans l'échantillon considéré est de 0,599.

❖ Diversité génotypique

A chaque souche étudiée correspond un type électrophorétique (ET) particulier : la diversité génotypique est égale à 1.

❖ Distance génétique de Jaccard moyenne

La distance génétique de Jaccard moyenne pour cet échantillon de 41 souches de *H. pylori* est de $0,557 \pm 0,122$.

2.2.3.2.2. MLEE en gel d'acétate de cellulose sur 87 *H. pylori* et 4 « outgroups »

❖ Profils observés

Parmi les 87 souches de *H. pylori* étudiées, l'ensemble des systèmes enzymatiques étudiés est très polymorphe (Figure III.13).

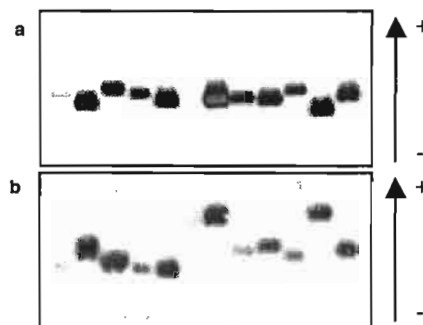


Figure III.13 : Analyse du polymorphisme isoenzymatique de souches de *Helicobacter pylori* :

- (a) Isocitrate Deshydrogénase (IDH)
- (b) Aspartate Aminotransférase (GOT)

Note : Les électrophorèses sont réalisées en gel d'acétate de cellulose. Pistes 1 à 12 : ATCC43579, P45, P48, P54, P55, 84-183, P91, P98, P122, P123, P130 et 26695.

Une bande électrophorétique unique a été détectée pour l'ensemble des systèmes enzymatiques étudiés, à l'exception de la diaphorase (DIA). Ceci signifie qu'à chacune des activités enzymatiques détectées correspond un seul locus, avec un seul allèle par locus. En revanche pour la diaphorase, 51 des 87 souches (58,6%) présentent 2 bandes électrophorétiques, 12 souches (13,8%) présentent 3 bandes électrophorétiques et 24 souches (27,6%) présentent une seule bande électrophorétique. Dans le cas de DIA, aucune interprétation allélique ne peut être réalisée. Ce résultat n'est cependant pas surprenant dans la mesure où le terme « diaphorase » fait référence à toute enzyme capable de catalyser l'oxydation du NADH ou du NADPH en présence d'un accepteur d'électrons (Richardson *et al.*,

1986). Il est donc possible que l'activité diaphorase corresponde à plusieurs locus. Cependant, comme pour les amorces RAPD, le fait de grouper ensemble plusieurs locus n'aboutit pas à un biais, mais seulement à une perte d'information (Tibayrenc, 1995a). La reproductibilité des profils de migration obtenus permet de conserver cette enzyme pour l'analyse de la structure génétique de la population étudiée.

Le nombre moyen de types alléliques par locus enzymatique est de 6,8, avec un nombre d'allèles par locus compris entre 3 pour PEP et 10 pour ADK et GOT (Tableau III.7).

Le nombre moyen de types électrophorétiques par système enzymatique est de 7,8.

Les souches de *H. pylori* partagent certains types alléliques (80.6%) avec les souches de *H. mustelae* et *H. hepaticus*, mais ne partagent aucun type allélique avec les souches du genre *Campylobacter* (*C. coli* et *C. jejuni*). De plus, la souche *H. hepaticus* et les souches du genre *Campylobacter* présentent une fréquence plus élevée d'allèles nuls (55,6% et 66,6% respectivement) que les souches de *H. pylori* (1,1%). Cette différence de fréquence des allèles nuls entre les souches de *H. pylori* et les souches « outgroup » est peut être due aux conditions de migration et de détection des électromorphes optimisées pour *H. pylori* plutôt qu'à une absence de l'activité enzymatique chez les souches « outgroup ». Quoi qu'il en soit, cette fréquence élevée d'allèles nuls pour les souches « outgroup » ne gêne en rien la construction des arbres.

❖ Diversité génétique moyenne

La diversité génétique moyenne dans l'échantillon *H. pylori* est de 0,662 (Tableau III.7).

Tableau III.7 : Nombre d'allèles et diversité génétique rencontrés pour les 87 souches de *Helicobacter pylori* lors de l'analyse des 9 systèmes enzymatiques.

Système enzymatique	Nombre d'allèles	Diversité génétique
GDH	7	0,637
IDH	6	0,629
G6PDH	9	0,846
ADK	10	0,866
NP	6	0,549
GOT	10	0,877
SOD	5	0,580
PEP	3	0,171
DIA	14 ^a	0,807
Moyenne	7,8	0,662

^a Il ne peut être fait d'interprétation allélique pour DIA : dans ce cas, le « nombre d'allèles » fait référence au nombre de types électrophorétiques différents rencontrés pour cette enzyme.

❖ Diversité génotypique

A chaque souche de *H. pylori* étudiée correspond un type électrophorétique (ET) particulier : la diversité génotypique est donc égale à 1.

❖ Distance génétique de Jaccard moyenne

La distance génétique de Jaccard moyenne pour les 87 *H. pylori* de l'étude est de $0,631 \pm 0,139$.

Pour la suite de l'étude (méthodes de classification et analyses de génétique des populations), seuls 9 systèmes enzymatiques ont été retenus.

2.2.3.3. Méthodes de classification

A partir des matrices de distance génétique de Jaccard obtenues, des arbres UPGMA et Neighbor-Joining ont été construits, en considérant, pour la construction de l'arbre Neighbor-Joining, la souche de *C. coli* comme groupe externe.

Les arbres UPGMA et Neighbor-Joining, ainsi construits, révèlent une absence de structuration au sein de l'échantillonnage *H. pylori* analysé, avec une grande longueur de branches entre les différents isolats (Figure III.14). Ainsi, il apparaît que quelle que soit l'hypothèse posée pour la construction des arbres, taux d'évolution constant ou non dans les différentes branches de l'arbre, aucune structuration ne se dessine dans l'échantillonnage *H. pylori* considéré.

Par ailleurs, la position taxonomique des souches « outgroup » est respectée dans l'une et l'autre des constructions. La comparaison des moyennes des distances génétiques de Jaccard séparant les souches « outgroup » des souches de *H. pylori* confirme ce résultat ($p < 10^{-4}$, test *t*). Ainsi, les souches du genre *Campylobacter* apparaissent génétiquement plus éloignées des souches de *H. pylori* que ne le sont les souches du genre *Helicobacter*. De plus, il apparaît que la souche « outgroup » *Helicobacter* non gastrique, *H. hepaticus*, soit génétiquement plus éloignée des souches de *H. pylori* que ne l'est la souche « outgroup » *Helicobacter* gastrique, *H. mustelae*.

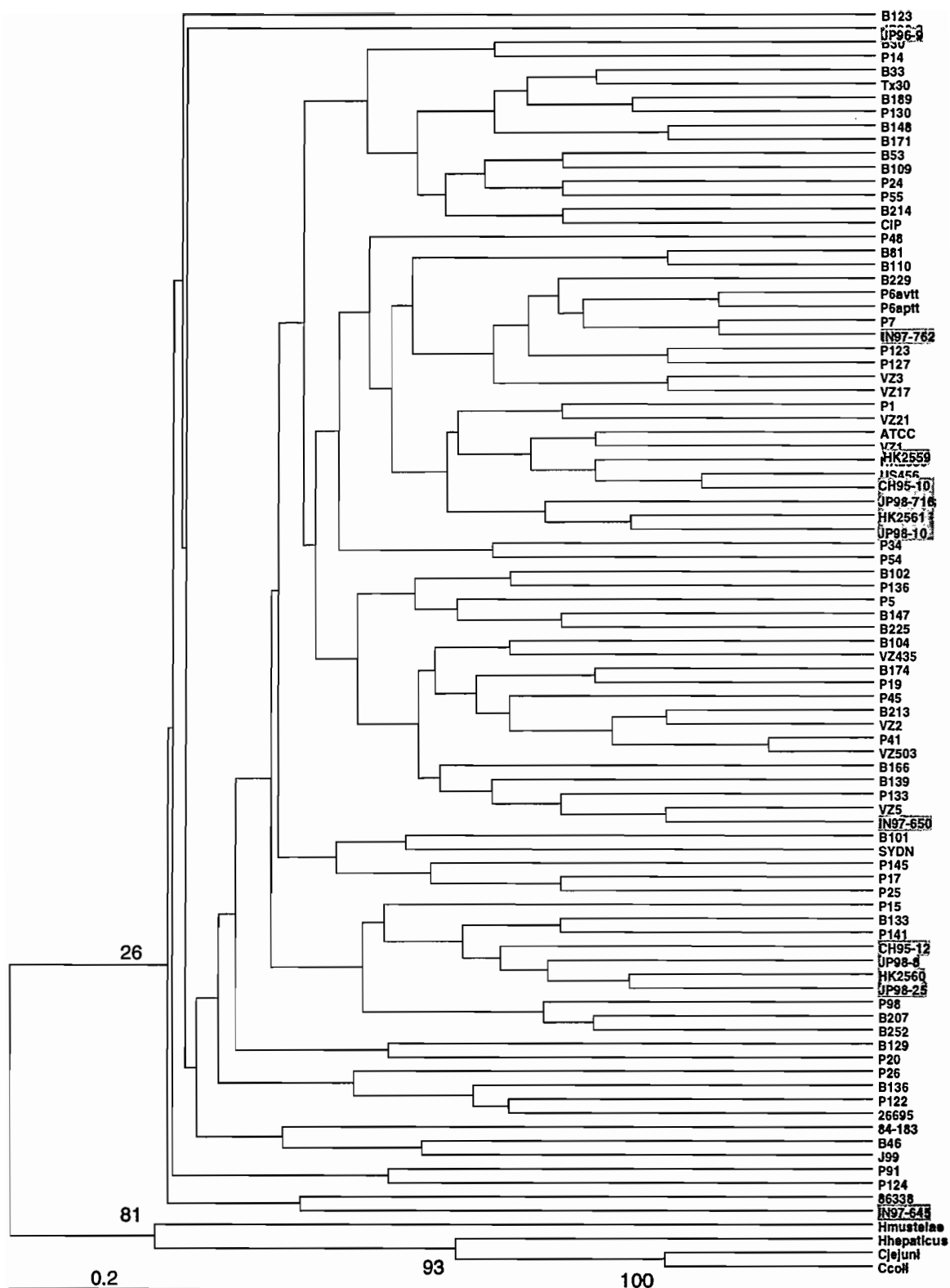


Figure III.14a : Dendrogramme UPGMA construit à partir des matrices de distances génétiques de Jaccard établies sur les données des 9 marqueurs isoenzymatiques pour l'ensemble des 87 souches de *Helicobacter pylori* et les 4 souches « outgroup » (*H. mustelae*, *H. hepaticus*, *Campylobacter jejuni* and *C. coli*) de l'étude.

Note : La robustesse des nœuds de l'arbre a été évaluée par une analyse de bootstrap (Felsenstein, 1985) suivant une méthode de parcimonie (Wagner, 1961). Les valeurs de bootstrap ont été reportées sur l'arbre. Une valeur de bootstrap significative (>90%) est obtenue au niveau du genre.

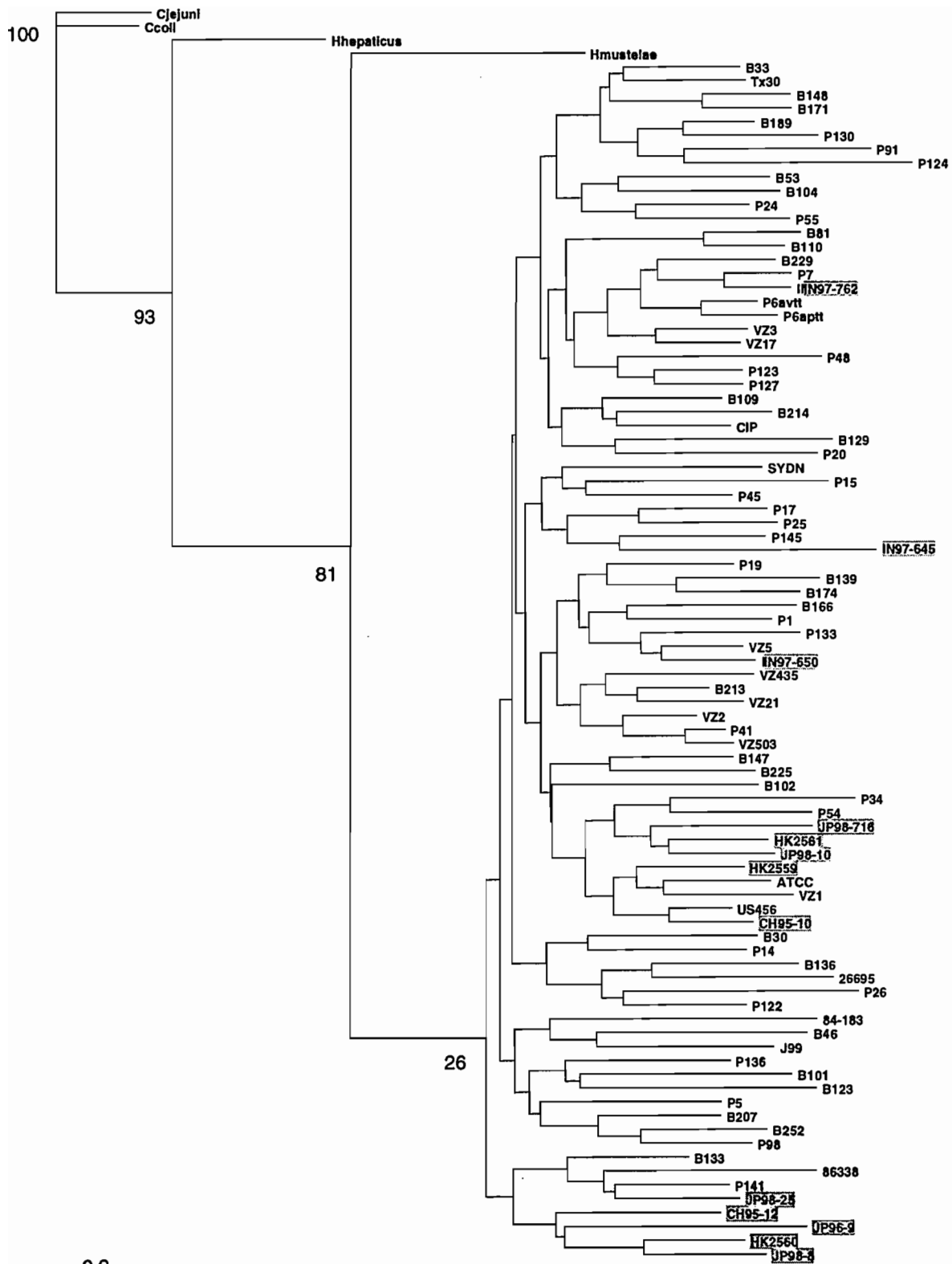


Figure III.14b : Dendrogramme Neighbor-Joining construit à partir des matrices de distances génétiques de Jaccard établies sur les données des 9 marqueurs isoenzymatiques pour l'ensemble des 87 souches de *Helicobacter pylori* et les 4 souches « outgroup » (*H. mustelae*, *H. hepaticus*, *Campylobacter jejuni* and *C. coli*) de l'étude.

Note : La robustesse des nœuds de l'arbre a été évaluée par une analyse de bootstrap (Felsenstein, 1985) suivant une méthode de parcimonie (Wagner, 1961). Les valeurs de bootstrap ont été reportées sur l'arbre. Une valeur de bootstrap significative (>90%) est obtenue au niveau du genre.

La solidité des nœuds des arbres construits a été testée par la méthode du bootstrap. Aucune valeur significative (>90%) n'est obtenue parmi les isolats *H. pylori*. Une valeur de bootstrap est significative (93%) : elle distingue les souches du genre *Campylobacter* des souches du genre *Helicobacter*. La valeur de bootstrap qui distingue la souche « outgroup » *H. mustelae* des souches de *H. pylori* est similaire aux valeurs de bootstrap qui distinguent les souches de *H. pylori* entre elles.

2.2.3.4. Analyses de génétique des populations

L'indice d'association entre les locus isoenzymatiques n'est pas significativement différent de zéro ($I_A = -1.934e-05 \pm 0.021$).

Les tests de déséquilibre de liaison entre les locus isoenzymatiques *f* et *f'* ne sont pas significatifs.

2.2.3.5. Analyses conduites sur les données générées par les marqueurs MLEE les moins variables

De la même façon que pour l'analyse des résultats RAPD, afin de vérifier si les résultats obtenus pouvaient être dus à une saturation des marqueurs MLEE, de nouvelles analyses ont été réalisées en considérant cette fois les 4 marqueurs les moins variables (IDH, NP, SOD et PEP).

La diversité génétique moyenne ($H=0,482$) de l'échantillon *H. pylori* analysé par les 4 marqueurs MLEE les moins variables n'est pas significativement différente de celle obtenue pour l'analyse par les 9 marqueurs MLEE ($p < 10^{-3}$, test *t*).

Parmi les 87 souches de *H. pylori*, 36 génotypes multilocus sont détectés : la diversité génotypique est de 0,951.

La distance génétique de Jaccard moyenne ($MD \pm SD = 0,482 \pm 0,225$) est significativement différente ($p < 10^{-3}$, test *t*) de celle obtenue par l'analyse des 9 marqueurs MLEE. Ainsi, il apparaît sur les arbres UPGMA et Neighbor-Joining que la longueur des branches au sein de l'échantillon *H. pylori* soit réduite par rapport aux arbres dessinés précédemment (Figure III.15). Toutefois, ceux-ci ne montrent pas de structuration nette dans l'échantillon *H. pylori*. Les souches « outgroup », quant à elles, se distinguent mieux des souches de *H. pylori* sur les arbres construits sur les données des marqueurs MLEE les moins variables que sur ceux construits sur les données de tous les marqueurs MLEE (Figure III.15). En effet, les distances génétiques de Jaccard moyennes séparant les souches « outgroup » des souches de *H. pylori*,

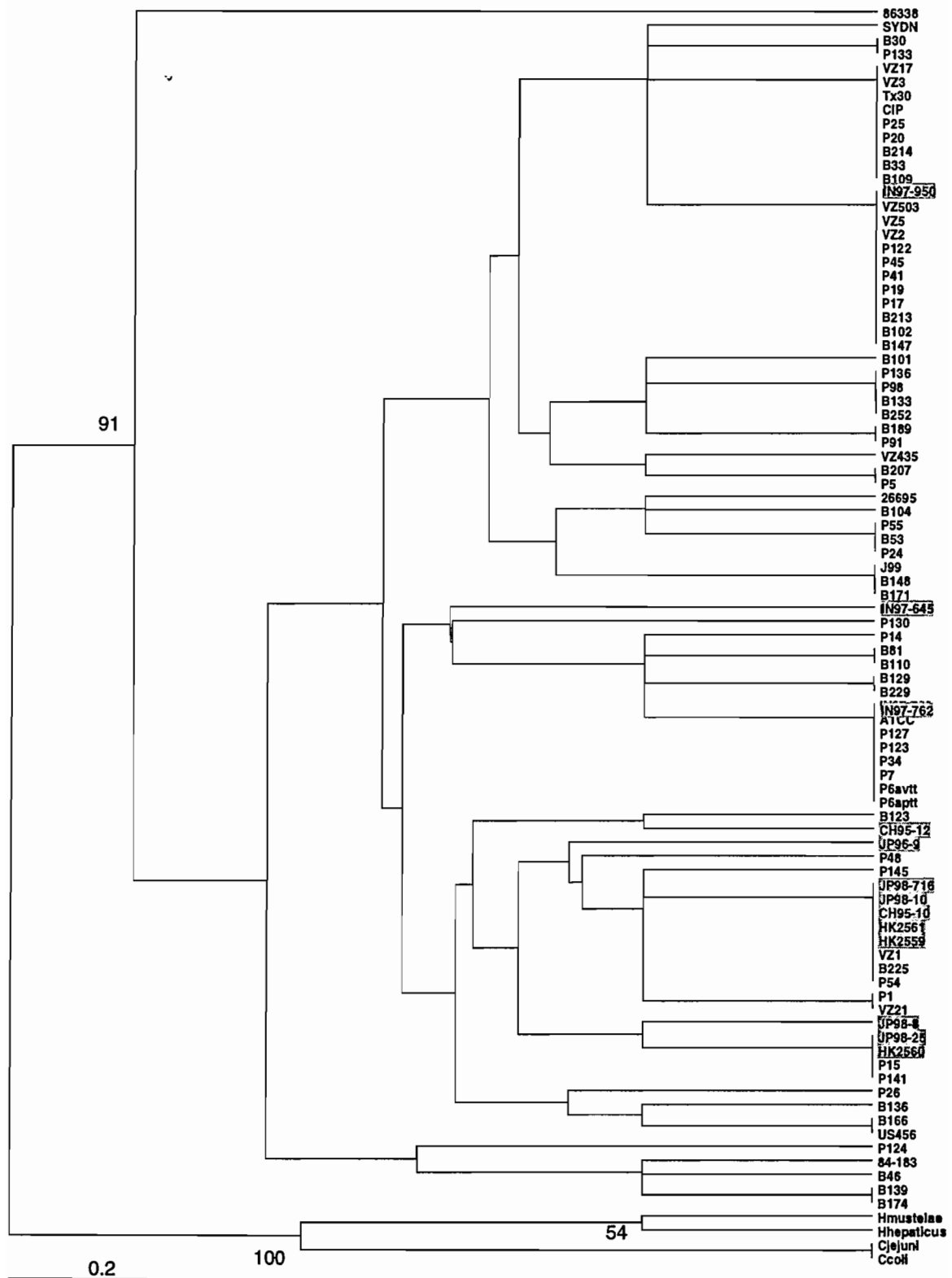


Figure III.15a : Dendrogramme UPGMA construit à partir des matrices de distances génétiques de Jaccard établies sur les données des 4 marqueurs isoenzymatiques les moins variables (IDH, NP, SOD et PEP) pour l'ensemble des 87 souches de *Helicobacter pylori* et les 4 souches « outgroup » (*H. mustelae*, *H. hepaticus*, *Campylobacter jejuni* and *C. coli*) de l'étude.

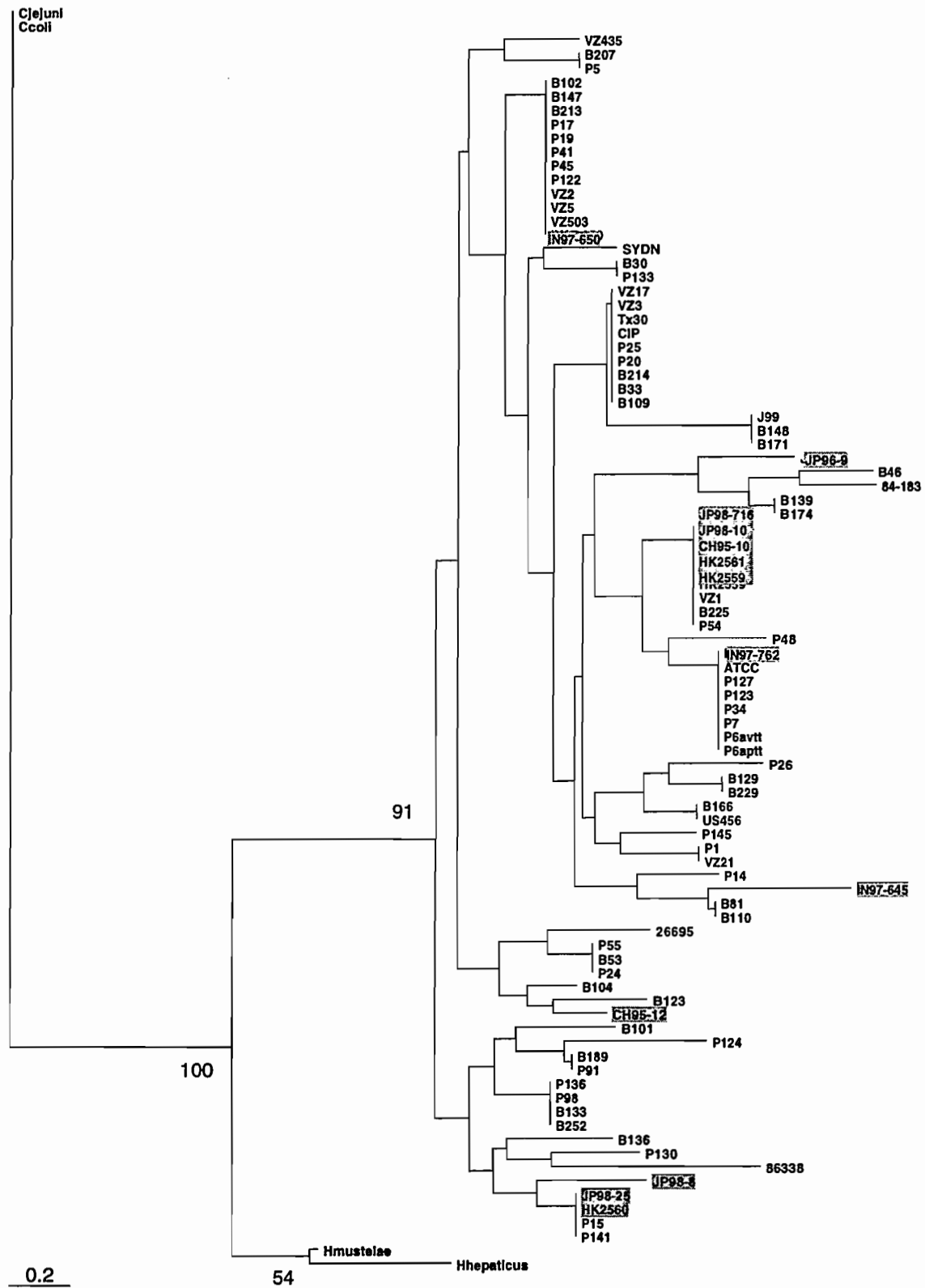


Figure III.15b: Dendrogramme Neighbor-Joining construit à partir des matrices de distances génétiques de Jaccard établies sur les données des 4 marqueurs isoenzymatiques les moins variables (IDH, NP, SOD et PEP) pour l'ensemble des 87 souches de *Helicobacter pylori* et les 4 souches « outgroup » (*H. mustelae*, *H. hepaticus*, *Campylobacter jejuni* and *C. coli*) de l'étude.

générées en considérant les 9 marqueurs MLEE ou les 4 marqueurs MLEE les moins variables, sont significativement différentes ($p < 0,02$, test \hat{t}).

2.2.4. Comparaison des données RAPD et des données MLEE

❖ Diversité génétique moyenne

Les données RAPD révèlent un niveau de diversité génétique significativement plus élevé que les données MLEE, que l'ensemble des marqueurs analysés soient considérés ($p = 0,016$, test \hat{t}) ou que seuls les marqueurs les moins variables soient considérés ($p = 0,03$, test \hat{t}).

❖ Analyses phénétiques de classification

Comme observé sur les arbres construits à partir des matrices de distance génétique de Jaccard, les distances obtenues par l'analyse RAPD sont significativement plus élevées que celles obtenues pour les données MLEE, que l'ensemble des marqueurs ou que seuls les marqueurs les moins variables soient considérés ($p < 10^{-4}$, test \hat{t}). Quoiqu'il en soit, l'un et l'autre marqueur ne montrent pas de structuration au sein de l'échantillon *H. pylori* (Figure III.9 et Figure III.14).

Considérant l'ensemble des marqueurs analysés, les souches « outgroup » sont significativement mieux distinguées des souches de *H. pylori* par les données MLEE que par les données RAPD. Toutefois, quand ne sont considérés que les marqueurs les moins variables, les données RAPD distinguent bien les souches « outgroup » des souches de *H. pylori*. Ceci suggère donc une saturation des marqueurs RAPD les plus variables.

❖ Analyses de génétique des populations

De l'observation des dendrogrammes construits sur les données RAPD et MLEE, il n'apparaît pas de concordance. Toutefois, le test g , significatif ($p = 0,0081$), suggère une corrélation entre les matrices de distance générées par les marqueurs MLEE et RAPD.

Les tests de déséquilibre de liaison f et f' conduits sur les données MLEE et RAPD combinées sont non significatifs.

2.3. Comparaison de tous les marqueurs

2.3.1. Taille de génome analysée par les différents marqueurs

Des informations obtenues des deux souches entièrement séquencées 26695 (GenBank AE000511) (<http://www.tigr.org/tdb/CMR/ghp/htmls/SplashPage.html>) (Tomb *et al.*, 1997) et J99 (GenBank AE001439) (<http://scriabin.astrazeneca-boston.com/hpylori/>) (Alm *et al.*, 1999), il est possible d'estimer la proportion de génome analysée par les différents marqueurs mis en œuvre dans cette étude.

Ainsi, les régions de génome *ureA-ureB* et *flaA* analysées par PCR-RFLP représentent respectivement 0,14% et 0,09% du génome global, et les régions *vacA*, *cagA* et IS605 représentent 0,07%.

Une estimation de la taille de génome analysée par la technique RAPD est également possible dans la mesure où les marqueurs RAPD utilisés amplifient des régions de génome indépendantes, ce qui a été vérifié par les expériences d'hybridation moléculaire. Ainsi, chaque amorce RAPD révélant une taille de génome d'environ 3000 bp, l'usage des 12 amorces RAPD permet un sondage aléatoire d'environ 2% du génome global de *H. pylori*.

Connaissant la séquence des gènes codant pour les 9 marqueurs isoenzymatiques considérés en MLEE, la taille de génome étudiée peut être estimée à environ 0,4% du génome global.

Etant donné que tous les marqueurs sont indépendants, d'après les tests *f'* pratiqués sur l'ensemble des données collectées, la taille de génome analysée par les différentes techniques mises en œuvre dans cette étude représente donc de l'ordre de 2,7% du génome global de *H. pylori*.

2.3.2. Polymorphisme mis en évidence par les différents marqueurs

Les résultats obtenus pour 39 des souches de *H. pylori* par ribotypage, par l'analyse du polymorphisme de restriction des gènes *ureA-ureB* et *flaA*, par génotypage du gène *vacA* et détection de *cagA* et de l'IS605 ont fait l'objet d'une publication (Salaun *et al.*, 1998).

2.3.2.1. Analyses phénétiques et de génétique des populations

Hormis les facteurs *vacA*, *cagA* et IS605, chacun des marqueurs utilisés met en évidence une importante diversité génétique.

Les distances génétiques moyennes entre les souches révélées pour chacun des marqueurs sont grandes et ne sont pas significativement différentes, d'après les tests de Student. Ainsi, les dendrogrammes établis sur les matrices de distances génétiques de Jaccard générées pour chacun des marqueurs analysés montrent des branches profondes. Les souches de *H. pylori* sont fortement dispersées et semblent se distribuer de façon aléatoire sur chacun des arbres, sans corrélation apparente d'un arbre à l'autre.

Toutefois, le test *g*, pratiqué sur les différents jeux de données pris deux à deux, montre une congruence dans les distances génétiques générées par les marqueurs *ureA-ureB* et RAPD, *flaA* et RAPD, et *flaA* et MLEE. Cependant, les tests *f* réalisés sur les matrices combinant les données brutes *ureA-ureB* et RAPD, *flaA* et RAPD, et *flaA* et MLEE ne mettent pas en évidence de déséquilibre de liaison dans l'échantillon *H. pylori* analysé et, dans tous les cas, le calcul de l'indice d'association entre les locus (I_A) n'est pas significativement différent de zéro.

2.3.2.2. Méthodes d'analyses factorielles : analyse des correspondances multiples

Des analyses factorielles ont été conduites sur l'ensemble des 87 souches de *H. pylori* de l'échantillon étudié.

Les différentes méthodes d'analyses factorielles ont pour objectif de résumer l'information apportée par un grand nombre de variables par un nombre restreint de variables nouvelles. L'analyse factorielle des correspondances, aussi appelée analyse des correspondances multiples, est une de ces méthodes. L'analyse factorielle des correspondances est une méthode analogue à l'analyse en composantes principales destinée à traiter un tableau de variables qualitatives observées sur des individus. Cependant, elle diffère de cette dernière par l'utilisation d'une matrice de covariance basée sur les distances de χ^2 plutôt qu'une matrice de covariance basée sur des distances Euclidiennes. Ces deux techniques décrivent la dispersion des individus ou des variables dans un espace multidimensionnel.

Ainsi, différentes analyses factorielles ont été conduites en regroupant l'ensemble des données obtenues pour chacun des marqueurs, d'une part, et en considérant chacun des marqueurs indépendamment, d'autre part.

Dans une première étape, chaque souche a été projetée sur le plan F1/F2. Quelle que soit la matrice de données analysée, toutes les souches se placent autour de l'origine et dessinent un nuage de point unique. Les axes F1 et F2 rendent compte d'une très faible part de la variance totale de l'échantillon (<10% pour tous les marqueurs considérés, pris ensemble ou séparément, sauf pour les marqueurs *vacA*, *cagA* et *IS605* où les deux premiers axes de l'analyse rendent compte de 77% de la variance totale de l'échantillon).

Dans une seconde étape, les données des gènes *vacA* (types s et m) ont été introduites dans l'analyse en tant que variables illustratives. Cette étape a été répétée en prenant cette fois *cagA* puis IS605 comme variables illustratives. Les ellipses (au seuil de confiance de 90%) sont utilisées comme résumé graphique de la position des souches de chaque type *vacA*, *cagA* et IS605. Sur les plans factoriels établis à partir des données des marqueurs *ureA-ureB*, *flaA*, MLEE et RAPD considérés séparément, les souches se répartissent indépendamment de leur génotype *vacA*, de leur statut *cagA* et de leur statut IS605 (Figure III.16). Ce résultat est également obtenu par l'analyse des marqueurs MLEE et RAPD les moins variables.

3. RECHERCHE D'UNE STRUCTURATION GENETIQUE EN FONCTION DE L'ORIGINE GEOGRAPHIQUE DES SOUCHES DE *HELICOBACTER PYLORI*

Les souches de *H. pylori* considérées dans cette étude proviennent de différentes origines géographiques (cf. Annexe 1). Les souches sont issues pour près des deux tiers (65,5%) de deux hôpitaux français : Brest (47,4%) et Poitiers (52,6%). Les autres souches proviennent du Venezuela (9,2%) et d'Asie (Hong-Kong, Chine, Japon, Inde) (14,9%) ; des souches de référence isolées chez des patients français (CIP101260), britannique (26695), américains (ATCC43579, J99, Tx30a, 84-183, 85-456, 86-338) et australien (SS1) sont également considérées. Une éventuelle structuration géographique au sein de l'échantillon *H. pylori* analysé a été recherchée en considérant d'une part la population de souches d'origine du sud est asiatique (Honk-Kong, Chine, Japon, Inde) *versus* la population non-asiatique, et d'autre part en considérant la population des souches de Brest *versus* la population des souches de Poitiers.

Les résultats des indices de diversité génétique et des tests de déséquilibre de liaison obtenus pour les différents groupes géographiques considérés sont indiqués dans le tableau III.8.

❖ Diversité génétique

Les diversités génétiques obtenues dans chacun des groupes géographiques définis, ont été comparées par des tests de Student.

Ainsi, pour chacun des marqueurs génétiques mis en œuvre, la diversité génétique moyenne révélée dans le groupe Asie n'est pas significativement différentes de celle rencontrée dans le groupe non-Asie.

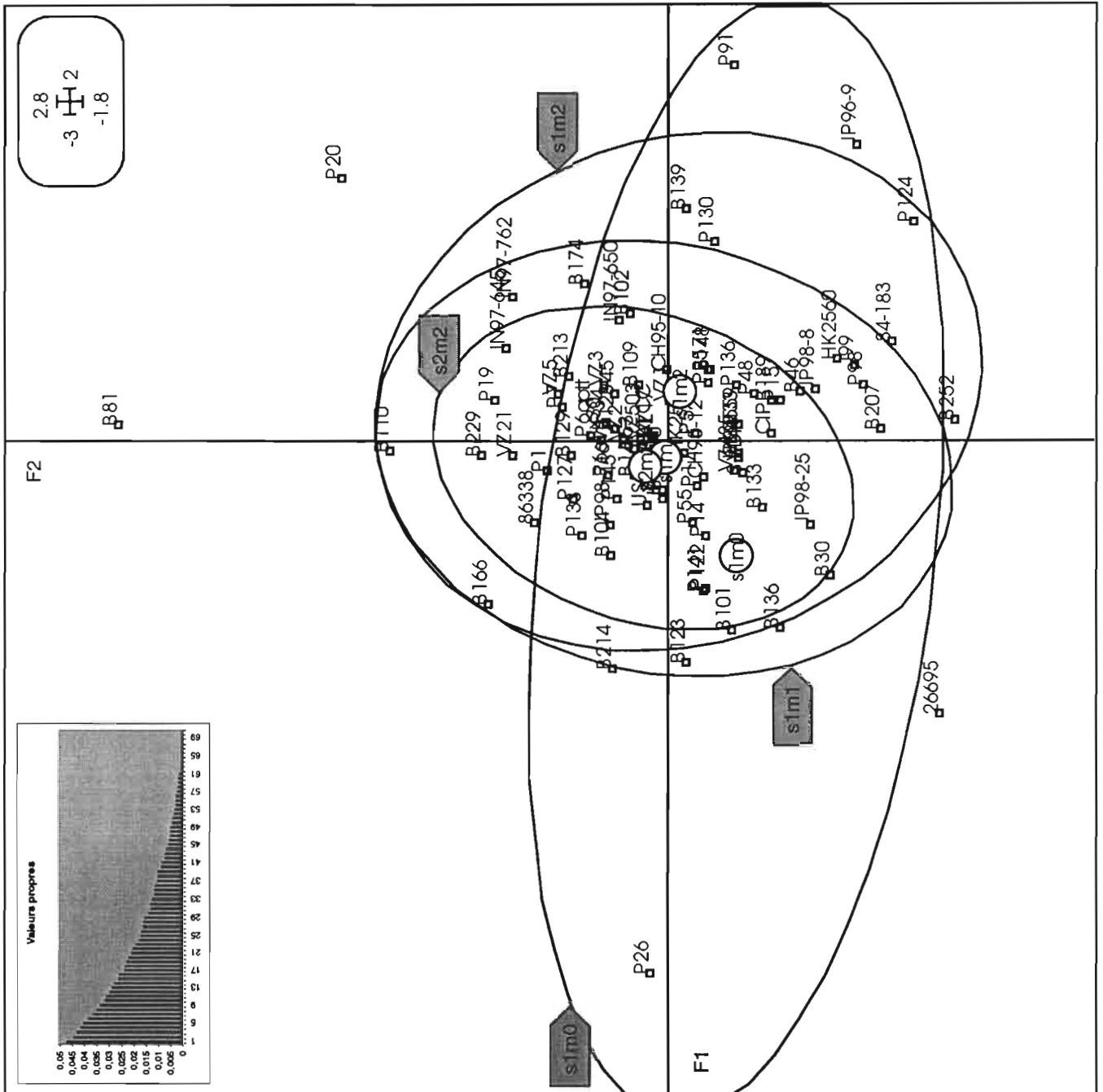


Figure III.16 : Analyse factorielle des correspondances des 87 souches de *Helicobacter pylori* de l'étude basée sur les données du polymorphisme des isoenzymes.

Note : les données du type du gène *vacA*, considérées comme des observations supplémentaires, sont projetées sur le plan factoriel F1/F2. La position des souches suivant leur type *vacA* est résumée par des ellipses (au seuil de confiance de 90%). Le plan factoriel est défini par les deux principaux axes de l'analyse bien que, d'après le diagramme des valeurs propres, il apparaît que les axes F1 et F2 ne rendent compte que d'une très faible part de la variance totale de l'échantillon. L'AFC est réalisée sur le logiciel ADE-4 (Thioulouse et Chessel, Laboratoire de Biométrie, Université Claude Bernard Lyon I).

Tableau III.8 : Indices de variabilité génétique et tests de déséquilibre de liaison réalisés sur les 87 souches de *Helicobacter pylori* de l'étude, considérant différentes zones géographiques.

Zone géographique	Total	MLEE				RAPD				MLEE/RAPD
		H	MD±SD	I _A	f	H	MD±SD	I _A	f	g
Total	87	0,662	0,631±0,139	-1,934e-05±0,021	NS	0,893	0,667±0,090	0,039±0,024	NS	r=0,108; p=0,0081
non-Asie	74	0,653	0,627±0,137	-0,025±0,025	NS	0,878	0,655±0,091	-0,003±0,028	NS	r=0,115; p=0,0103
Asie	13	0,587	0,550±0,171	0,178±0,143	NS	0,942	0,668±0,083	-0,541±0,169	NS	NS
Brest	27	0,664	0,631±0,134	-0,099±0,069	NS	0,850	0,628±0,088	-0,187±0,075	NS	NS
Poitiers	30	0,669	0,645±0,134	-0,009±0,063	NS	0,880	0,653±0,097	-0,070±0,068	NS	r=0,204; p=0,0027

Zone géographique	Total	ureA-ureB				flaA				ureA-ureB/flaA
		H	MD±SD	I _A	f	H	MD±SD	I _A	f	g
Total	87	0,895	0,477±0,146	-0,078±0,033	NS	0,691	0,473±0,249	0,023±0,014	NS	NS
non-Asie	74	0,884	0,470±0,152	-0,086±0,035	NS	0,643	0,423±0,230	-0,001±0,020	NS	r=0,127; p=0,0430
Asie	13	0,942	0,457±0,123	-0,531±0,242	NS	0,827	0,601±0,250	0,114±0,128	NS	NS
Brest	27	0,870	0,441±0,164	-0,127±0,080	NS	0,691	0,467±0,224	-0,089±0,048	NS	NS
Poitiers	30	0,918	0,514±0,146	-0,192±0,117	NS	0,615	0,388±0,250	0,038±0,053	NS	NS

^a H est la diversité génétique moyenne : c'est la moyenne arithmétique des valeurs (h) à tous les locus, avec (h) : diversité génétique à chaque locus (Nei, 1978).

^b MD±SD est la distance génétique de Jaccard moyenne ± écart-type : c'est la moyenne arithmétique des distances génétiques, lesquelles quantifient les niveaux de dissimilarité entre les différents génotypes (Jaccard, 1908).

^c I_A est l'indice d'association entre les locus (Brown *et al.*, 1980) (Maynard Smith *et al.*, 1993).

^d Le test f calcule la probabilité d'observer un déséquilibre de liaison dans la population analysée supérieur ou égal à celui qui est effectivement observé (le seuil de significativité est fixé à 0,01) (Tibayrenc *et al.*, 1990).

^e Le test g calcule la probabilité d'obtenir une corrélation entre deux séries de marqueurs génétiques indépendants égale ou supérieure à celle effectivement observée dans l'échantillon (Mantel, 1967). (r) indique le coefficient de Pearson et (p) indique la probabilité observée (le seuil de significativité est fixé à 0,05).

NS : non significatif.

De la même façon, les diversités génétiques rencontrées dans les deux populations françaises ne sont pas significativement différentes.

❖ Diversité génotypique et indice de diversité génotypique

Une diversité génotypique comparable est retrouvée dans les groupes Asie et non-Asie pour chaque marqueur analysé, à l'exception du marqueur *ureA-ureB* qui, dans le groupe Asie montre une diversité génotypique significativement supérieure à celle retrouvée dans le groupe non-Asie.

Cependant l'indice de diversité génotypique, définit comme étant le rapport entre le nombre de génotypes différents à chaque locus et le nombre de souches, et calculé pour le marqueur *ureA-ureB*, n'est pas significativement différent dans le groupe Asie et le groupe non-Asie. Des indices de diversité génotypique comparables sont trouvés dans ces deux groupes pour le marqueur *flaA* également. En revanche, pour les marqueurs RAPD et MLEE, les indices de diversité génotypique trouvés dans les groupes Asie et non-Asie sont significativement différents ($p < 5 \cdot 10^{-3}$, test *t*).

A l'exception d'une souche chinoise qui présente un type DIA spécifique, tous les génotypes rencontrés en MLEE dans le groupe Asie sont également rencontrés dans le groupe non-Asie. En revanche, un plus grand nombre de génotypes spécifiques du groupe Asie sont mis en évidence par les marqueurs *ureA-ureB*, *flaA* et RAPD.

Une diversité génotypique et un indice de diversité génotypique comparables sont trouvés dans les groupes Brest et Poitiers, quel que soit le marqueur considéré.

❖ Distribution géographique des génotypes *vacA* et des statuts *cagA* et IS605

L'ensemble des résultats concernant la distribution géographique des génotypes *vacA* et des statuts *cagA* et IS605 est présenté dans l'annexe 6.

Les 13 souches asiatiques étudiées présente le génotype *vacA* s1a m2. De plus, 11 d'entre elles sont de type *cagA*⁺ et IS605⁺. A l'exception du type *cagA*⁺, ces génotypes sont significativement associés au groupe Asie, au sens du χ^2 ($p < 0,05$).

Les souches françaises, quant à elles, présentent indifféremment les types *vacA* m1 (42,1%) et m2 (52,6%), mais présentent plus fréquemment le type *vacA* s1 (75,4%) que le type *vacA* s2 (24,6%). Le sous-type *vacA* s1a est significativement retrouvé dans la population de

souches de Brest, tandis que le sous-type *vacA* s1b est significativement retrouvé dans la population de souches de Poitiers ($p=0,003$, test χ^2). En outre, il apparaît que les groupes Brest et Poitiers sont significativement associés aux types *cagA*- et *cagA*+, respectivement ($p=0,05$, test χ^2) ; cette distribution différentielle pourrait être due à un biais d'échantillonnage lié à la taille réduite des séries. En moyenne, 38,6% des souches françaises possèdent la séquence IS605.

Les données acquises pour les facteurs *vacA*, *cagA* et IS605 ont été soumises à une analyse factorielle des correspondances. L'origine géographique des souches a été introduite dans l'analyse en tant que variable illustrative. Sur les plans factoriels, les ellipses de probabilité correspondant à chaque origine géographique ont été dessinées (Figure III.17). Ces ellipses prennent en compte 90% des souches appartenant à chacune des catégories géographiques prédéfinies. Les ellipses de probabilité définies pour chaque origine géographique se recouvrent. Ainsi, les génotypes *vacA* et les statuts *cagA* et IS605 ne parviennent pas à distinguer nettement les souches en fonction de leur origine géographique.

❖ Analyses phénétiques de classification

Les distances génétiques de Jaccard moyennes observées pour chaque marqueur dans les groupes Asie et non-Asie sont significativement différentes, d'après le test de Student.

Sur le dendrogramme UPGMA construit à partir des données obtenues pour l'ensemble des marqueurs mis en œuvre, un groupe Asie se distingue. Ce groupe exclut cependant les souches indiennes, ainsi que deux souches de Hong-Kong. Un résultat similaire est obtenu pour le dendrogramme UPGMA construit à partir des données combinées des gènes *ureA-ureB* et *flaA*, de RAPD et de MLEE, suggérant que la constitution de ce groupe n'est pas le seul fait des données des facteurs *vacA*, *cagA* et IS605 (Figure III.18).

En outre, sur les dendrogrammes UPGMA et Neighbor-Joining construits à partir des données MLEE (Figure III.13), les souches Asie tendent à se rassembler en deux groupes, qui, eux aussi excluent les souches indiennes. Cette dernière observation reste valable pour les dendrogrammes construits à partir des marqueurs MLEE les moins variables (Figure III.15). En revanche, les souches Asie se trouvent dispersées sur dendrogrammes construits à partir des données des marqueurs RAPD (Figure III.9 et Figure III.11).

Il est à noter que, si seules les souches de types *cagA*+ sont considérées dans l'analyse, le dendrogramme, construit à partir des données obtenues pour l'ensemble des marqueurs mis en œuvre, met en évidence un groupe Asie, constitué des souches du Japon et de Chine, nettement distingué des autres souches (figure non présentée).

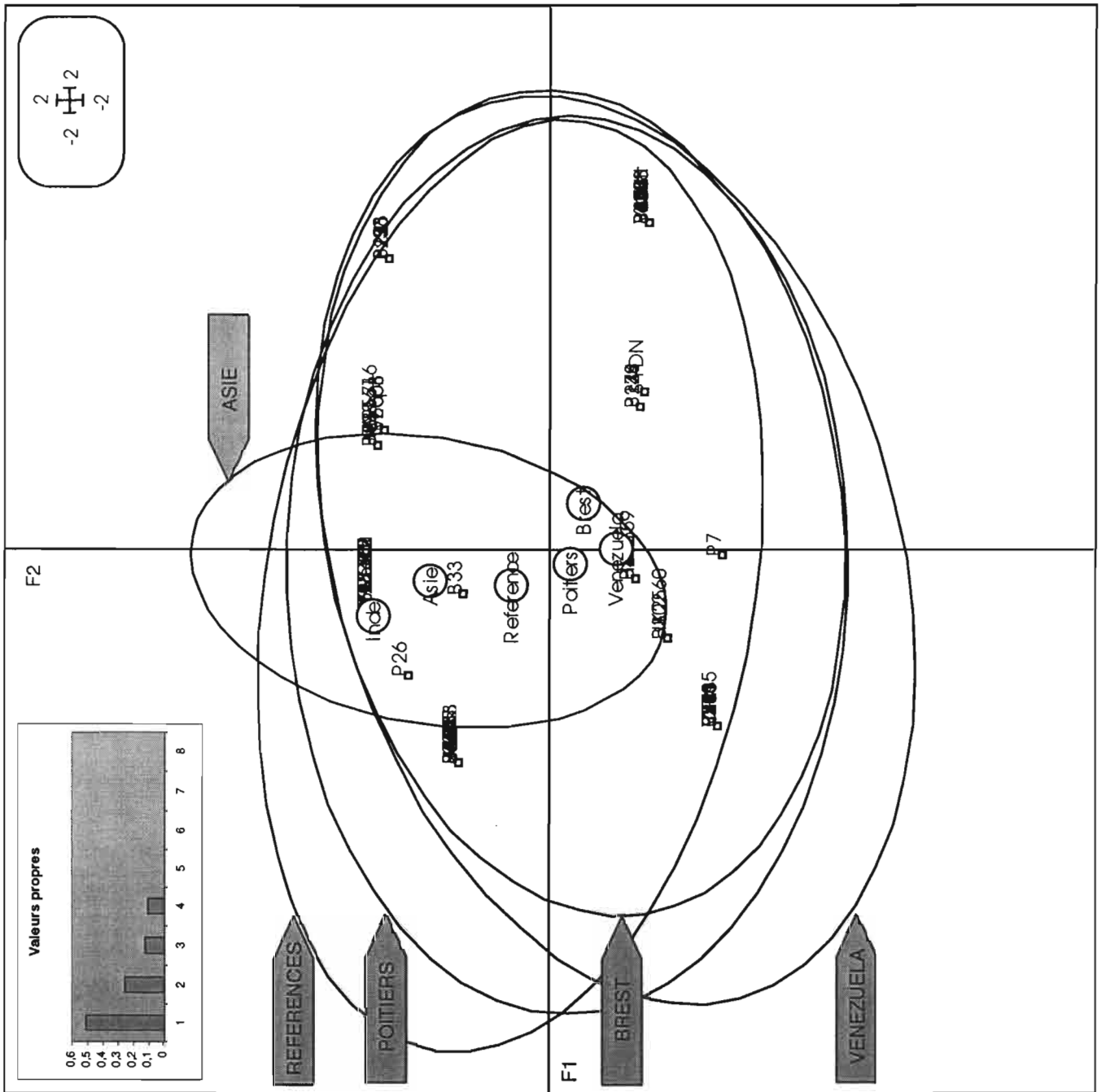


Figure III.17 : Analyse factorielle des correspondances des 87 souches de *Helicobacter pylori* de l'étude basée sur les données des facteurs *vacA*, *cagA* et IS605.

Note : l'origine géographique des souches, considérée comme une observation supplémentaire, est projetée sur le plan factoriel F1/F2.

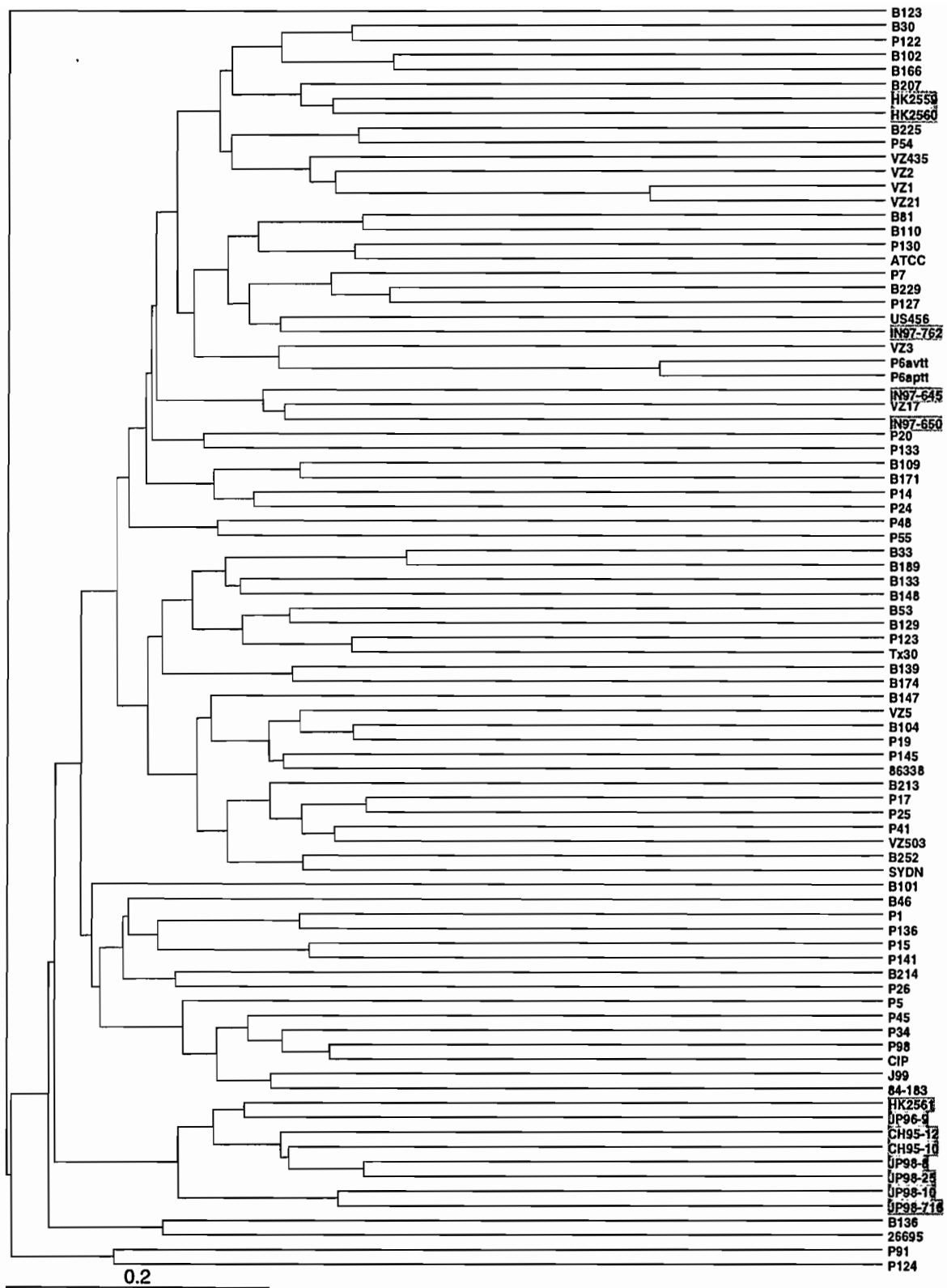


Figure III.18a: Dendrogramme UPGMA construit pour les 87 souches de *Helicobacter pylori* de l'étude à partir des données combinées des marqueurs *ureA-ureB*, *flaA*, *vacA*, *cagA*, IS605, RAPD et MLEE.

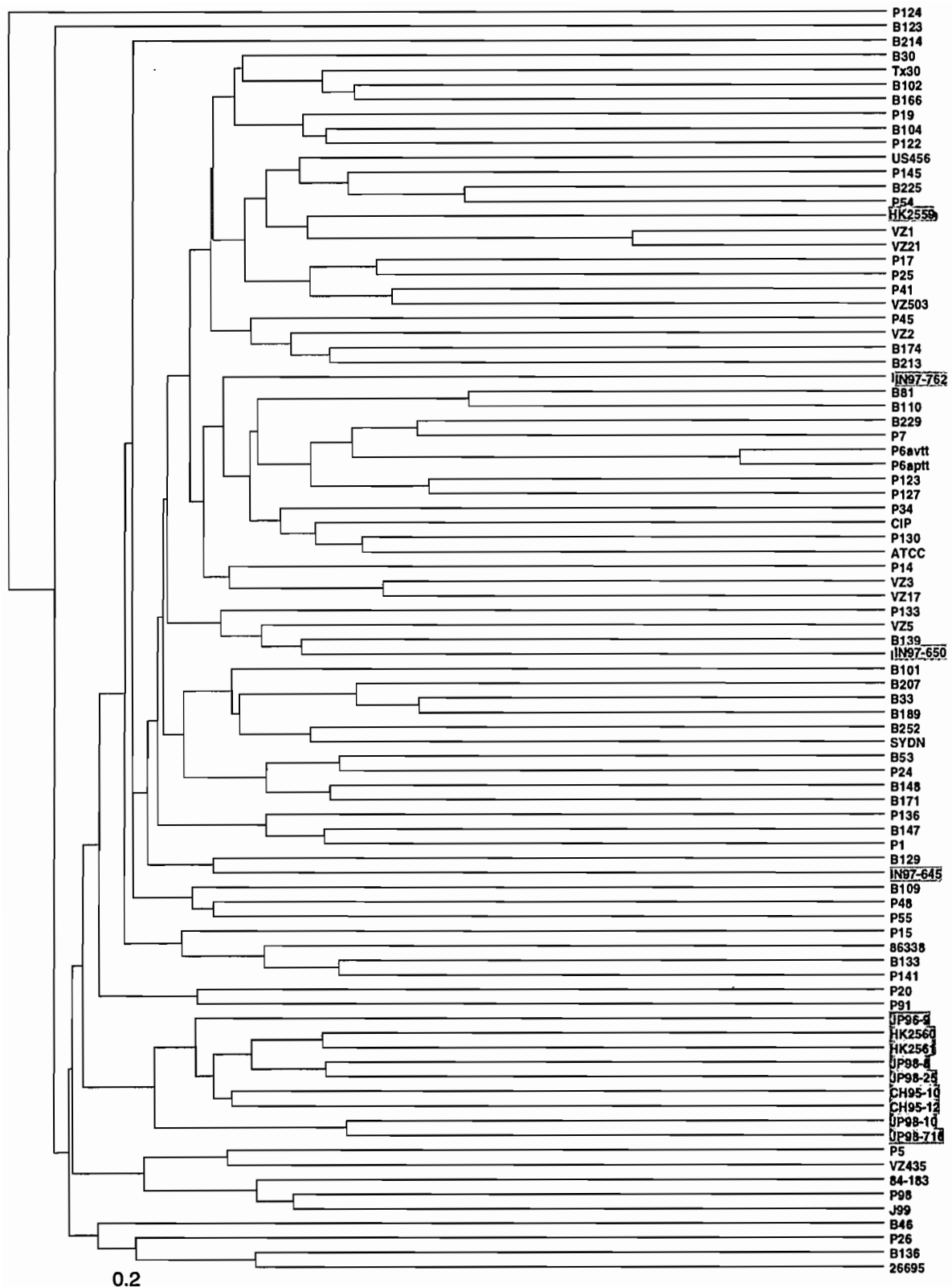


Figure III.18b : Dendrogramme UPGMA construit pour les 87 souches de *Helicobacter pylori* de l'étude à partir des données combinées des marqueurs *ureA-ureB*, *flaA*, RAPD et MLEE.

Quel que soit le marqueur mis en œuvre, les souches du Venezuela ainsi que les souches de référence de différentes origines géographiques ne montrent pas de structuration géographique.

Les distances génétiques de Jaccard moyennes observées pour chaque marqueur dans les groupes Brest et Poitiers, ne sont pas significativement différentes. Les souches françaises sont également dispersées sur les différents dendrogrammes construits, indépendamment de leur origine géographique locale, Brest ou Poitiers.

❖ Analyses factorielles des correspondances

Pour chacun des marqueurs étudiés, des analyses factorielles de correspondances ont été conduites, et l'origine géographique des souches a été introduite dans l'analyse en tant que variable illustrative. Ainsi, il apparaît que les ellipses de probabilité définies pour chaque origine géographique se recouvrent (ex. Figure III.17).

Par ailleurs, une analyse factorielle des correspondances a été menée sur les souches *cagA+* à partir des données obtenues pour l'ensemble des marqueurs. Le barycentre de l'ellipse correspondant aux souches Asie se distingue nettement du barycentre de l'ellipse correspondant aux souches non-Asie (figure non présentée).

Ainsi, les résultats des analyses factorielles de correspondances rejoignent les résultats des analyses phénétiques.

❖ Analyses de génétique des populations

Afin de déterminer (i) si la fréquence des recombinaisons pouvait varier d'un groupe géographique à l'autre ; (ii) si un éventuel déséquilibre de liaison sur l'échantillon global résulterait de l'effet d'allopatrie (effect type « Wahlund »), des calculs d'indice d'association entre les locus et des tests de déséquilibre de liaison ont été réalisés en considérant chacun des groupes géographiques de façon indépendante (Tableau III.8). Quel que soit le groupe géographique étudié et quel que soit le marqueur génétique analysé, l'indice I_A n'est pas significativement différent de zéro et les tests f et f' sont non significatifs, suggérant donc une fréquence de recombinaison élevée dans tous les groupes considérés.

Certains tests g sont marginalement significatifs dans les populations non-Asie et Poitiers ; ils mettent en évidence une congruence entre les marqueurs MLEE et RAPD, notamment.

4. RECHERCHE D'UNE STRUCTURATION GENETIQUE EN FONCTION DE L'ORIGINE CLINIQUE DES SOUCHES DE *HELICOBACTER PYLORI*

Les données cliniques (pathologie présentée par le patient, âge et sexe du patient, date de prélèvement) ont été obtenues pour 58 souches de l'étude, dont 54 souches françaises et 4 souches de référence (cf. Annexe 1). Pour cette analyse ont été retenues les souches issues de patients qui en endoscopie présentaient un ulcère ou une gastrite ; les souches issues de patients présentant un cancer ont été écartées en raison du trop faible effectif que représente cette catégorie (3 des 58 souches).

Ainsi une structuration en fonction de l'origine clinique des souches a été recherchée en considérant les souches issues de gastrite (65,5%) *versus* les souches issues d'ulcère (34,5%).

Les résultats des indices de diversité génétique et des tests de déséquilibre de liaison obtenus pour les différents groupes pathologiques considérés sont indiqués dans le tableau III.9.

❖ Exploration des données cliniques

Des tests de χ^2 ont été réalisés afin de déceler des biais d'échantillonnage éventuels qui pourraient gêner l'interprétation des données pathologiques.

L'origine géographique (Brest ou Poitiers), le sexe et l'âge des patients (< 50 ans ou \geq 50 ans) ne montrent pas de biais vis à vis de l'origine pathologique des souches. Toutefois, la population de femmes considérée est significativement plus âgée que la population d'hommes considérée.

❖ Diversité génétique

Les diversités génétiques obtenues dans chacun des groupes pathologiques définis ont été comparées par des tests de Student. Ainsi, pour chacun des marqueurs génétiques mis en œuvre, la diversité génétique moyenne dans les groupes gastrite et ulcère n'est pas significativement différente.

Tableau III.9 : Indices de variabilité génétique et tests de déséquilibre de liaison réalisés sur les 55 souches de *Helicobacter pylori* dont la pathologie associée (gastrite ou ulcère) est connue.

Pathologie associée	Total	MLEE				RAPD				MLEE/RAPD
		H	MD±SD	I _A	f	H	MD±SD	I _A	f	g
Gastrite ou ulcère	55	0,671	0,644±0,132	-0,057±0,034	NS	0,876	0,653±0,095	0,028±0,037	NS	r=0,172; p=0,0006
Gastrite	36	0,682	0,657±0,131	-0,077±0,052	NS	0,878	0,653±0,092	-0,076±0,057	NS	r=0,234; p=0,0002
Ulcère	19	0,656	0,622±0,127	-0,134±0,099	NS	0,877	0,601±0,105	0,002±0,106	0,00	NS

Pathologie associée	Total	ureA-ureB				flaA				ureA-ureB/flaA
		H	MD±SD	I _A	f	H	MD±SD	I _A	f	g
Gastrite or ulcère	55	0,902	0,490±0,154	-0,129±0,060	NS	0,671	0,447±0,235	-0,025±0,024	NS	NS
Gastrite	36	0,899	0,495±0,156	-0,168±0,082	NS	0,665	0,430±0,236	0,000±0,035	NS	r=0,170; p=0,0350
Ulcère	19	0,915	0,479±0,138	-0,376±0,167	NS	0,664	0,457±0,230	-0,134±0,082	NS	NS

^a H est la diversité génétique moyenne : c'est la moyenne arithmétique des valeurs (h) à tous les locus, avec (h) : diversité génétique à chaque locus (Nei, 1978).

^b MD±SD est la distance génétique de Jaccard moyenne ± écart-type : c'est la moyenne arithmétique des distances génétiques, lesquelles quantifient les niveaux de dissimilarité entre les différents génotypes (Jaccard, 1908).

^c I_A est l'indice d'association entre les locus (Brown *et al.*, 1980) (Maynard Smith *et al.*, 1993).

^d Le test f calcule la probabilité d'observer un déséquilibre de liaison dans la population analysée supérieur ou égal à celui qui est effectivement observé (le seuil de significativité est fixé à 0,01) (Tibayrenc *et al.*, 1990).

^e Le test g calcule la probabilité d'obtenir une corrélation entre deux séries de marqueurs génétiques indépendants égale ou supérieure à celle effectivement observée dans l'échantillon (Mantel, 1967). (r) indique le coefficient de Pearson et (p) indique la probabilité observée (le seuil de significativité est fixé à 0,05).

NS : non significatif.

❖ Diversité génotypique

Que les souches proviennent d'ulcère ou de gastrite, elles présentent une diversité génotypique comparable pour chacun des marqueurs analysés.

De la même façon, elles présentent des indices de diversité génotypique comparables.

❖ Distribution pathologique des génotypes *vacA* et des statuts *cagA* et IS605

D'après les tests de χ^2 , il apparaît que les génotypes *vacA* et des statuts *cagA* et IS605 sont également distribués suivant les pathologies observées.

De la même façon, sur les plans factoriels construits à partir des données acquises pour les facteurs *vacA*, *cagA* et IS605, les ellipses de probabilité définies pour chacune origine pathologique se positionnent à l'origine et se recouvrent totalement.

❖ Analyses phénétiques de classification

Afin de rechercher si les souches isolées d'ulcère constituent un groupe de souches génétiquement plus proches que les souches isolées de gastrite, des tests de Student ont été mis en œuvre pour comparer les distances génétiques de Jaccard moyenne observées. Ainsi, il apparaît que les distances génétiques de Jaccard moyennes observées pour chaque marqueur et dans chaque groupe pathologique ne sont pas significativement différentes.

Les souches se répartissent sur les dendrogrammes UPGMA construits à partir de l'analyse de chacun des marqueurs considérés indépendamment de leur origine pathologique.

❖ Analyses factorielles des correspondances

Les analyses factorielles des correspondances conduites sur chacun des marqueurs mis en œuvre révèlent une distribution des souches indépendamment de leur origine pathologique.

Dans la mesure où la gastrite peut, chez certains patients, évoluer au cours du temps vers un ulcère, on pourrait s'attendre à trouver des génotypes qui puissent prédire cette évolution. Ainsi, des analyses de correspondances ont été réalisées en considérant l'information « âge » (Figure III.19). Quatre classes ont été définies : patients de moins de 50 ans présentant

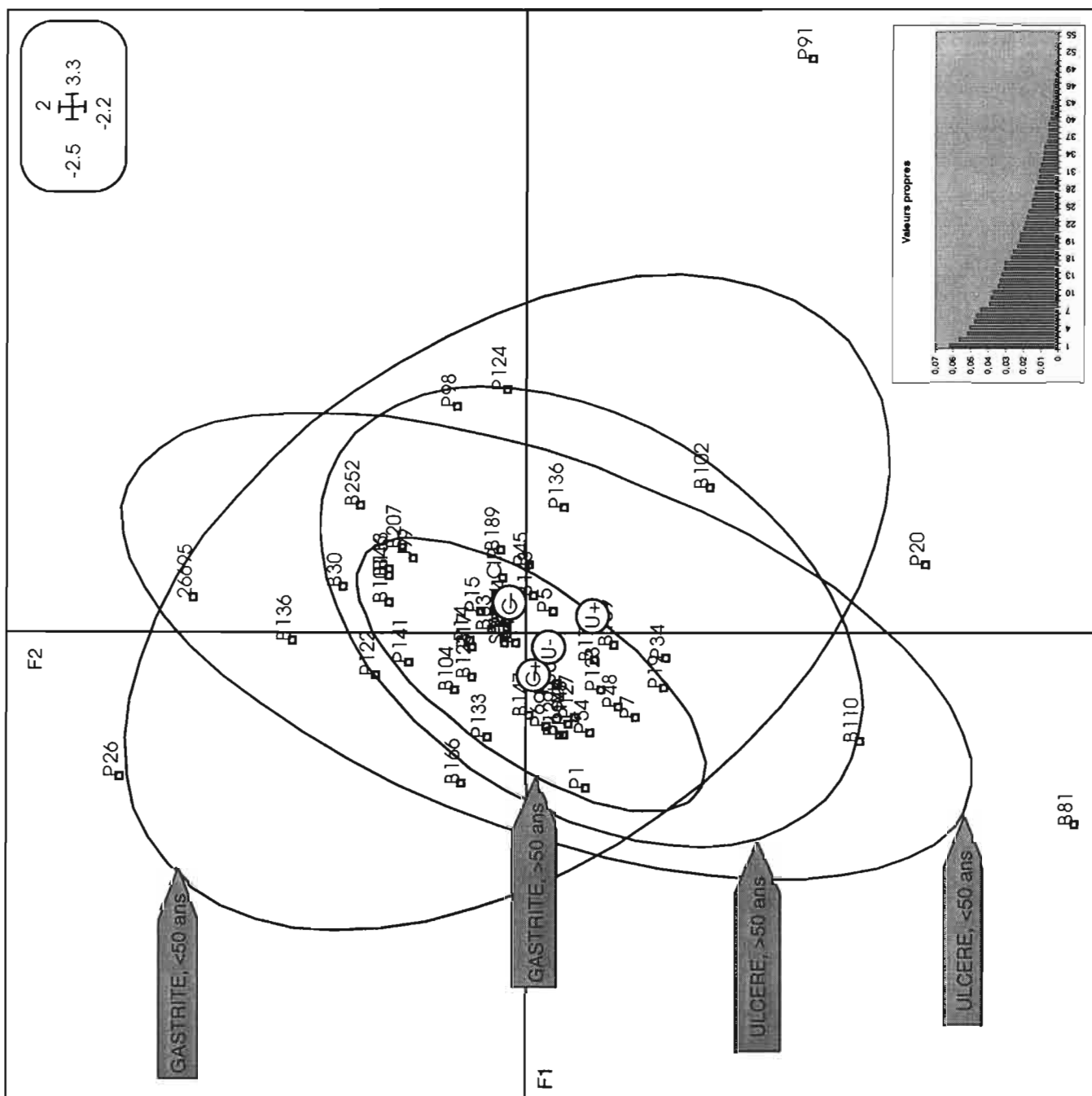


Figure III.19 : Analyse factorielle des correspondances des 55 souches de *Helicobacter pylori* d'origine clinique connue basée sur les données du polymorphisme des isoenzymes.

Note: l'origine clinique des souches, considérée comme une observation supplémentaire, est définie suivant 4 classes : patients de moins de 50 ans présentant une gastrite, patients de moins de 50 ans présentant un ulcère, patients de plus de 50 ans présentant une gastrite et patients de plus de 50 ans présentant un ulcère. L'origine clinique des souches, ainsi définie, est projetée sur le plan factoriel F1/F2.

une gastrite, patients de moins de 50 ans présentant un ulcère, patients de plus de 50 ans présentant une gastrite et patients de plus de 50 ans présentant un ulcère. Ces 4 classes sont projetées sur les plans factoriels construits à partir des données obtenues pour chacun des marqueurs considérés indépendamment, et pour l'ensemble des marqueurs. Les 4 ellipses ainsi dessinées se recouvrent. Ce résultat suggère qu'aucun génotype présenté par les souches du groupe gastrite ne peut prédire l'évolution vers l'ulcère.

❖ Analyses de génétique des populations

L'indice d'association I_A entre les locus calculé pour chacun des marqueurs et les tests de déséquilibre de liaison f et f' révèlent une absence de structuration au sein des deux groupes pathologiques gastrite et ulcère, à l'exception du test f significatif pour les données RAPD dans le groupe ulcère.

Certains tests g pratiqués entre les différents marqueurs analysés sont significatifs dans le groupe gastrite (Tableau III.9).

5. ANALYSE COMPAREE DES STRUCTURES GENETIQUES DE *HELICOBACTER PYLORI* ET D'AUTRES ESPECES DE MICROORGANISMES ETUDIES PAR RAPD ET MLEE

H. pylori présente une très grande diversité génétique, qui s'exprime pour tous les marqueurs moléculaires mis en œuvre dans cette étude. En outre, les analyses de génétique des populations sont en faveur d'une très haute fréquence des recombinaisons au sein de l'espèce.

Afin de mesurer l'étendue de la diversité génétique chez *H. pylori* et l'impact de la recombinaison dans cette espèce, il est informatif de comparer les résultats obtenus pour *H. pylori* aux résultats obtenus dans d'autres espèces.

Cette approche est possible dès lors que les microorganismes à comparer ont été étudiés avec les mêmes marqueurs moléculaires et que les résultats ont été soumis aux mêmes méthodes d'analyse.

Concernant les marqueurs moléculaires, les marqueurs généralistes RAPD et MLEE sont donc tout à fait appropriés. Concernant les méthodes d'analyse des résultats, le calcul de la diversité génétique (H), proposé par Nei (Nei, 1978), et la mesure du déséquilibre de liaison, par le calcul de l'indice d'association entre les locus (I_A), proposé par Brown *et al.* (1980) et Maynard-Smith *et al.* (1993), sont largement répandus, dès lors qu'il s'agit de données MLEE. Il

faut garder à l'esprit dans ces comparaisons que les performances et le niveau de résolution d'une technique donnée peuvent varier quelque peu d'un laboratoire à l'autre.

5.1. Comparaisons établies sur la base de la MLEE

5.1.1. Etendue de la diversité génétique de *H. pylori*

La diversité génétique de *H. pylori* est supérieure à celle rencontrée dans de nombreuses espèces de bactéries ou de protozoaires parasites (Tableau III.10).

La diversité génétique de l'espèce *H. pylori* est égale, ou, parfois même, supérieure à celle rencontrée dans certains genres bactériens. Par exemple, *H. pylori* présente une diversité génétique égale à celle des bactéries du genre *Bacillus* (étude portant sur *B. subtilis* et *B. licheniformis*) (Duncan *et al.*, 1994), *Borrelia* (étude portant sur 4 espèces du genre) (Boerlin *et al.*, 1992), *Campylobacter* (étude portant sur *C. jejuni* et *C. coli*) (Aeschbacher & Piffaretti, 1989), *Salmonella* (étude portant sur 5 espèces du genre) (Boyd *et al.*, 1996) (Selander *et al.*, 1996). En outre, *H. pylori* présente une diversité génétique supérieure à celle des bactéries du genre *Bordetella* (van der Zee *et al.*, 1997).

H. pylori présente une diversité génétique comparable à celles d'autres espèces bactériennes, telles que *Bacillus licheniformis*, une espèce de bactéries présentes dans le sol. Toutefois, cette espèce est subdivisée en deux sous-groupes, chacun d'entre eux présentant une diversité génétique réduite (Duncan *et al.*, 1994).

De plus, la diversité génétique de *H. pylori* apparaît supérieure à la diversité génétique de bactéries qui présentent un large spectre d'hôtes, telles que *Staphylococcus aureus* (Musser & Selander, 1986). La diversité génétique de *H. pylori* rencontrée à l'échelle locale ($H=0,664$ pour les souches de Brest, et $H=0,669$ pour les souches de Poitiers) apparaît également supérieure à la diversité génétique rencontrée pour des bactéries présentes sur de très larges zones géographiques, telles que *Streptococcus pyogenes* (Musser *et al.*, 1991).

Ainsi, compte tenu du fait que *H. pylori* constitue une espèce sans structuration intraspécifique apparente, le niveau de diversité génétique rencontré dans cette espèce est assez remarquable.

Tableau III.10 : Diversité génétique calculée sur les données MLEE pour plusieurs espèces de bactéries et de parasites.

Taxon		Nombre d'isolats	Nombre de ET	Nombre moyen d'alleles par locus	Diversité génétique (H)	Référence
<i>Bacillus</i>		98	93	-	0,695	(Duncan <i>et al.</i> , 1994)
<i>B. subtilis</i>		62	61	-	0,453	
<i>B. licheniformis</i>		36	32	-	0,676	
<i>B. cereus</i> et <i>B. thuringensis</i>		65	48	-	0,508	(Helgason <i>et al.</i> , 2000)
<i>Bordetella</i> spp.		202	38	-	0,252	(van der Zee <i>et al.</i> , 1997)
<i>B. bronchiseptica</i>		158	28	-	0,232	
<i>B. parapertussis</i>		26	6	-	0,147	
<i>B. pertussis</i>		18	4	-	0,178	
<i>Borrelia</i> spp.	(a)	-	35	5,9	0,673	(Boerlin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Burkholderia cepacia</i>	(b)	213	164	4,4	0,574	(Wise, Shimkets & McArthur, 1995)
<i>Campylobacter</i>		125	64	6,9	0,647	(Aeschbacher & Piffaretti, 1989)
<i>C. coli</i>		21	14	-	0,447	
<i>C. jejuni</i>		104	50	-	0,490	
<i>Erysipelothrix</i> spp.	(c)	-	50	3,7	0,314	(Chooromoney <i>et al.</i> , 1994)
<i>Escherichia coli</i>	(d)	202	187	6,8	0,682	(Souza <i>et al.</i> , 1999)
<i>Haemophilus influenzae</i>	(e)	-	280	6,4	0,467	(Musser <i>et al.</i> , 1990)
<i>Helicobacter pylori</i>		75	73	11	0,735	(Go <i>et al.</i> , 1996)
<i>Helicobacter pylori</i>		87	87	7,8	0,631	cette étude
<i>Legionella pneumophila</i>	(f)	-	50	3,2	0,312	(Selander <i>et al.</i> , 1985)
<i>Listeria monocytogenes</i>	(g)	181	50	4	0,415	(Boerlin & Piffaretti, 1991)
<i>Mycobacterium</i> spp.	(h)	45	33	-	0,580	(Wasem, McCarthy & Murray, 1991)
<i>M. avium</i> complex	(i)	37	24	2,8	0,380	(Wasem <i>et al.</i> , 1991)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	(j)	-	89	2,5	0,410	(O'Rourke & Stevens, 1993)
<i>Neisseria meningitidis</i>						
8 serogroupes principaux porteurs asymptomatiques	(k)	-	331	7,2	0,547	(Caugant <i>et al.</i> , 1988)
	(l)	-	78	6	0,538	(Caugant <i>et al.</i> , 1987)
<i>Salmonella</i> spp.	(m)	-	80	-	0,627	(Selander, Li & Nelson, 1996)
<i>Shigella</i> spp.	(n)	123	23	2,9	0,290	(Whittam, Ochman & Selander, 1983b)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(o)	-	252	6,7	0,289	(Musser & Selander, 1986)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	(p)	-	53	3,9	0,413	(Takala <i>et al.</i> , 1996)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	(q)	-	33	4,4	0,420	(Musser <i>et al.</i> , 1991)
<i>Vibrio cholerae</i>	(r)	397	279	9,5	0,436	(Beltran <i>et al.</i> , 1999)
<i>Plasmodium falciparum</i>	(s)	114	42	-	0,353	(Ben Abderrazak <i>et al.</i> , 1999)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	(t)	434	262	-	0,540	(Barnabé, Brisse & Tibayrenc, 2000)

Note : La diversité génétique (H) est calculée selon la formule $H=1-\sum x_i^2/(n/n-1)$ (Nei, 1978), où n est le nombre de types électrophorétiques (ET) dans l'échantillon, sauf pour *B. cepacia* et *P. falciparum* où n est le nombre d'isolats dans l'échantillon. Les valeurs de diversité génétique (H) sont données dans les publications citées en référence ou ont été calculées à partir des données brutes disponibles dans les articles cités.

- (a) Isolats d'au moins quatre espèces de *Borrelia* (*B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. japonica*)
- (b) Isolats de *B. cepacia* provenant d'eau de bassin
- (c) Isolats de *E. rhusiopathiae* et *E. tonsillarum*
- (d) Isolats de *E. coli* provenant de différents hôtes, ayant différents régimes alimentaires et venant de différentes zones géographiques
- (e) Isolats de *H. influenzae* de six sérotypes
- (f) Isolats de *L. pneumophila* provenant de différents continents
- (g) Isolats de *L. monocytogenes* (homme, animal, alimentation, environnement)
- (h) Isolats du complexe *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* and *M. fortuitum*
- (i) Isolats de *Mycobacterium* (25 *M. avium*, 10 *M. intracellulare* et 2 *M. paratuberculosis*)
- (j) Isolats de *N. gonorrhoeae* provenant du Royaume-Uni
- (k) Isolats de *N. meningitidis* provenant de différents continents
- (l) Isolats de *N. meningitidis* issus de personnes vivant en Norvège
- (m) Isolats représentatifs de cinq sous-espèces de *Salmonella*
- (n) Isolats de quatre espèces de *Shigella* (homme, différentes zones géographiques) (*S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. sonnei* et *S. flexneri*)
- (o) Isolats de *S. aureus* provenant d'humains présentant différentes maladies et provenant de vaches et de chèvres
- (p) Isolats de *S. pneumoniae* issus de porteurs sains et de malades provenant de Finlande
- (q) Isolats de *S. pyogenes* issus de malades provenant de l'ensemble des USA
- (r) Isolats de *V. cholerae* (homme, animal, environnement)
- (s) Isolats de *P. falciparum* provenant de différentes origines géographiques (Afrique, Asie, Amérique latine, Papouasie Nouvelle-Guinée)
- (t) Isolats de *T. cruzi* provenant de différents hôtes et de l'ensemble du continent américain

(complété d'après Go *et al.* (1996)).

5.1.2. Impact de la recombinaison chez *H. pylori*

L'indice I_A fournit une mesure du déséquilibre de liaison. Cet indice a été proposé par Maynard-Smith *et al.* (1993) afin de pouvoir comparer la structure des populations de différentes espèces. Le tableau III.11 présente les valeurs I_A obtenues pour différentes espèces de microorganismes, bactéries et protozoaires parasites. La figure III.20 reprend ces mêmes valeurs I_A sous forme d'histogramme.

La valeur du déséquilibre de liaison est très variable suivant les espèces de microorganismes. Ainsi, parmi toutes les espèces de microorganismes décrites, il apparaît que *H. pylori* présente la valeur I_A la plus faible. Cette valeur est même inférieure à celle de *Neisseria gonorrhoeae* et de *Plasmodium falciparum*, deux espèces réputées avoir une structure de population complètement recombinante sans aucun signe de clonalité (Maynard Smith *et al.*, 1993). Ce résultat est donc en faveur d'une recombinaison au hasard au sein des populations *H. pylori* considérées dans cette étude.

5.2. Comparaisons établies sur la base de la MLEE et de la RAPD

Tableau III.11: Mesures d'association entre les locus calculées sur les données MLEE de plusieurs taxons de bactéries et de protozoaires parasites

Taxon	Nombre d'isolats	Nombre de ET	Nombre de loci	Isolats		ET		Référence
				IA		IA		
<i>Helicobacter pylori</i>	87	87	9	0.00	± 0.02	0.00	± 0.02	cette étude
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	227	89	9	0.04	± 0.09	-0.16	± 0.17	O'Rourke & Stevens, 1993
<i>Neisseria meningitidis</i>	688	331	15	1.96	± 0.05	0.21	± 0.08	Caugant <i>et al.</i> , 1987
<i>Plasmodium falciparum</i>	29	29	13	0.19	± 0.26	0.19	± 0.26	Babiker <i>et al.</i> , 1991
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i>	276	100	9	0.23				Souza <i>et al.</i> , 1992
<i>Rhizobium meliloti</i>	232	50	14	6.34	± 0.09	4.74	± 0.19	Eardly <i>et al.</i> , 1990
"division a"	208	34	14	0.47	± 0.10	-0.24	± 0.24	
"division b"	23	15	14	0.24	± 0.29	0.01	± 0.35	
<i>Burkholderia cepacia</i> (eau de bassin)	213	164	8	0.25				Wise <i>et al.</i> , 1995
<i>Trypanosoma brucei</i>	321	74	6	0.45	± 0.07	0.09	± 0.15	Mihok <i>et al.</i> , 1989
<i>Trypanosoma cruzi</i>	524	19	4	2.63	± 0.06	0.86	± 0.32	Zhang <i>et al.</i> , 1988
<i>Escherichia coli</i> (ECOR)	72	46	11	0.57	± 0.03	0.30	± 0.04	
<i>Bordetella</i>	202	38	15	0.67	± 0.01	0.34	± 0.05	van der Zee <i>et al.</i> , 1997
<i>B. bronchiseptica</i>	158	28	15	0.81	± 0.01	0.71	± 0.07	
<i>B. parapertussis</i>	26	6	15	0.50	± 0.06	-0.21	± 0.26	
<i>B. pertussis</i>	18	4	15	2.13	± 0.12	-0.10	± 0.41	
<i>Campylobacter</i>	125	64	9	1.92	± 0.01	1.77	± 0.03	Aeschbacher & Piffaretti, 1989
<i>C. coli</i>	21	14	9	0.61	± 0.09	0.46	± 0.13	
<i>C. jejuni</i>	104	50	9	0.43	± 0.02	-0.01	± 0.04	
<i>Salmonella</i>	1,495	106	24	3.11	± 0.04	1.38	± 0.14	Selander <i>et al.</i> , 1996
<i>S. panama</i>	99	13	24	1.34	± 0.16	0.28	± 0.39	
<i>S. paratyphi B</i>	118	14	24	2.68	± 0.13	0.36	± 0.37	
<i>S. typhimurium</i>	340	17	24	1.03	± 0.10	1.22	± 0.33	
<i>S. paratyphi C</i>	100	9	24	4.66	± 0.15	4.07	± 0.46	
<i>S. choleraesuis</i>	174	11	24	2.57	± 0.12	1.36	± 0.42	
<i>Bacillus</i>	98	93	10	3.22	± 0.02	3.17	± 0.02	Duncan <i>et al.</i> , 1994
<i>B. subtilis</i>	62	61	10	1.15	± 0.03	1.15	± 0.03	
<i>B. licheniformis</i>	36	32	10	3.61	± 0.05	3.21	± 0.06	
<i>Legionella</i>	170	62	22	4.63	± 0.11	3.80	± 0.18	Selander <i>et al.</i> , 1985
<i>L. pneumophila</i>	143	50	22	1.49	± 0.12	0.69	± 0.20	
<i>L. "species 1"</i>	24	9	22	2.45	± 0.29	1.93	± 0.47	
<i>Haemophilus influenzae</i>	2,209	56	17	5.40	± 0.03	1.25	± 0.18	Musser <i>et al.</i> , 1990
"division 1"	2,117	42	17	4.42	± 0.03	0.90	± 0.21	
"division 2"	92	14	17	2.30	± 0.14	1.20	± 0.37	
<i>Mycobacterium</i>	47	33	20	7.10	± 0.04	6.45	± 0.06	Wasem <i>et al.</i> , 1991
<i>Mycobacterium avium</i> complex	35	23	20	6.70	± 0.05	5.94	± 0.08	
<i>Pseudomonas syringae</i>	23	10	26	18.35	± 0.29	12.11	± 0.44	Denny <i>et al.</i> , 1988
<i>P. syringae</i> tomato	17	4	26	3.39	± 0.33	1.68	± 0.67	
<i>P. syringae</i> <i>syringae</i>	6	6	26	1.42	± 0.57	1.42	± 0.57	

complété d'après Maynard-Smith *et al.* (1993)

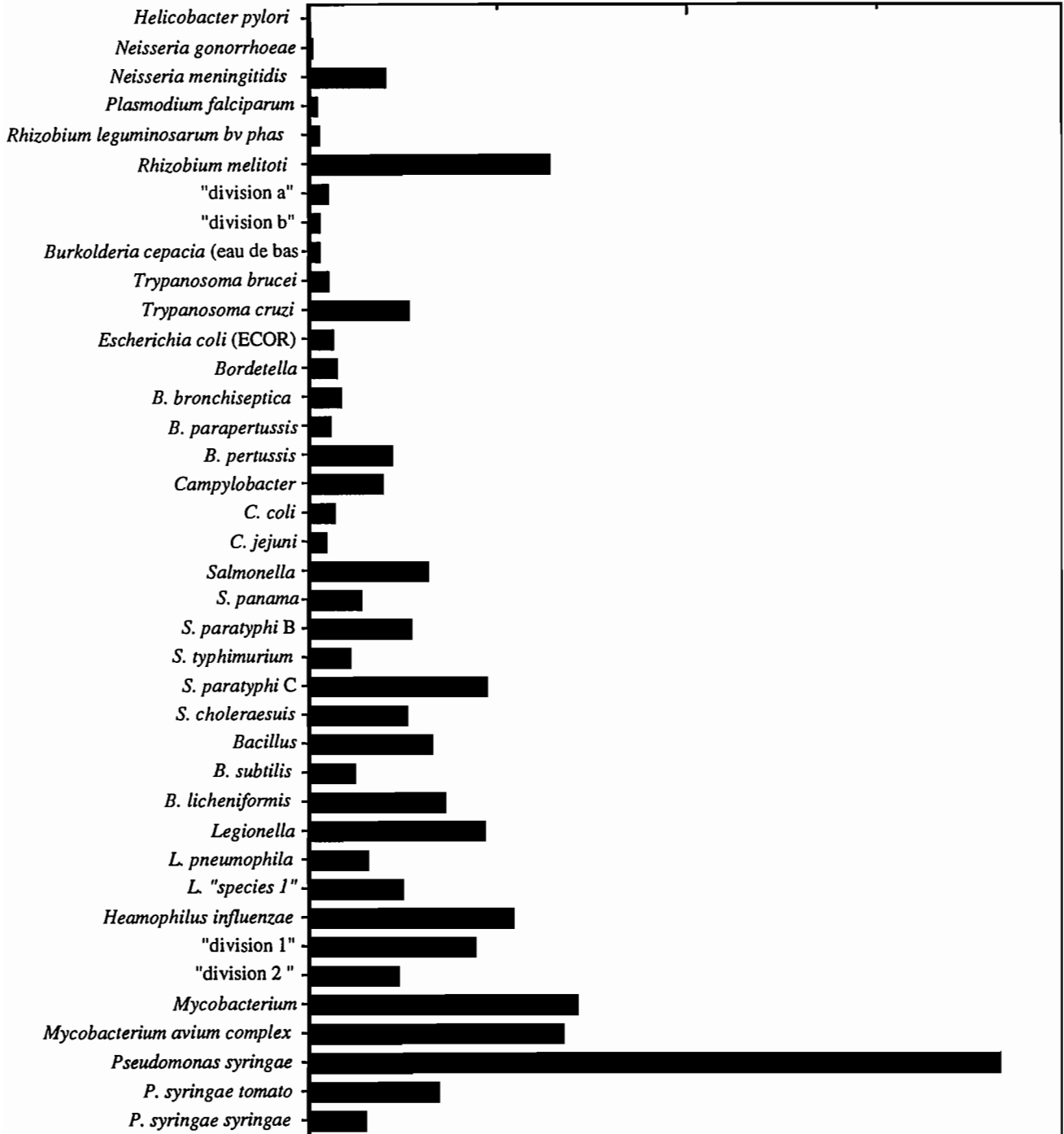


Figure III.20 : Mesures d'association entre les loci calculées sur les données de la MLEE obtenues pour quelques espèces de bactéries et de protozoaires parasites.
 Note : cette figure reprend les valeurs de l'indice I_A calculé sur l'ensemble des isolats analysés (et non sur les ET) (valeurs apparaissant dans le tableau III.11).

Certains microorganismes ont été étudiés à la fois par la méthode MLEE et par la méthode RAPD à des fins de génétique des populations. C'est le cas notamment des bactéries *Escherichia coli* et *Neisseria meningitidis* (séro groupe A), et de l'espèce protozoaire parasite *Trypanosoma cruzi*.

Les données brutes acquises dans ces études ont été recueillies auprès des auteurs (Marie Grandhomme, Aldert Bart, Christian Barnabé et Sylvain Brisse). Puis, elles ont été soumises aux mêmes méthodes d'analyse des résultats que celles appliquées à *H. pylori*. Ainsi, une comparaison solide, puisque basée sur deux marqueurs au lieu d'un seul, et sur plusieurs méthodes d'analyses plutôt que sur le seul indice I_A , a pu être réalisée entre la structure génétique de *H. pylori* et celle de ces microorganismes.

L'échantillon *E. coli* considéré est la collection ECOR établie par Ochman et Selander (Ochman & Selander, 1984) sur la base des résultats obtenus en MLEE (Whittam, Ochman & Selander, 1983). Les 72 souches ECOR ont été collectées chez différents hôtes et dans différentes zones géographiques, et sont globalement représentatives de l'espèce *E. coli*. Les résultats retenus pour cette étude comparative sont, pour la MLEE, ceux de Whittam *et al.* (1983), et, pour la RAPD, ceux de Grandhomme (1999). Les 5 sous-groupes considérés (A, B1, B2, C et D) sont ceux proposés par Herzer *et al.* (1990). Dans le modèle défini par Maynard-Smith *et al.* (1993), l'espèce *E. coli* a une structure globalement clonale, même si les échanges génétiques sont fréquents (Desjardins *et al.*, 1995).

L'échantillon *N. meningitidis* considéré est constitué de 84 souches du séro groupe A. Ces 84 souches représentent 84 types électrophorétiques mis en évidence par MLEE sur une collection de 290 souches de *N. meningitidis* isolées entre 1915 et 1989 chez des patients provenant de toutes les régions du monde (Wang *et al.*, 1992). Les résultats retenus pour cette étude comparative sont, pour la MLEE, ceux de Wang *et al.* (1992), et, pour la RAPD, ceux de Bart *et al.* (1998). Les 9 sous-groupes considérés (I, II, III, IV-a, IV-b, V, VI, VII, VIII) sont ceux proposés par Wang *et al.* (1992). Dans le modèle défini par Maynard-Smith *et al.* (1993), l'espèce *N. meningitidis* (séro groupe A) a une structure clonale épidémique.

L'échantillon *T. cruzi* considéré est constitué de 262 souches correspondant aux 262 types électrophorétiques mis en évidence par MLEE sur une collection de 434 souches de *T. cruzi* isolées chez une grande variété d'hôtes vivant sur le continent américain (Amérique du Sud, Amérique Centrale, USA) (Barnabé *et al.*, 2000). Sur la base de ces travaux, 6 DTU (Discrete Typing Units) ont été définies (1, 2a, 2b, 2c, 2d et 2e). Les résultats retenus pour la RAPD concernent 49 souches de *T. cruzi* représentatives de chacune de ces DTU (Brisse, Barnabé & Tibayrenc, 2000). Dans le modèle défini par Maynard-Smith *et al.* (1993), l'espèce *T. cruzi* répond à un modèle d'évolution clonale (Tibayrenc *et al.*, 1986).

Le tableau III.12, ainsi que la figure III.21, présentent une comparaison des indices de variabilité génétique et des résultats des tests de déséquilibre de liaison obtenus pour *H. pylori* et ces trois espèces de microorganismes.

De l'étude de ces 4 espèces, il apparaît que la diversité génétique (H) révélée par la méthode MLEE est inférieure à la diversité génétique révélée par RAPD. Les diversités génétiques révélées par l'un et l'autre marqueurs pour une même espèce ne sont pas strictement corrélées.

Les distances génétiques de Jaccard moyennes observées en MLEE sont sensiblement identiques à celles observée en RAPD, quelle que soit l'espèce considérée.

Les indices d'association entre les locus (I_A) calculés à partir des données MLEE et RAPD n'apparaissent pas concordantes. Cette non concordance est notable dans le cas de *E. coli*. Elle tient à la grande différence entre le nombre de types électrophorétiques observées en MLEE (46 ET pour les 72 souches ECOR) et le nombre de types électrophorétiques observées en RAPD (71 ET pour les 72 souches ECOR), l'indice I_A étant calculé dans ces exemples sur les types électrophorétiques, et non sur les souches.

Les tests *f* pratiqués sur les données MLEE et RAPD obtenues pour *H. pylori* sont non significatifs contrairement aux tests réalisés sur *E. coli*, *N. meningitidis* (séro groupe A) et *T. cruzi*. Le test *g* pratiqué sur *H. pylori* est significatif, mais la probabilité d'obtenir une corrélation entre les marqueurs MLEE et RAPD chez *H. pylori* est au moins 100 fois inférieure à la probabilité d'obtenir une corrélation entre ces deux marqueurs chez les trois autres espèces de microorganismes.

En outre, les diagrammes illustrent le fait que l'étendue de la diversité génétique (indiqué par la mesure de H) et que l'impact des échanges génétiques (suggéré par l'indice I_A) sont indépendants l'un de l'autre. En effet, l'étendue de la diversité génétique pour les 4 espèces considérées est à peu près semblable, alors que leur structure génétique est totalement différente.

Le traitement des données par une analyse factorielle des correspondances permet d'illustrer la structure génétique de chacune de ces espèces de microorganismes (Figures III.22).

A la différence des 3 autres espèces analysées, aucun groupe génétique n'a pu être dessiné dans l'échantillon de *H. pylori* étudié. Pour *E. coli*, il apparaît une certaine individualisation du seul groupe A et une superposition des ellipses B1, B2, C et D : cette

Tableau III.12 : Comparaison des indices de variabilité génétique et des résultats des tests de déséquilibre de liaison obtenus pour *Helicobacter pylori* et trois autres espèces de microorganismes.

Taxon	MLEE							RAPD							MLEE/RAPD <i>g</i> ^e
	Nb souches	Nb ET	Nb loci	H ^a	MD±SD ^b	I _A ^c	f ^d	Nb souches	Nb ET	Nb loci	H ^a	MD±SD ^b	I _A ^c	f ^d	
<i>H. pylori</i>	87	87	9	0,662	0,631±0,139	0,00±0,02	NS	87	87	12	0,893	0,667±0,090	0,04±0,02	NS	p<10 ⁻²
<i>E. coli</i>	72	46	11	0,493	0,477±0,030*	0,30±0,04	p<10 ⁻⁴	72	71	10	0,943	0,578±0,020*	1,30±0,04*	p<10 ⁻⁴	p<10 ⁻⁴
<i>N. meningitidis</i>	290	84	15	0,380	0,380±0,023	0,88±0,02	p<2.10 ⁻⁴	84	84	4	0,961	0,382±0,016	0,07±0,07	p<2.10 ⁻⁴	p<10 ⁻⁴
<i>T. cruzi</i>	434	262	22	0,532	0,494±0,053	4,91±0,01	p<10 ⁻⁴	49	41	20	0,810	0,562±0,059*	7,63±0,04*	p<10 ⁻⁴	p<10 ⁻⁴

^a H est la diversité génétique moyenne (Nei, 1978).

^b MD±SD est la distance génétique de Jaccard moyenne ± écart-type (Jaccard, 1908).

^c I_A est l'indice d'association entre les locus (Brown *et al.*, 1980) (Maynard Smith *et al.*, 1993).

^d Le test f est un test de déséquilibre de liaison (le seuil de significativité est fixé à 0,01) (Tibayrenc *et al.*, 1990).

^e Le test g calcule la probabilité d'obtenir une corrélation entre deux séries de marqueurs génétiques indépendants (le seuil de significativité est fixé à 0,05) (Mantel, 1967).

NS : non significatif.

Les indices de variabilité génétique et les tests de déséquilibre de liaison ont été réalisés sur le nombre de types électrophorétiques (ET), sauf exception (*) où ceux-ci ont été réalisés sur le nombre de souches.

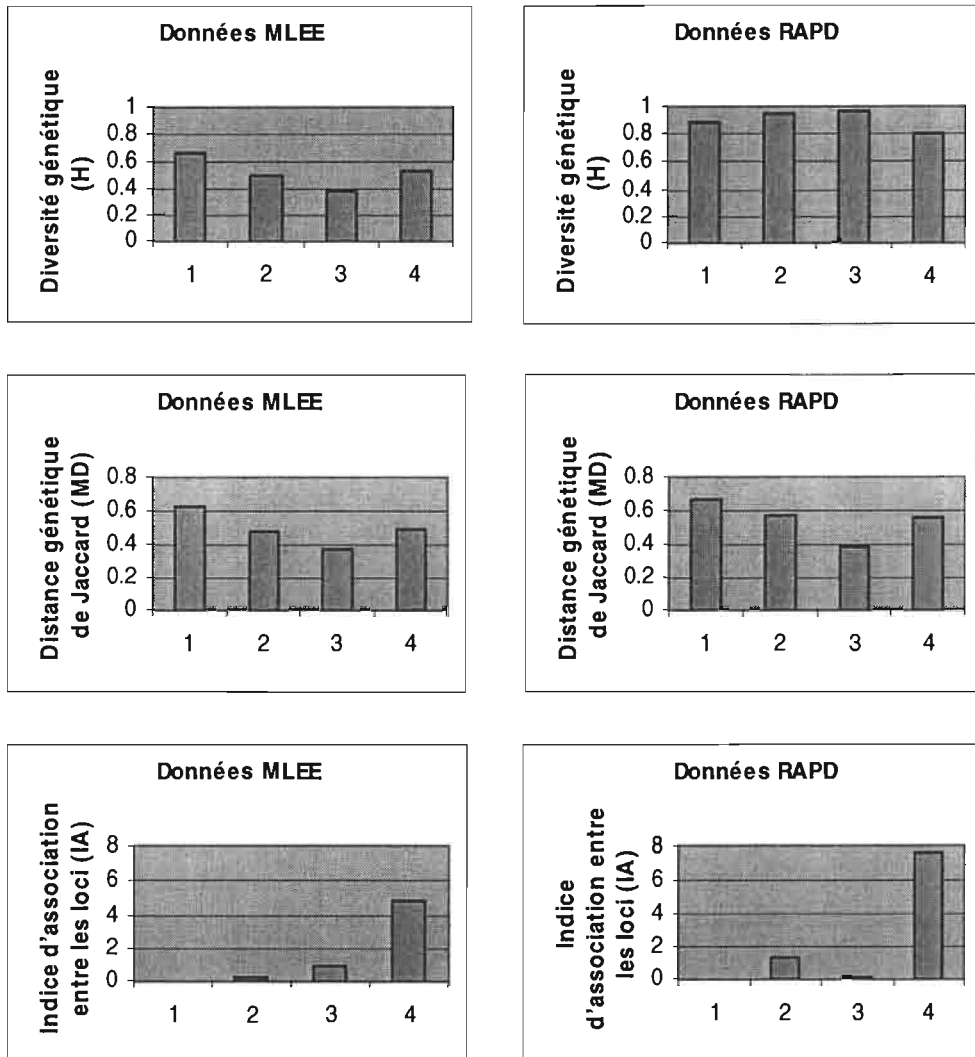


Figure III.21: Comparaison des indices de variabilité génétique et des résultats des tests de déséquilibre de liaison obtenus pour *Helicobacter pylori* et trois autres espèces de microorganismes. Note : cette figure reprend les valeurs indiquées dans le tableau III.12, dans l'ordre (1) : *H. pylori*, (2) : *E. coli*, (3) : *N. meningitidis*, (4) : *T. cruzi*.

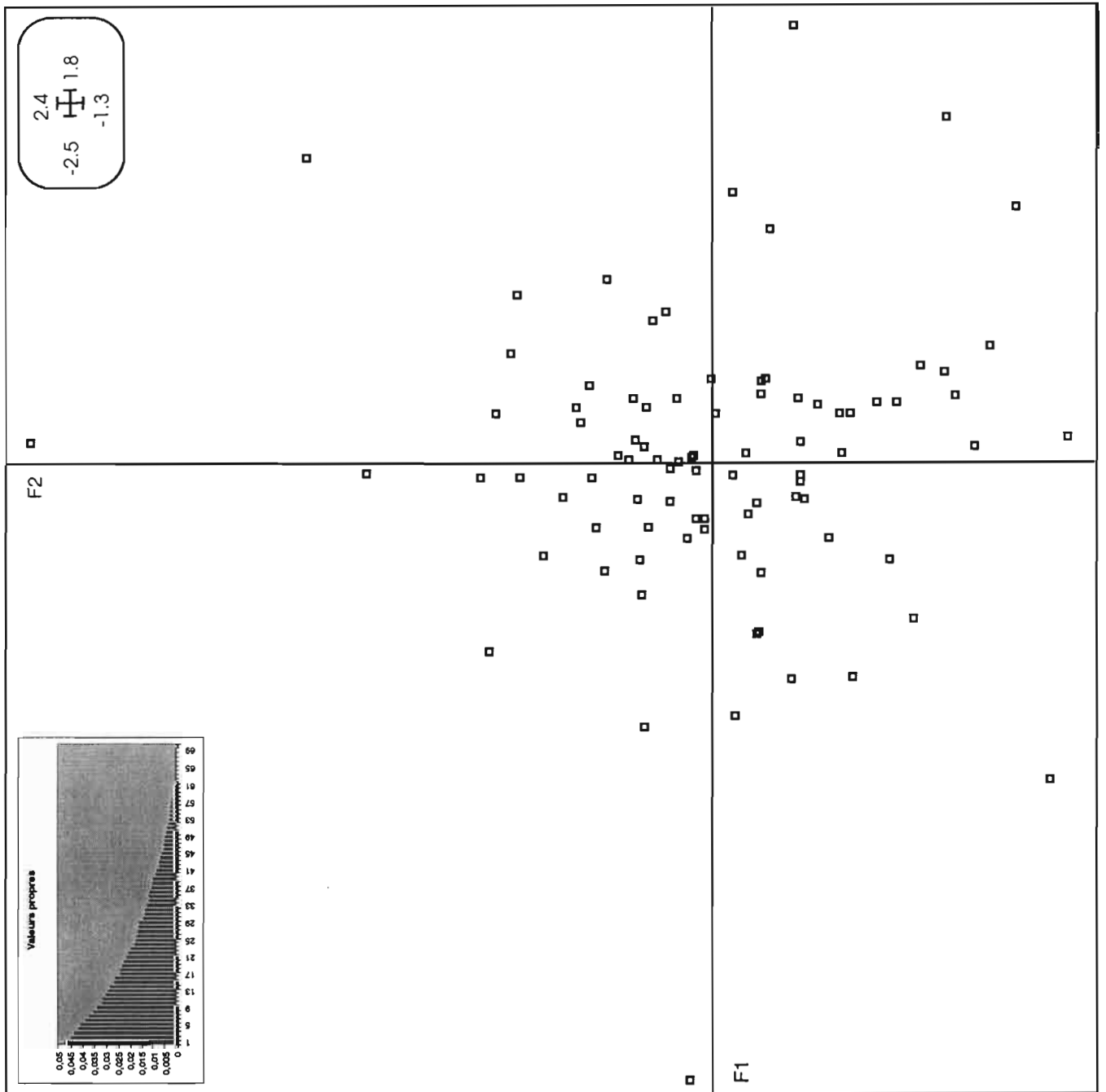


Figure III.22a: Analyse factorielle des correspondances des 87 souches de *Helicobacter pylori* réalisée sur les données des isoenzymes.

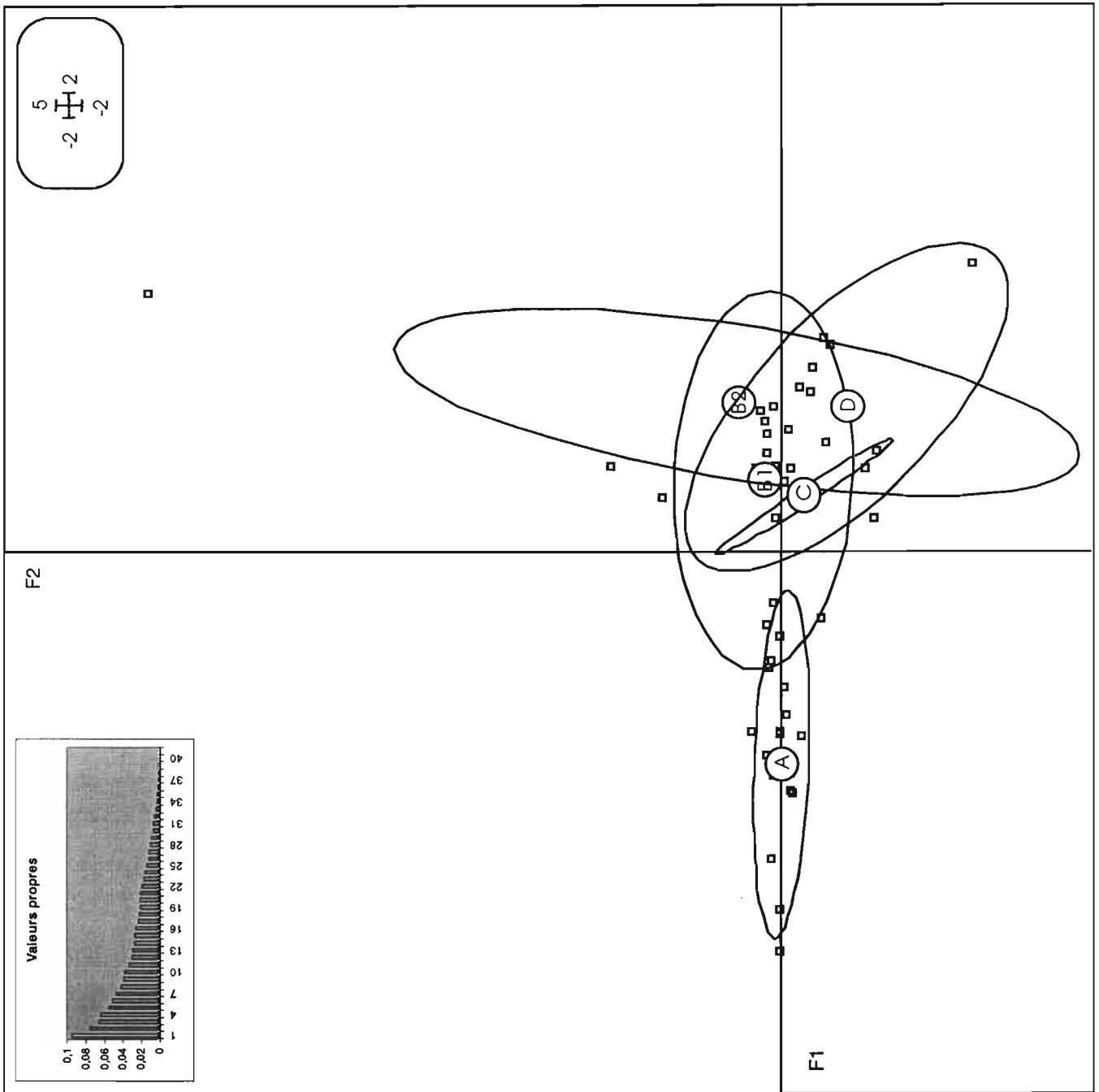


Figure III.22b : Analyse factorielle des correspondances des 72 souches de *Escherichia coli* de la collection ECOR (Ochman et Selander, 1984) réalisée sur les données du polymorphisme des isoenzymes.

Note : Les sous-groupes définis par Herzer *et al.* (1990) sont projetés sur le plan factoriel F1/F2. La position des souches suivant leur appartenance aux différents sous-groupes est résumée par des ellipses (au seuil de confiance de 90%).

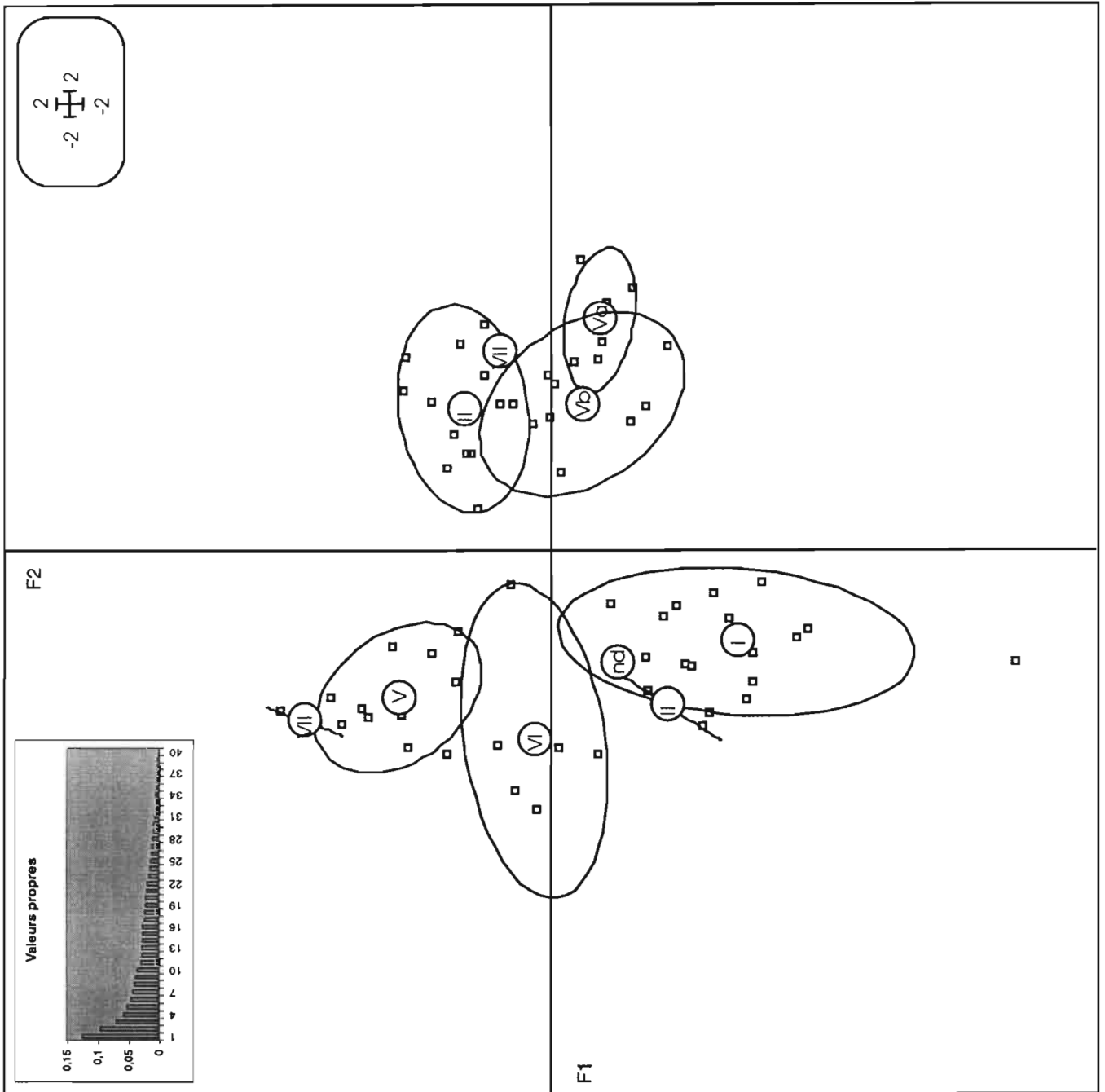


Figure III.22c : Analyse factorielle des correspondances de 84 souches de *Neisseria meningitidis* représentatives du sérotype A réalisée sur les données du polymorphisme des isoenzymes.

Note : Ces 84 souches correspondent aux 84 types électrophorétiques (ET) individuels des méningocoques du sérotype A décrits par Wang *et al.* (1992). Les sous-groupes définis par Wang *et al.* sont projetés sur le plan factoriel F1/F2. La position des souches suivant leur appartenance aux différents sous-groupes est résumée par des ellipses (au seuil de confiance de 90%).

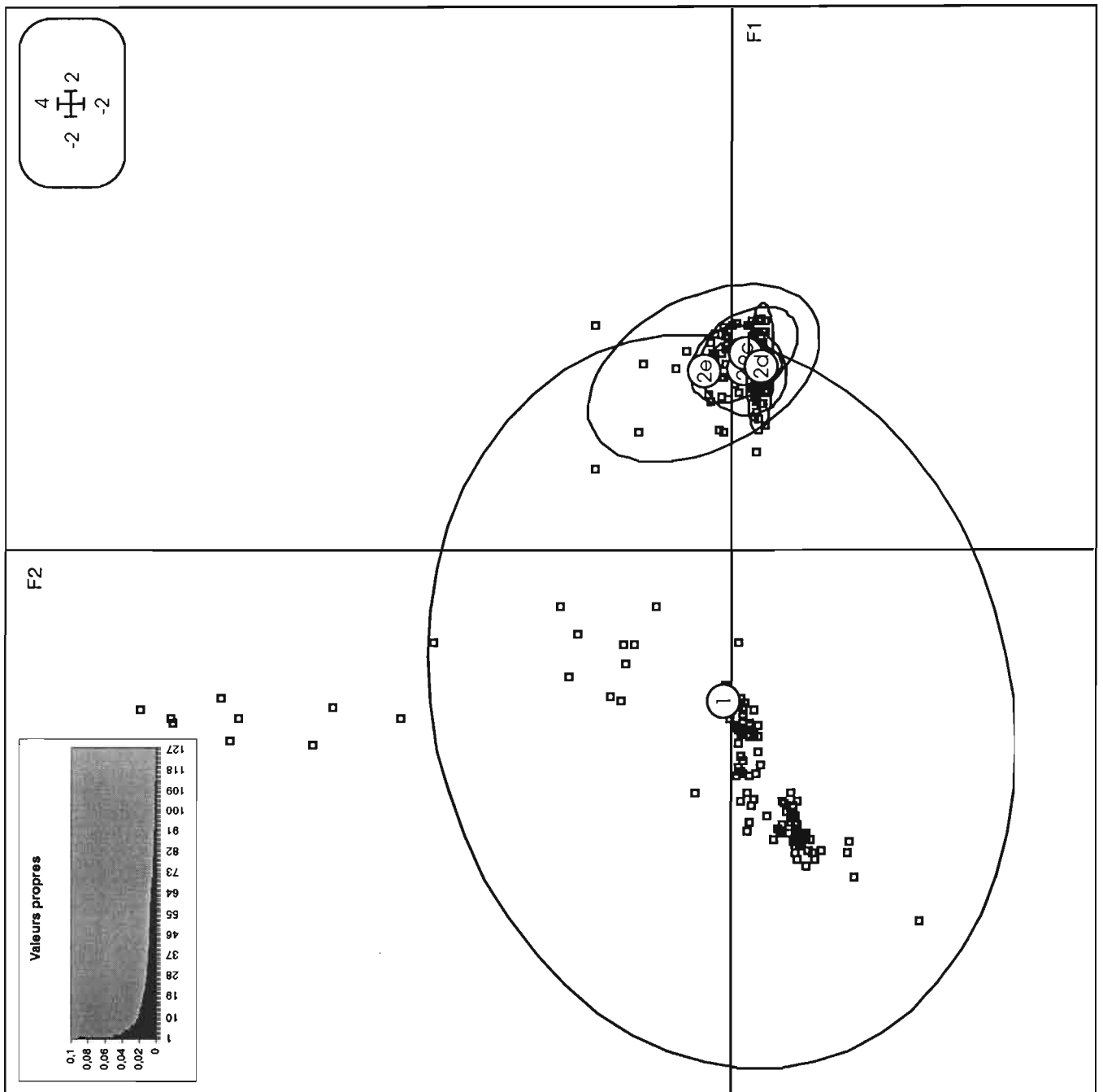


Figure III.22d : Analyse factorielle des correspondances des 262 souches de *Trypanosoma cruzi* réalisée sur les données du polymorphisme des isoenzymes (Barnabé *et al.*, 2000).

Note : Ces 262 souches correspondent aux 262 types électrophorétiques (ET) individuels identifiés parmi 434 stocks de *T. cruzi*. Les six DTU (Discrete Typing Units) définies par Barnabé *et al.* sont projetées sur le plan factoriel F1/F2. La position des souches suivant leur appartenance aux différents sous-groupes est résumée par des ellipses (au seuil de confiance de 90%).

représentation figure donc l'hypothèse selon laquelle le groupe B1, de faible clonalité, est le groupe à partir duquel ont émergées toutes les souches non A (Desjardins *et al.*, 1995). Pour *N. meningitidis* serogroupe A, les groupes définis par Wang *et al.* (1992) sont bien individualisés, et figurent différents clones épidémiques. Pour *T. cruzi*, le groupe 1 et la superposition des groupes 2b, 2c, 2d et 2e figurent les deux lignées clonales majeures DTU1 et DTU2, respectivement.

Ainsi, les différentes méthodes d'analyses et la comparaison de *H. pylori* à d'autres espèces de microorganismes corroborent l'hypothèse d'une structure recombinante de l'espèce *H. pylori*. Il est par exemple possible d'inférer que les échanges génétiques dans l'espèce *H. pylori* sont beaucoup plus fréquents que dans l'espèce *E. coli*.

DISCUSSION

IV. DISCUSSION

1. POSITION TAXONOMIQUE DE *HELICOBACTER PYLORI*

L'analyse des marqueurs généralistes a permis de préciser la position taxonomique de *H. pylori*. Ainsi, d'après les arbres UPGMA et Neighbor-Joining construits sur les données RAPD et MLEE, et d'après les valeurs de bootstrap obtenues, le genre *Helicobacter* est bien différencié du genre *Campylobacter* (Figures III.9 et III.14). La technique MLEE distingue les différents groupes taxonomiques : *Campylobacter*, *Helicobacter* non gastrique (*H. hepaticus*) et *Helicobacter* gastriques (*H. mustelae* et *H. pylori*) (Figures III.14 a et b). En revanche, la technique RAPD, quand l'ensemble des marqueurs RAPD sont considérés, inclut *H. hepaticus* dans le groupe *H. pylori* ou, quand seuls les marqueurs RAPD les moins variables sont considérés, place *H. hepaticus* comme étant une espèce phylogénétiquement plus proche de *H. pylori* que ne l'est *H. mustelae* (Figures III.11 a et b). Le positionnement des différents taxons obtenu en RAPD peut être dû au fait que, bien que les souches « outgroup » partagent avec *H. pylori* de l'ordre de 80% de bandes communes, de façon étonnante, *H. mustelae* et *H. hepaticus* partagent avec *H. pylori* moins de profils électrophorétiques que les souches de *Campylobacter*. En outre, le fait de mieux distinguer les espèces en ne considérant que les marqueurs RAPD les moins variables suggère une « saturation » des marqueurs RAPD les plus variables, c'est à dire que les marqueurs considérés évolueraient trop rapidement dans le temps. Cette saturation des marqueurs RAPD est susceptible de générer des phénomènes d'homoplasie qui rendent ces marqueurs impropres à résoudre le problème phylogénétique posé (Tibayrenc, 1996).

Ainsi, la position taxonomique de *H. pylori* vis à vis des souches « outgroup » de l'étude révélée par la technique RAPD respecte la position taxonomique de ces mêmes espèces établie sur la base des comparaisons de séquence de l'ARNr 16S (Patterson *et al.*, 2000) ou sur la base d'hybridation ADN-ARNr (Vandamme *et al.*, 1991). La position des trois espèces du genre *Helicobacter* révélée la technique MLEE est, quant à elle, en accord avec celle établie sur la comparaison de profils protéiques cellulaires totaux qui révèle une plus grande proximité des espèces *H. pylori* et *H. mustelae* (Jalava *et al.*, 1998). Toutefois, cet arrangement différent des taxons révélé par les deux techniques ne peut être dû au fait, par exemple, que les marqueurs RAPD considèrent le génome alors que les marqueurs MLEE considèrent des caractères exprimés. En effet, une bonne corrélation entre les données RAPD et MLEE est toujours observée quant à l'arrangement des différents taxons considérés dans l'étude d'autres genres de microorganismes, tels que les protozoaires parasites *Leishmania* (Bañuls, 1998) et *Trypanosoma* (Brisse, 1997) ; en outre, d'autres études ont montré une bonne corrélation entre les données génotypiques de type hybridation ADN-ADN et la technique MLEE, notamment sur

les genres bactériens *Legionella* et *Salmonella* (Selander *et al.*, 1985) (Selander, Li & Nelson, 1996). En conséquence, la position taxonomique des différentes espèces du genre *Helicobacter* établie sur la base des marqueurs RAPD et MLEE ne pourra être précisée qu'en considérant un plus grand nombre de souches appartenant à ces « outgroups ».

2. DIVERSITE GENETIQUE INTRASPECIFIQUE DE *HELICOBACTER PYLORI*: ETENDUE, REPARTITION, ORIGINE

2.1. Diversité génétique des gènes *ureA-ureB* et *flaA*

L'analyse par PCR-RFLP du polymorphisme des gènes *ureA-ureB*, codant pour les deux sous-unités principales de l'uréase, et du gène *flaA*, codant pour la sous-unité majoritaire de la flagelline, révèle pour chacun d'entre eux une très grande diversité génétique ($H_{ureA-ureB}=0,895$ et $H_{flaA}=0,691$). Ce grand polymorphisme génétique a été rapporté dans des travaux précédemment publiés (Akopyanz *et al.*, 1992a) (Foxall, Hu & Mobley, 1992) (Lopez, Owen & Desai, 1993) (Desai *et al.*, 1994) (Hurtado, Owen & Desai, 1994) (Hurtado & Owen, 1994). D'ailleurs, du fait de cette très grande diversité génétique, il a été proposé (Akopyanz *et al.*, 1992a) d'utiliser l'analyse par PCR-RFLP de ces gènes comme stratégie de typage pour suivre les infections intra-familiales (Kuo *et al.*, 1999) ou pour suivre les infections au sein de populations plus vastes (Forbes, Fang & Pennington, 1995), pour tester la persistance d'une souche au cours du temps à la suite, ou en l'absence, d'une antibiothérapie, pour identifier des mélanges de souches de *H. pylori*, témoins de co-infection ou de sur-infection (Fujimoto, Marshall & Blaser, 1994) (Hurtado & Owen, 1994), pour détecter des transferts horizontaux et des recombinaisons qui pourrait conduire au développement de génotypes ayant une virulence accrue pour certains hôtes (Kersulyte, Chalkauskas & Berg, 1999).

Le plus important polymorphisme de *ureA-ureB* peut être du au fait que la région de génome correspondante analysée est de plus grande taille (2400 bp pour *ureA-ureB* et 1500 bp pour *flaA*). Ainsi, *ureA-ureB* est susceptible de présenter de plus nombreux sites de coupure, et, dans l'hypothèse où des mutations se produiraient au niveau de ces sites, ceci permettrait d'expliquer la plus grande variété des profils électrophorétiques observés. Toutefois, des travaux de séquençage conduits sur les produits de PCR-RFLP du gène *ureB* digéré par *Sau3A* ont montré que les mutations (transitions G→A ou C→T) affectant la séquence du gène *ureB* ne se produisaient pas au niveau du site de coupure de l'endonucléase de restriction, et que, par conséquent la PCR-RFLP ne révélait pas la véritable étendue de la diversité génétique (Tanahashi *et al.*, 2000).

Dans la mesure où les gènes *ureA-ureB* et *flaA* codent pour des facteurs indispensables à l'établissement de l'infection à *H. pylori*, il peut paraître surprenant d'y rencontrer un tel niveau de polymorphisme. En fait, d'après le séquençage du gène *ureB*, les mutations, qui se produisent au hasard, affectent la troisième base du codon et n'entraînent pas de modification de la séquence en acides aminés (Tanahashi *et al.*, 2000). De même, le séquençage du gène *flaA* a montré que le polymorphisme affectait 20% de la séquence du gène et qu'il était du, dans 15% des cas, à des mutations synonymes, c'est à dire n'affectant pas la séquence primaire de la protéine, et, dans 0,3% des cas, à des mutations non-synonymes. Ce fort déséquilibre entre le taux de mutations synonymes et le taux de mutations non-synonymes traduit le fait que ce gène est soumis à une forte pression de sélection (Suerbaum *et al.*, 1998).

Un argument en faveur d'une pression de sélection qui s'exerce sur les gènes *ureA-ureB* est que les gènes voisins sur le chromosome, *ureC* et *ureD*, montrent une plus grande diversité génétique. En effet, des isolats qui ne sont pas distingués par l'analyse par PCR-RFLP des gènes *ureA-ureB* le sont par PCR-RFLP réalisée sur les gènes *ureC* et *ureD* (Desai *et al.*, 1994). Or, les gènes *ureC* et *ureD* codent pour des protéines accessoires, sans fonction connue dans la constitution ou l'activation de l'uréase (Labigne, Cussac & Courcoux, 1991). Ceci suggère que les gènes *ureA-ureB* et les gènes *ureC* et *ureD* sont soumis à des pressions de sélection différentes.

En conséquence, bien que la pression de sélection ne permette pas d'expliquer la grande diversité de séquence rencontrée dans les gènes (Suerbaum *et al.*, 1998), il apparaît toutefois qu'elle soit capable d'en limiter l'étendue.

Un autre mécanisme qui pourrait expliquer le polymorphisme de restriction des gènes *ureA-ureB* et *flaA* est la méthylation des sites de restriction qui protègent ceux-ci de l'activité des endonucléases. En effet, si toutes les souches de *H. pylori* ne sont pas affectées de la même façon par les méthylations (absence ou présence de sites méthylés ou distribution des sites méthylés différente suivant les souches), alors cela peut générer du polymorphisme. L'existence des méthylases a été révélée par les travaux de séquençage du génome de *H. pylori* (Doig *et al.*, 1999). Toutefois, l'hypothèse d'une méthylation différentielle des souches n'a jamais été testée. En outre, des PCR-RFLP réalisées sur le gène *flaA* directement sur les produits pathologiques ont conduit aux mêmes profils de restriction (résultats non présentés dans ce manuscrit), suggérant que si des méthylations se produisent *in vivo*, elles se produisent également *in vitro*.

Aucune corrélation n'a pu être établie entre le polymorphisme de restriction des gènes *ureA-ureB* et le polymorphisme de restriction du gène *flaA*. En outre, les types électrophorétiques ne permettent pas de différencier les souches en fonction de leur origine géographique. Les types électrophorétiques ne semblent avoir aucun pouvoir prédictif quant à la pathologie, comme déjà suggéré dans le cas du gène *flaA* (Hurtado *et al.*, 1994). Par ailleurs, dans la mesure où toute infection à *H. pylori* conduit à une gastrite, et que, dans certains cas seulement, celle-ci peut évoluer vers des pathologies plus graves, on pouvait s'attendre à ce que la diversité génétique dans le groupe « gastrite » soit plus étendue que dans le groupe « ulcère » : un tel résultat n'a pas été trouvé, suggérant, au moins sur la base des marqueurs *ureA-ureB* et *flaA*, que toutes les souches de *H. pylori* peuvent potentiellement conduire à tout type de pathologie.

2.2. Diversité génétique du gène *vacA*

Le génotypage du gène *vacA* réalisé dans cette étude repose sur le système de typage décrit par Atherton *et al.* (1995), qui met en évidence différents types de séquences signal (s1a, s1b et s2) et de séquences médianes (m1 et m2) dans le gène codant pour la cytotoxine vacuolisante VacA. Comme décrit par ailleurs (Atherton *et al.*, 1995) (Rudi *et al.*, 1998) (van Doorn *et al.*, 1998a), toutes les combinaisons séquence signal/séquence médiane, à l'exception de la combinaison s2/m1, ont été retrouvées dans cette étude. L'absence de la combinaison allélique s2/m1 pourrait s'expliquer par un effet délétère ou un désavantage sélectif que conférerait ce génotype à la bactérie (Atherton *et al.*, 1995). Cette hypothèse pourrait être testée en construisant des mutants s2/m1 et en suivant leur viabilité *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, l'existence du génotype s2/m1 a été révélée à l'état naturel (Letley *et al.*, 1999), mais ce génotype serait plutôt le reflet d'infections multiples (Morales-Espinosa *et al.*, 1999).

La prévalence des différents génotypes *vacA* dans la population de souches françaises analysées est en accord avec les résultats publiés par d'autres auteurs, une prévalence comparable étant retrouvée aux Etats-Unis (Van Doorn *et al.*, 1999). La totalité des souches asiatiques analysées présente le génotype s1a/m2 : ce résultat est comparable à celui obtenu pour l'analyse d'une population de souches de Taïwan (Wang *et al.*, 1998). Toutefois, l'analyse du polymorphisme du gène *vacA* sur de plus grandes populations de souches asiatiques montrent une plus grande variété de génotypes (Pan *et al.*, 1998) (Van Doorn *et al.*, 1999) ou une distribution différente des génotypes, avec notamment 100% de souches japonaises de type s1a/m1 (Maeda *et al.*, 1998). Quoiqu'il en soit, la séquence signal s1a semble prédominer dans toutes les populations de souches asiatiques étudiées. En outre, la mise en œuvre de la technique PCR-LiPa (PCR suivie d'une hybridation) a permis d'affiner le génotypage de *vacA*.

Ainsi, une séquence signal de type s1c, de séquence nucléotidique plus proche de s1a que de s1b, serait spécifiquement rencontrée dans les populations de souches asiatiques (van Doorn *et al.*, 1998a). De même, de nouveaux types de séquence médiane (m1a (Strobel *et al.*, 1998), m2a et m2b (van Doorn *et al.*, 1998a)) ont été décrits, le type m2b étant lui aussi spécifique de souches asiatiques (Van Doorn *et al.*, 1999).

Aucune corrélation n'a pu être établie entre le génotype *vacA* des souches de *H. pylori* et la pathologie présentée par le patient. Ce résultat vient à l'encontre de l'hypothèse de certains auteurs pour qui le génotype *vacA* s1 serait associé à une plus forte prévalence de la maladie ulcéreuse (Atherton *et al.*, 1995) (Rudi *et al.*, 1998) (van Doorn *et al.*, 1998b), une hypothèse toutefois très largement controversée (Ito *et al.*, 1997) (Go, Cissell & Graham, 1998) (Loeb *et al.*, 1998) (Yamaoka *et al.*, 1998) (Slater *et al.*, 1999).

L'existence des multiples combinaisons entre les différents types de séquences signal et de séquences médianes suggère que des recombinaisons entre les différents allèles du gène *vacA* se produisent *in vivo* (Atherton *et al.*, 1995). De plus, l'existence de segments très divergents et de segments voisins très conservés au sein du gène *vacA* suggère que les segments divergents ont été acquis par transfert horizontal d'ADN provenant d'autres espèces (Cover, 1996). On notera d'ailleurs qu'une structure de gène mosaïque comparable à celle du gène *vacA* a été décrite pour des gènes d'autres espèces bactériennes, tels que les gènes codant pour les protéases d'IgA de *Neisseria gonorrhoeae* et de *Haemophilus influenzae* ou les gènes codant pour les PBP (penicillin binding proteins) de *Neisseria meningitidis* et de *Streptococcus pneumoniae* (Maynard Smith, Dowson & Spratt, 1991) (Schmitt & Haas, 1994). Comme *VacA*, ces protéines sont excrétées dans le milieu ; comme *H. pylori*, ces bactéries sont naturellement transformables *in vitro* (Nedenskov-Sorensen, Bukholm & Bovre, 1990) (Tsuda, Karita & Nakazawa, 1993).

Outre ces possibles événements de recombinaison, des mutations affectent la séquence du gène, comme en atteste la comparaison de séquence des gènes *vacA* de différentes souches de *H. pylori*. Comme dans le cas du gène *flaA*, environ 20% des sites sont polymorphes et le taux de mutations synonymes (K_s) est de 16%. En revanche, le taux de mutations non synonymes ($K_a = 3\%$) est 3 fois plus élevé que pour le gène *flaA* (Suerbaum *et al.*, 1998). Le fait que *vacA* tolère un plus grand nombre de mutations non synonymes que le gène *flaA* suggère que ces deux gènes sont soumis à des pressions de sélection différentes, hypothèse proposée par Göttke *et al.* (2000) sur la base de l'analyse par PCR-RFLP des gènes *vacA* et *flaA*. Une raison à cela pourrait être que le gène *flaA* est présent et exprimé par toutes les souches de *H. pylori*, ce qui traduit le caractère essentiel de la flagelline dans la physiologie de la bactérie, alors que le gène *vacA*, présent dans toutes les souches de *H. pylori*, n'est

exprimé que par 50% d'entre elles. Cependant, dans les travaux de comparaison de séquence de gènes *vacA*, il n'est pas précisé si les séquences comparées proviennent de souches tox+ (produisant la protéine VacA) ou de souches tox- : cette information permettrait peut-être de distinguer un ratio K_s/K_a différent, donc une pression de sélection différente, suivant que la souche exprime ou non la cytotoxine.

2.3. Détection du gène *cagA*

Près de 60% des souches de *H. pylori* de type *cagA*+ présentent le génotype *vacA* s1 : cette association a été largement décrite par ailleurs (Atherton *et al.*, 1995) (Rudi *et al.*, 1998) (van Doorn *et al.*, 1999b). De plus, l'association significative, au sens du χ^2 , trouvée dans cette étude entre le type *cagA*+ et le génotype *vacA* s1m1 est, elle aussi, en accord avec de précédents travaux (Atherton *et al.*, 1995) (Ito *et al.*, 1997) (Yamaoka *et al.*, 1998). Toutefois, il apparaît que cette association des génotypes n'est pas le fait d'une association physique des gènes *vacA* et *cagA* sur le chromosome de *H. pylori* (Bukanov & Berg, 1994).

La prévalence du gène *cagA* trouvée dans les populations non-asiatique (59,5%) et asiatique (84,6%) analysées est en accord avec les résultats précédemment publiés (Atherton *et al.*, 1995) (Peek *et al.*, 1995b) (Cover *et al.*, 1995) (Miehke *et al.*, 1996) (Pan *et al.*, 1997) (Maeda *et al.*, 1999).

Aucune corrélation n'a pu être établie entre la présence du gène *cagA* des souches *H. pylori* et la sévérité de la pathologie présentée par le patient, contrairement à d'autres travaux qui trouvent la présence du gène *cagA* associée à la maladie ulcéreuse et l'adénocarcinome gastrique (Atherton *et al.*, 1995) (Parsonnet *et al.*, 1997) (van Doorn *et al.*, 1998b). Toutefois, une telle association semble peut probable dans la mesure où, si la présence du gène *cagA* semble associée à des pathologies plus graves dans les pays occidentaux, cette observation n'est pas vérifiée dans les pays asiatiques où environ 90% des souches de *H. pylori* présentent le gène *cagA* (Pan *et al.*, 1997) (Maeda *et al.*, 1999) (Yamaoka *et al.*, 1999). En outre, des études conduites sur des souches de *H. pylori* provenant des États-Unis (Houston, Texas) et d'Espagne n'ont pas montré de corrélation entre la présence du gène *cagA* et l'ulcère gastrique (Evans *et al.*, 1998) (Domingo *et al.*, 1999). Deux éléments peuvent expliquer qu'une corrélation entre la présence du gène *cagA* et une plus grande sévérité de la pathologie ne soit pas toujours retrouvée. D'une part, le gène *cagA* a été décrit comme étant un marqueur de la région *cag* (Censini *et al.*, 1996), une région pouvant coder pour une trentaine de protéines, dont la protéine codée par le gène *picB* qui induirait une réaction pro-inflammatoire (Turnmuru, Sharma & Blaser, 1995). Compte-tenu du fait que des délétions et des réarrangements nombreux se

produisent dans la région *cag* (Censini *et al.*, 1996), il est possible que la souche de *H. pylori* possède une partie de la région *cag* (*cagl*), et donc une partie des gènes associés à cette région, sans pour autant que le gène *cagA* soit présent. De la même façon, la présence du gène *cagA* n'implique pas que l'ensemble de la région *cag* soit présente : seule la portion *cagl* de la région *cag* peut être présente (Slater *et al.*, 1999). Cette possible explication d'un pouvoir pathogène accru conféré par d'autres protéines codées par la région *cag* est toutefois écartée par certains travaux qui montrent que la présence d'aucun des gènes appartenant à cette région ne peut être corrélée à la pathologie observée (Jenks, Mégraud & Labigne, 1998). D'autre part, des études récentes montrent que si le gène *cagA* est présent, et donc si la protéine CagA s'exprime, rien ne dit que cette protéine est fonctionnelle ; or, seule la fonctionnalité de la protéine impliquerait un pouvoir pathogène de la protéine CagA (Covacci, 2001).

La comparaison du G+C% de la région *cag* avec le G+C% moyen de l'ensemble du génome de *H. pylori* suggère que cet îlot de pathogénicité a été acquis par transfert de matériel génétique provenant d'autres espèces (Hacker *et al.*, 1997). D'ailleurs, le gène *picB* est un homologue des gènes *ptIC* de *Bordetella pertussis* et *virB4* de *Agrobacterium tumefaciens* (Censini *et al.*, 1996).

Outre le fait que la région *cag* soit soumise à des délétions et des réarrangements nombreux, il a été montré que des mutations affectent le gène *cagA* (Achtman *et al.*, 1999). De plus, parmi les gènes étudiés par MLST (Multilocus Sequence Typing), le gène *cagA* présente le plus fort taux de mutations non synonymes ($K_a=5,5\%$) (Suerbaum *et al.*, 1998) (Achtman *et al.*, 1999).

2.4. Détection de la séquence d'insertion IS605

Dans la population de souches de *H. pylori* non asiatique et asiatique, respectivement, 40,5% et 84,5% présentent la séquence d'insertion IS605 : ces valeurs sont supérieures à celles rapportées dans d'autres études, avec environ 29% en Europe et aux Etats-Unis et 44% en Asie (Hook-Nikanne *et al.*, 1998) (Kersulyte *et al.*, 1998). Cette séquence, décrite pour la première fois comme interrompant l'îlot *cag* en deux régions, *cagl* et *cagII* (Censini *et al.*, 1996), peut être présente en plusieurs endroits sur le chromosome (Slater *et al.*, 1999), et en plusieurs copies partielles ou complètes (de 1 à 13 copies) (Tomb *et al.*, 1997) (Hook-Nikanne *et al.*, 1998). Ceci expliquerait qu'aucune corrélation n'a pu être établie entre la présence de cette séquence d'insertion et la présence du gène *cagA*. L'absence de IS605 corrélée à la présence du génotype *vacA* m2, décrite par ailleurs (Slater *et al.*, 1999), n'a pas été confirmée, la moitié des souches de *H. pylori* de type *vacA* m2 présentant la séquence d'insertion. L'hypothèse proposée

d'un lien fonctionnel entre ces deux marqueurs est donc à écarter. Outre la différence de taille des séquences d'insertion IS605, qui s'explique par deux délétions connues de 100 bp, des variations de séquences nucléotidiques affectent également la séquence d'insertion IS605, respectant un taux d'identité de 92 à 99% (Hook-Nikanne *et al.*, 1998).

2.5. Diversité génétique révélée par ribotypage

Le ribotypage repère sur un profil de restriction d'ADN total les séquences codant pour les ARN ribosomiques, des régions du génome particulièrement conservées (Pace, Olsen & Woese, 1986). Cette propriété en fait un marqueur de choix en taxonomie (Grimont & Grimont, 1986) (Picard-Pasquier *et al.*, 1989). Toutefois, dans cette étude, et comme décrit par ailleurs (Morgan & Owen, 1990) (Owen *et al.*, 1991) (Owen *et al.*, 1992) (Tee *et al.*, 1992) (Lopez *et al.*, 1993), le ribotypage appliqué à *H. pylori* révèle un très grand polymorphisme génétique. Ainsi, il apparaît que le pouvoir discriminant du ribotypage est comparable à celui de la PCR-RFLP appliquée aux gènes *ureA-ureB* (Lopez *et al.*, 1993). Le niveau de polymorphisme révélé par ribotypage est indépendant du choix de la sonde d'ADNr 16S+23S utilisée : en effet, que la sonde choisie soit de l'ADNr 16S+23S de *E. coli*, comme ici, ou de l'ADNr 16S+23S de *H. pylori*, un même niveau de polymorphisme génétique est rencontré (Owen *et al.*, 1991) (Owen *et al.*, 1992).

La diversité génétique rencontrée dans ces régions du génome est d'autant plus étonnante que les ADNr 16S+23S, essentiels à la bactérie, ne sont présents qu'en un ou deux exemplaires (Linton *et al.*, 1992) (Bukanov & Berg, 1994) (Tomb *et al.*, 1997). Ce faible nombre de copies d'ADNr 16S+23S semble caractéristique des microorganismes à croissance lente, deux propriétés que *H. pylori* partage avec les genres *Mycobacterium* et *Mycoplasma* et avec l'espèce *Borrelia burgdorferi* (Bingen, Denamur & Elion, 1994).

Toutefois, les techniques de PCR-RFLP et de séquençage de l'ADNr 16S montrent que l'ADNr 16S de *H. pylori* n'est pas très polymorphe (Eckloff *et al.*, 1994). En outre, une seule mutation a été révélée dans l'ADNr 23S : celle-ci consiste en une transition A→G conduisant à l'apparition d'une résistance de la bactérie à la clarithromycine (Taylor *et al.*, 1997) (Versalovic *et al.*, 1997). Les profils polymorphes obtenus par ribotypage ne sont donc pas seulement le reflet de mutations affectant ces séquences. Le polymorphisme observé pourrait alors reposer sur les séquences flanquantes des copies d'ADNr, des portions du génome qui sont moins conservées (Bingen *et al.*, 1994). De plus, comme suggéré (plus haut) pour la PCR-RFLP, les différents profils électrophorétiques générés pourraient être le fait de sites méthylés variablement distribués suivant les souches. Ceci expliquerait notamment que, ici et comme

dans d'autres études (Burucoa, Lhomme & Fauchère, 1999), près de 30% des souches n'ont pas été digérées par l'endonucléase *HaellI*.

De même que dans les autres études qui ont appliqué le ribotypage à *H. pylori* (Morgan & Owen, 1990) (Owen *et al.*, 1991) (Owen *et al.*, 1992) (Tee *et al.*, 1992) (Lopez *et al.*, 1993), aucune corrélation n'a pu être établie entre le ribotype des souches de *H. pylori* et l'origine géographique ou l'origine pathologique.

2.6. Diversité génétique révélée par RAPD et par MLEE

L'analyse par RAPD et MLEE de la population de souches de *H. pylori* considérée dans cette étude révèle une diversité génétique considérable ($H_{\text{RAPD}}=0,893$ et $H_{\text{MLEE}}=0,662$). La diversité génétique calculée sur les données MLEE n'est pas significativement différente de la valeur trouvée par Go *et al.* (1996) ; cette valeur est supérieure à celles rencontrées dans d'autres espèces bactériennes pathogènes (par exemple : *Staphylococcus aureus*), et même dans certains genres bactériens (par exemple : *Bordetella* spp.), étudiés par MLEE (Tableau III.10). Aucune valeur de diversité génétique calculée sur les données RAPD n'est rapportée par ailleurs : en effet, bien que largement répandue pour l'analyse de souches de *H. pylori* (Akopyanz *et al.*, 1992b) (Marshall *et al.*, 1995) (van der Ende *et al.*, 1996) (Berg *et al.*, 1997) (Chalkauskas *et al.*, 1998) (Kuipers *et al.*, 2000), cette stratégie de typage a toujours été employée pour des études de suivi épidémiologique mais jamais à des fins de génétique des populations.

La diversité génétique calculée à partir des données RAPD et MLEE de *H. pylori* peut être comparée aux résultats obtenus par les mêmes marqueurs pour les souches de *Escherichia coli* de la collection ECOR (Whittam, Ochman & Selander, 1983) (Grandhomme, 1999), pour des souches de *Neisseria meningitidis* de séro groupe A (Wang *et al.*, 1992) (Bart *et al.*, 1998) et pour des souches de *Trypanosoma cruzi* (Barnabé, Brisse & Tibayrenc, 2000) (Brisse, Barnabé & Tibayrenc, 2000) (Tableau III.12). D'après les données MLEE, la diversité génétique de *H. pylori* est supérieure à celle rencontrée dans les trois autres espèces ; en revanche, d'après les données RAPD, les diversités génétiques rencontrées dans ces quatre espèces ne sont pas significativement différentes. Toutefois, étant donné que les échantillons de *E. coli* et de *T. cruzi* ont été collectés à partir de différents hôtes et proviennent de différentes origines géographiques, et que les échantillons de *N. meningitidis* ont été collectés sur 75 ans dans toutes les régions du monde, ceci apporte un biais qui tend à renforcer la variabilité apparente de ces espèces par rapport aux isolats cliniques de *H. pylori* de cette étude. De plus, si l'on ne considère, par exemple, que la population des souches de *H. pylori* provenant de Brest

et isolées entre 1995 et 1998, le niveau de diversité génétique rencontré reste comparable à celui rencontré dans les collections *E. coli*, *N. meningitidis* et *T. cruzi* analysées (Tableau III.8).

La détermination de la nature du polymorphisme génétique révélé par la technique RAPD impliquerait le clonage et le séquençage des régions génomiques encadrées par les sites d'hybridation des amorces. Toutefois, l'extrême variabilité rencontrée en RAPD pourrait être due au fait que le génome de *H. pylori* est très plastique, montrant une diversité considérable dans l'arrangement de ses gènes (Bukanov & Berg, 1994) (Jiang, Hiratsuka & Taylor, 1996) (Alm *et al.*, 1999). Par ailleurs, le suivi au long court (sur 7 à 10 ans) d'infections à *H. pylori* a permis de mettre en évidence des changements de profils RAPD relativement légers qui pourraient être dus à des mutations (Kuipers *et al.*, 2000). En outre, la technique RAPD a révélé des événements de recombinaison dans des cas d'infection chez l'homme (Kersulyte *et al.*, 1999) et dans des expériences de transformation bactérienne *in vitro* (Kuipers *et al.*, 1998).

Concernant l'origine du polymorphisme révélé par la technique MLEE, il est peu probable que la diversité génétique observée soit uniquement due à des mutations. En effet, dans une étude conduite sur la base moléculaire du polymorphisme allélique de la malate deshydrogénase dans les populations naturelles de *E. coli* et de *Salmonella enterica*, Boyd *et al.* ont estimé que la génération d'un nouvel allozyme impliquait 2,6 substitutions d'acides aminés (Boyd *et al.*, 1994). S'il est possible d'extrapoler ce qui se passe dans ces espèces au cas de *H. pylori* le nombre de substitutions d'acides aminés nécessaire pour générer la variabilité génétique observée par la technique MLEE dans cette espèce est tout à fait considérable. En conséquence, le nombre de substitutions non synonymes qui conduit à l'apparition de nouveaux allozymes est plus considérable encore. Dans cette hypothèse, le total des mutations (synonymes et non synonymes) serait alors gigantesque.

Un taux élevé de mutations pourrait s'expliquer par l'existence de souches de *H. pylori* hypermutatrices. De telles souches ont été mises en évidence dans l'espèce par des expériences *in vitro*. Toutefois, le système mis en jeu est différent de celui décrit dans l'espèce *E. coli*. L'hypothèse proposée est que, à la différence du SRM (Système de Réparation des Mésappariements) présent chez la plupart des bactéries, le système présent chez *H. pylori* favoriserait les mutations et les recombinaisons (Burucoa *et al.*, 2000). Quoiqu'il en soit, l'existence *in vivo* de souches de *H. pylori* hypermutatrices n'a pas encore été recherchée.

Alors qu'il a été suggéré que les variations génétiques observées en RAPD ou en PCR-RFLP pouvaient être dues à des variations sur la troisième base du codon, qui donnent lieu à des mutations neutres le plus souvent (Ge & Taylor, 1999) (Tanahashi *et al.*, 2000), la MLEE prouverait, compte tenu de la grande variété des allèles observés, et dans l'hypothèse où seules

des mutations seraient à l'origine d'un tel polymorphisme, que ces mutations sont au contraire rarement neutres. Cette hypothèse est très peu parcimonieuse.

En conséquence, même si le séquençage fait la preuve de mutations dans le génome de la bactérie, l'étendue de la diversité génétique rencontrée en MLEE suggère que des événements de recombinaison en sont aussi à l'origine, comme suggéré par d'autres travaux (Suerbaum *et al.*, 1998) (Achtman *et al.*, 1999). Par ailleurs, alors que le taux recombinaison/mutation dans l'espèce de structure « clonale épidémique » *N. meningitidis* a été estimé à 100/1 sur la base des données MLST (Feil *et al.*, 1999), on peut s'attendre à ce que ce taux soit plus élevé encore pour *H. pylori*.

Aucune corrélation n'a pu être établie entre l'origine géographique des souches de *H. pylori* analysées et les génotypes RAPD et MLEE rencontrés. Toutefois, une certaine congruence est révélée par le test *g* entre les données RAPD et MLEE obtenues pour l'échantillonnage total et pour les groupes non-Asie et Poitiers (Tableau III.8). Ceci suggère que les marqueurs étudiés n'évoluent pas de manière complètement indépendante. Quoiqu'il en soit, cette apparente congruence des marqueurs ne peut être expliquée à la lumière des autres tests et analyses pratiqués dans cette étude. Au mieux, les données MLEE, quand seules sont considérées les souches de *H. pylori* de type *cagA+*, permettent d'observer un regroupement des souches d'origine asiatique. L'absence de corrélation entre l'origine géographique des souches de *H. pylori* et les génotypes observés en MLEE est en accord avec de précédents résultats (Go *et al.*, 1996) (Hazell *et al.*, 1997) : dans ces études basées sur la MLEE, et considérant des patients habitant une même zone géographique, aucune corrélation n'a été trouvée entre l'origine ethnique des patients et le génotype des souches de *H. pylori*.

En outre, aucune corrélation n'a pu être établie entre l'origine pathologique des souches de *H. pylori* et les génotypes RAPD et MLEE (Figure III.19). Par ailleurs, aucune étude de suivi épidémiologique basée sur la RAPD n'a montré qu'une telle corrélation existe (Akopyanz *et al.*, 1992b) (Marshall *et al.*, 1995) (van der Ende *et al.*, 1996) (Berg *et al.*, 1997) (Chalkauskas *et al.*, 1998) (Kuipers *et al.*, 2000). De même, la MLEE n'a pas établi de corrélation entre la pathologie et les génotypes observés (Go *et al.*, 1996).

En définitive, de l'analyse des différents marqueurs génétiques considérés dans cette étude et des travaux menés par ailleurs, il apparaît que des événements de mutations et de recombinaisons participent à la génération de la diversité dans l'espèce *H. pylori*.

3. STRUCTURE GENETIQUE DE *HELICOBACTER PYLORI*

3.1. Mise en évidence de la structure recombinante de l'espèce *H. pylori*

Les résultats acquis dans cette étude basée sur l'analyse d'un grand nombre de marqueurs et sur plusieurs approches de génétique des populations sont en faveur d'une structure recombinante de l'espèce *H. pylori*. Ces résultats confirment donc les conclusions de précédentes études basées sur les approches multilocus MLEE et MLST (Go *et al.*, 1996) (Suerbaum *et al.*, 1998), suggérant que les échanges génétiques jouent un rôle considérable dans la structure des populations de *H. pylori* et contredisent l'hypothèse d'une structure clonale plus récemment proposée (Han *et al.*, 2000).

En effet, d'après le calcul de l'indice d'association entre les locus, I_A (Brown, Feldman & Nevo, 1980), il apparaît que *H. pylori* est un cas extrême dans les modèles de structure génétique des populations de microorganismes définis par Maynard-Smith *et al.* (1993) (Figure III.20). Ces modèles mettent en évidence que les populations de microorganismes occupent un spectre allant de la structure clonale quasiment stricte, dont l'espèce type est *Salmonella enterica*, à la structure fortement sexuée, dont l'espèce type est *Neisseria gonorrhoeae*. A cette extrémité vient donc s'ajouter *H. pylori*. Une réserve a été émise sur l'utilisation de l'indice I_A . Celui-ci résumerait extrêmement les données acquises sur plusieurs locus, induisant ainsi une perte sévère de l'information et, de fait, une minorité de locus en déséquilibre de liaison créerait un écart significatif à l'équilibre de liaison (Brown *et al.*, 1980). Ce biais risque en fait de fausser les résultats seulement dans le cas des espèces clonales et peut même constituer un argument supplémentaire quant à la structure recombinante de *H. pylori* mise en évidence dans cette étude.

De plus, les tests de déséquilibre de liaison f et f' se sont révélés non significatifs (Tableaux III.8 et III.9). Ce résultat ne peut être imputable à un manque de puissance des tests du à échantillonnage insuffisant (erreur statistique de type II) dans la mesure où un grand nombre de souches et de locus ont été considérés.

En outre, l'absence de structuration mise en évidence par les analyses phénétiques (UPGMA et Neighbor-Joining) témoigne également d'un fort impact des échanges génétiques dans la population de souches de *H. pylori* analysée (Figures III.3, III.5, III.7, III.9, III.11, III.14, III.15 et III.18). Cette absence de structuration est également révélée par les faibles valeurs de bootstrap obtenues pour l'analyse des données RAPD et MLEE (Figure III.14).

Par ailleurs, de nombreux arguments plaident en faveur d'une origine recombinante de la variabilité génétique dans l'espèce *H. pylori*. Ainsi, sur la base du séquençage complet des

souches 26695 (Tomb *et al.*, 1997) et J99 (Alm *et al.*, 1999), des homologues de séquences dans d'autres espèces de microorganismes ont été identifiées, suggérant que certaines régions du génome ont été acquises par transfert horizontal de matériel génétique provenant de d'autres espèces. C'est le cas, par exemple, du gène *picB* homologue des gènes *ptlC* de *B. pertussis* et *virB4* de *A. tumefaciens* (Censini *et al.*, 1996), cité plus haut. En outre, le séquençage de souches a permis de mettre en évidence des locus possiblement impliqués dans la recombinaison, tel que le gène *recA* (Schmitt *et al.*, 1995), et les transferts génétiques, tels que l'opéron *comB*, qui porte des gènes homologues à ceux retrouvés dans les plasmides de *A. tumefaciens* et de *Pseudomonas aeruginosa* (Hofreuter *et al.*, 1998), ou tels que le gène *dprA*, dont un homologue est retrouvé chez *Haemophilus influenzae* (Ando *et al.*, 1999) (Smeets *et al.*, 2000). Des transferts génétiques horizontaux ont également été mis en évidence dans des cas d'infections multiples chez l'homme (Kersulyte *et al.*, 1999). La présence de l'îlot de pathogénicité *cagA* et la structure mosaïque du gène *vacA* témoignent d'événements de recombinaison. En outre, la recombinaison intra-chromosomique apparaît fréquente (Bukanov & Berg, 1994) (Jiang *et al.*, 1996) (Alm *et al.*, 1999).

Les deux mécanismes impliqués dans la recombinaison dans l'espèce *H. pylori* sont la conjugaison et la transformation (Akopyants *et al.*, 1998) (Kersulyte *et al.*, 1998) (Kuipers *et al.*, 1998) (Kersulyte *et al.*, 1999). Cependant, si les souches de *H. pylori* sont naturellement transformables *in vitro* (Nedenskov-Sorensen *et al.*, 1990) (Tsuda *et al.*, 1993), ce mécanisme n'a pas encore été démontré *in vivo*. Bien que 40% des souches de *H. pylori* possèdent un ou plusieurs plasmides (Oudbier *et al.*, 1990) (Simor *et al.*, 1990), des transferts de gènes médiés par des plasmides n'ont pas encore décrit. En outre, bien que la présence de phages ait été décrite chez *H. pylori* (Schmid, von Recklinghausen & Ansorg, 1990), il n'a jamais été mis en évidence de transfert de gènes par la transduction.

D'autres espèces de bactéries naturellement transformables ont également été décrites, dont *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae* et *S. pneumoniae*. On notera que ces espèces partagent avec *H. pylori* d'autres caractéristiques : l'hôte (l'homme), l'habitat (la muqueuse de l'estomac, pour *H. pylori*, la muqueuse du nasopharynx pour les quatre autres espèces, plus la muqueuse génitale pour *N. gonorrhoeae*), un système de résistance aux défenses de l'hôte du à une production de protéases qui clivent les immunoglobulines, en particuliers les IgA (Levin & Svanborg Eden, 1990), et le pouvoir de provoquer des maladies chroniques. La structure génétique de ces espèces est recombinante (*H. pylori* et *N. gonorrhoeae*) ou clonale épidémique (*N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*).

3.2. Existence de groupes de « basse clonalité » au sein de l'espèce *H. pylori*

L'hypothèse de l'existence de groupes de « basse clonalité » a été émise par Achtman *et al.* (1999) sur la base du MLST pratiqué sur 7 housekeeping genes, gènes du métabolisme général de la bactérie, et les gènes *vacA* et *cagA*. Sur les 20 souches analysées, les 5 souches asiatiques se trouvaient regroupées.

Aucun des marqueurs mis en œuvre dans la présente étude ne permet d'affirmer de façon certaine l'existence d'une telle structuration. Au plus, les arbres phénétiques montrent un faible regroupement des souches asiatiques, celles-ci s'agglomérant en petits groupes qui, le plus souvent, excluent les souches indiennes (Figures III.3, III.9, III.11, III.14 et III.15). Quoi qu'il en soit, l'existence de ces groupes n'est pas corroborée par les différents tests de déséquilibre de liaison (Tableau III.8), ni par les analyses de correspondances multiples (Figure III.17). Concernant le cas des souches indiennes, d'autres études basées sur l'analyse de séquences d'une portion de la région *cag* et d'une portion du gène *vacA* ont également relevées qu'elles se distinguent des souches asiatiques (Chine et Japon, notamment) (Mukhopadhyay *et al.*, 2000).

Une explication aux résultats obtenus sur la base du MLST serait que, dans l'analyse, ont été considérés à la fois des housekeeping genes, comme préconisé lors de la description de la méthode (Maiden *et al.*, 1998), et les gènes *vacA* et *cagA* impliqués plus ou moins directement dans la virulence et qui présentent des particularités chez les souches asiatiques (van der Ende *et al.*, 1998) (Van Doorn *et al.*, 1999) (van Doorn *et al.*, 1999a) (Yamaoka *et al.*, 2000a) (Yamaoka *et al.*, 2000b). En effet, certains génotypes *vacA* (s1c et m2b) ne sont retrouvés qu'en Asie (van Doorn *et al.*, 1998a). De même, le séquençage de l'extrémité 3' de l'îlot de pathogénicité *cag* conduit sur plus de 500 souches de *H. pylori* provenant de différentes origines géographiques a mis en évidence trois types de motifs : un type regroupant les souches provenant d'Europe, d'Amérique du Sud, d'Amérique du Nord et d'Afrique, un type regroupant les souches provenant du Japon et de Chine, et un type comprenant les souches provenant d'Inde (Kersulyte *et al.*, 2000). Compte tenu que les gènes *vacA* et *cagA* présentent de telles particularités géographiques, il n'est pas impossible que, quand ils sont introduits dans l'analyse, et alors que les autres gènes se distribuent de façon aléatoire dans la population, les gènes *vacA* et *cagA* prennent un poids considérable. De fait, l'image de ce groupe asiatique ne pourrait être que le reflet des particularités portées par les gènes *vacA* et *cagA*.

Un autre biais ayant pu conduire à l'image de groupes asiatiques assez fortement constitués dans les études précédemment publiées (Achtman *et al.*, 1999) (Kersulyte *et al.*, 2000) est que celles-ci ne considèrent que des souches de *H. pylori* possédant l'îlot de pathogénicité *cag*. De la même façon, si dans la présente étude ne sont considérées que les

souches *cagA*+, toutes les souches asiatiques se trouvent regroupées dans l'analyse conduite sur des données MLEE.

Toutefois, dans la présente étude, le groupe de souches asiatiques (Chine, Japon, Hong-Kong) visible sur le dendrogramme UPGMA construit à partir des données combinées de l'ensemble des marqueurs analysés (Figure III.18a) subsiste sur le dendrogramme UPGMA construit à partir des données combinées de l'ensemble des marqueurs analysés, moins les marqueurs *vacA*, *cagA* et IS605 (Figure III.18b). L'existence d'un groupe asiatique de « basse clonalité » ne serait donc pas le seul fait des gènes *vacA* et *cagA*.

L'identification de ce groupe asiatique a conduit à l'élaboration de plusieurs hypothèses.

L'hypothèse d'un balayage sélectif récent dans la région *cag* ayant pu conduire à l'apparition de ce groupe asiatique a été écartée dans la mesure où les séquences *cagA* du groupe asiatique ne sont pas particulièrement uniformes (Achtman *et al.*, 1999).

Par ailleurs, il a été proposé que les différences géographiques rencontrées dans les génotypes de *H. pylori* seraient le reflet de la sélection et de la dérive génique. Ces deux phénomènes se seraient produits chez différents anciens hôtes animaux, qui, à plusieurs reprises, auraient transmis *H. pylori* à l'homme (Kersulyte *et al.*, 2000). D'après les données du MLST, cette dérive génique pourrait reposer sur un taux de mutations plus élevé dans les gènes *cagA* et *vacA* que dans le gène *flaA* ou dans les housekeeping genes (Achtman *et al.*, 1999).

Une autre hypothèse est que les gènes *vacA* et *cagA* ont été acquis plus récemment par la bactérie (Saunders, communication personnelle). Ainsi, les recombinaisons, s'appliquant à tout le génome, n'auraient pas encore complètement brouillé ces deux régions du génome, et, de fait, laisseraient entrevoir encore ces groupes de « basse clonalité ». Cette hypothèse s'opposerait à l'idée que les gènes *cagA* et *vacA* ont le même âge que les autres gènes chromosomiques et à l'idée d'une expansion clonale ancienne du groupe asiatique proposé par Achtman *et al.* (1999). Si, cette possibilité d'une expansion clonale est suggérée par l'existence de particularités géographiques dans d'autres espèces de microorganismes tels que *Mycobacterium tuberculosis* (van Soolingen *et al.*, 1995), *M. leprae* (Matsuoka *et al.*, 2000) ou *H. influenzae* (Musser *et al.*, 1990), en revanche, la définition de l'âge des gènes reste un problème ardu.

3.3. Hypothèse d'une structure clonale de l'espèce *H. pylori*

Une autre hypothèse pouvant expliquer la très grande diversité des génotypes clonaux rencontrés dans l'espèce *H. pylori* est qu'un très grand nombre de génotypes ont émergé et ont évolué isolément les uns des autres. Cette hypothèse a été récemment proposée par Han *et al.* (2000) sur la base de l'analyse de profils de PCR-RFLP des gènes *ureA-ureB*, *flaA*, *vacA*, *cagA*, et ADNr 16S et sur la base d'analyses phénétiques (UPGMA) et du calcul de l'indice I_A . Cette hypothèse repose sur le fait que, dans le cas d'infections intrafamiliales, il apparaît que les souches de *H. pylori* par hébergées les enfants sont plus proches de celles de leurs parents que de celles des membres des autres familles étudiées, suggérant un mode de transmission vertical de la mère à l'enfant. Si cette hypothèse était vérifiée, *H. pylori* serait le premier pathogène humain présentant un mode de transmission aussi stricte (Han *et al.*, 2000).

Toutefois, tant que les modes d'acquisition de l'infection à *H. pylori* ne seront pas bien établis, cette hypothèse ne pourra être vérifiée.

Quoi qu'il en soit, même si l'hypothèse d'une structure recombinante reste la plus probable, de courts épisodes de clonalité existent bien dans le cas des infections intrafamiliales (Nwokolo *et al.*, 1992) (Suerbaum *et al.*, 1998) (Han *et al.*, 2000). En outre, dans le cas de suivis d'infection au long court, il apparaît qu'un même génotype de *H. pylori* se maintient tout au long de la vie chez son hôte (Kuipers *et al.*, 2000), mais aussi que, dans le cas d'infections multiples, des recombinaisons entre les génotypes sont possibles (Kersulyte *et al.*, 1999).

4. IMPLICATIONS DE LA STRUCTURE RECOMBINANTE DE *HELICOBACTER PYLORI* DANS LE SUIVI EPIDEMIOLOGIQUE DES SOUCHES

La structure génétique de l'espèce *H. pylori* a pu être comparée à celles d'autres microorganismes étudiés par les mêmes marqueurs génétiques (RAPD et MLEE) et soumis aux mêmes méthodes d'analyse. A la différence de *H. pylori*, les tests de déséquilibre de liaison appliqués aux trois autres espèces considérées *E. coli*, *N. meningitidis* et *T. cruzi* présentent des valeurs significatives à la fois sur les données RAPD et sur les données MLEE (Tableau III.12). Dans les modèles proposés par Maynard-Smith *et al.* (1993), ces espèces correspondent à trois modèles d'évolution clonale différent : propagation clonale importante avec des échanges génétiques fréquents pour *E. coli* (mais beaucoup moins que dans le cas de *H. pylori*) (Desjardins *et al.*, 1995), clonalité épidémique pour *N. meningitidis* (Maynard Smith *et al.*, 1993) et évolution clonale avec d'exceptionnels phénomènes d'hybridation entre clones différents pour *T. cruzi* (Tibayrenc *et al.*, 1986) (Tibayrenc *et al.*, 1993). Cette analyse comparative permet de

mieux situer la structure génétique de *H. pylori* et de mesurer les implications de la structure recombinante quant au suivi épidémiologique des souches, notamment.

Ainsi, au contraire des génotypes des espèces qui se propagent de façon clonale, les génotypes des espèces recombinantes, donc de *H. pylori*, sont instables et s'éteignent rapidement (Tibayrenc *et al.*, 1993). De fait, le suivi épidémiologique de ces souches est très difficile, à moins d'utiliser des marqueurs génétiques qui évoluent très rapidement. En outre, ce suivi n'est possible que sur des très courtes périodes dans le temps. L'existence de brefs épisodes de clonalité est d'ailleurs rapportée dans le cas d'infections intrafamiliales à *H. pylori* (Nwokolo *et al.*, 1992) (Suerbaum *et al.*, 1998) (Han *et al.*, 2000). De plus, les mutations qui conduisent à l'apparition de résistance aux antibiotiques ou à l'émergence de génotypes plus virulents peuvent se redistribuer dans toute la population sous l'effet de la recombinaison. Ce problème est d'intérêt dans le cas de *H. pylori* alors qu'en France 14% des souches sont résistantes aux traitements par des macrolides (Mégraud, 2000), résistance conférée par une mutation au niveau des gènes codant pour les ARNr 23S (Taylor *et al.*, 1997) (Versalovic *et al.*, 1997). Les seuls obstacles qui peuvent s'opposer la propagation de tels génotypes sont des obstacles physiques : le temps et l'espace. Une autre implication du fort taux de recombinaison observé chez *H. pylori* est qu'à la différence des espèces à évolution clonale, comme *Trypanosoma cruzi*, il n'y aura aucune tendance à l'individualisation intraspécifique de lignées phylogénétique discrètes accumulant toujours davantage de mutations divergentes, y compris pour les gènes codant pour les propriétés médicalement importantes (pathogénicité, résistance aux drogues ou aux vaccins). Chez une espèce fortement recombinante comme *H. pylori*, il n'y a donc pas de raison a priori d'attendre une concordance statistique entre divergence évolutive des souches et différences biomédicales, comme c'est le cas pour beaucoup de caractères chez *T. cruzi*. Une telle structuration intraspécifique en lignées phylogénétiques discrètes, très forte chez *T. cruzi*, n'est qu'ébauchée chez *E. coli* et totalement absente chez *H. pylori*.

CONCLUSION – PERSPECTIVES

CONCLUSION – PERSPECTIVES

En définitive, cette étude basée sur l'utilisation d'un grand nombre de marqueurs et de différentes approches d'analyses des résultats a permis d'établir des arguments en faveur de la structure recombinante de l'espèce *H. pylori*.

Il apparaît donc qu'en dépit du caractère haploïde et de la reproduction par fission des bactéries, la clonalité ne soit pas la règle chez ces microorganismes, comme proposé sur la base des premiers travaux de génétique des populations conduits sur les bactéries (Ørskov & Ørskov, 1983) (Selander & Levin, 1980). Au contraire, une grande variété existe dans la structure génétique des populations des microorganismes, ceux ci combinant clonalité et recombinaison à des degrés divers (Maynard Smith *et al.*, 1993).

Dans ce cadre, la stratégie évolutive choisie par *H. pylori* semble être la clonalité à l'échelle de l'individu hôte (chaque sujet infecté héberge une population de souches présentant toutes le même génotype), et la recombinaison à l'échelle de l'espèce entière (le génotype d'une souche n'étant représentatif que de l'individu qui l'héberge). Les cas d'infections intrafamiliales (un même génotype chez plusieurs membres d'une même famille) et les cas d'infections multiples (recombinaison entre deux génotypes différents hébergés par un même hôte) constituent des schémas intermédiaires.

Quoi qu'il en soit, le problème de la recombinaison au sein de l'espèce *H. pylori* reste entier.

Ainsi, s'il est admis que des échanges génétiques peuvent avoir lieu entre plusieurs souches de *H. pylori* lors de coinfection chez l'homme (Kersulyte, Chalkauskas & Berg, 1999) et que les phénomènes d'infections multiples et transitoires se produisent plus couramment qu'on l'a cru par le passé, même dans les pays industrialisés (Labigne, 1994) (Logan & Berg, 1996), une restriction à apporter est que *H. pylori* est relativement peu mobile et se cantonne dans des foyers inflammatoires très localisés ce qui, par la même, limite considérablement la probabilité des échanges génétiques entre deux souches de types différents (Akopyants, Eaton & Berg, 1995).

L'hypothèse selon laquelle les souches de *H. pylori* coccoïdes pourraient servir de réservoir d'ADN pour les autres souches au niveau de l'estomac demande à ce que le caractère naturellement transformable *in vivo* de *H. pylori* soit prouvé. En outre, cette éventualité de transferts génétiques entre les souches pose le problème du respect de l'intégrité de l'ADN dans le milieu acide de l'estomac. Au mieux, ces formes coccoïdes serviraient de réservoir de nutriments.

Par comparaison de séquences, des homologies ont été trouvées entre les gènes de *H. pylori* et les gènes d'autres espèces (Tomb *et al.*, 1997) (Saunders *et al.*, 1998) (Alm *et al.*,

1999). Toutefois, un tiers des ORF (Open Reading Frames) n'a pas de fonction connue et n'est retrouvé dans aucune autre espèce : cette observation limite donc l'hypothèse de transferts génétiques interspécifiques. En outre, *H. pylori* est le seul microorganisme capable de s'implanter dans l'estomac, hormis certaines observations d'implantation transitoire de *H. helmantii* ou les cas d'implantation de *Candida albicans* chez certains patients sidéens. La probabilité des échanges génétiques interspécifiques au niveau de l'estomac semble donc faible. Par ailleurs, tant que les modes de transmission de l'infection à *H. pylori* n'auront pas été clairement identifiés et tant que la viabilité de *H. pylori* n'aura pas été prouvée en dehors de sa niche écologique, la possibilité d'échanges interspécifiques hors de l'estomac reste en suspens.

Par ailleurs, on peut s'interroger sur les raisons de la très grande diversité génétique rencontrée au sein de l'espèce *H. pylori*. En effet, il y a encore peu de temps, on considérait qu'un grand polymorphisme génétique se rencontrait seulement dans les bactéries de l'environnement, mais que les bactéries pathogènes des animaux avaient une diversité génétique moindre (Wise, Shimkets & McArthur, 1995) (Maynard Smith *et al.*, 1993), l'exception étant *N. gonorrhoeae*. A cette exception, il faut ajouter *H. pylori*. Ainsi, des bactéries du sol amenées à rencontrer des environnements variables présentent un haut niveau de polymorphisme génétique (Wise *et al.*, 1995). Des expériences de modélisation étudiant l'influence de la pression immunitaire sur la variation antigénique chez *N. meningitidis* montrent qu'en présence d'une forte pression de sélection, la population est plus structurée, alors qu'une faible pression de sélection permet plus de diversité dans les génotypes (Gupta & Anderson, 1999). Concernant *H. pylori*, il serait intéressant d'envisager dans quelle mesure l'environnement acide de l'estomac et la pression de sélection imposée par le système immunitaire de l'hôte jouent sur la diversité génétique de ce pathogène. Les quelques éléments dont on dispose déjà à ce sujet sont que le milieu dans lequel vit *H. pylori* est soumis à des variations, des modifications du pH intragastrique notamment. Toutefois, il semble que *H. pylori* soit relativement isolé du milieu intragastrique, se nichant dans le mucus. Un argument en faveur de son isolement vis à vis du milieu intragastrique est que l'uréase, qui provoque une alcalinisation locale du milieu, si elle est nécessaire à l'établissement de la bactérie au site de l'infection, n'est en revanche pas nécessaire à la survie de la bactérie dans l'estomac.

Compte tenu de la structure recombinante de *H. pylori*, le suivi épidémiologique des souches paraît difficile. Les épisodes de clonalité sont limités dans le temps et dans l'espace. En outre, il n'a pas encore été identifié de véritable marqueur de virulence, permettant une corrélation satisfaisante entre le génotype de la bactérie et la pathologie présentée par le patient. L'analyse de souches de *H. pylori* isolées chez des patients asymptomatiques seraient d'intérêt afin de pouvoir mieux appréhender les facteurs de l'hôte et de la bactérie qui sont impliqués dans la génération de la pathologie.

La structure recombinante de *H. pylori* rend également difficile toute approche phylogénétique. Une stratégie possible est de sélectionner les gènes codant pour les marqueurs isoenzymatiques qui se sont révélés les moins variables et de les soumettre à une analyse MLST. Le choix de ces gènes à horloge moléculaire plus lente permettrait de contourner plus sûrement le danger d'établir des phylogénies qui sont représentatives seulement des gènes analysés et non de l'espèce étudiée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achtman, M., Azuma, T., Berg, D. E., Ito, Y., Morelli, G., Pan, Z. J., Suerbaum, S., Thompson, S. A., van der Ende, A. & van Doorn, L. J. (1999). Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol* **32**, 459-470.
- Aeschbacher, M. & Piffaretti, J. C. (1989). Population genetics of human and animal enteric *Campylobacter* strains. *Infect Immun* **57**, 1432-1437.
- Akopyants, N. S., Clifton, S. W., Kersulyte, D., Crabtree, J. E., Youree, B. E., Reece, C. A., Bukanov, N. O., Drazek, E. S., Roe, B. A. & Berg, D. E. (1998). Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **28**, 37-53.
- Akopyants, N. S., Eaton, K. A. & Berg, D. E. (1995). Adaptive mutation and cocolonization during *Helicobacter pylori* infection of gnotobiotic piglets. *Infect Immun* **63**, 116-121.
- Akopyanz, N., Bukanov, N. O., Westblom, T. U. & Berg, D. E. (1992a). PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* **20**, 6221-6225.
- Akopyanz, N., Bukanov, N. O., Westblom, T. U., Kresovich, S. & Berg, D. E. (1992b). DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **20**, 5137-5142.
- Alm, R. A., Ling, L. S., Moir, D. T., King, B. L., Brown, E. D., Doig, P. C., Smith, D. R., Noonan, B., Guild, B. C., deJonge, B. L., Carmel, G., Tummino, P. J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D. M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S. D., Jiang, Q., Taylor, D. E., Vovis, G. F. & Trust, T. J. (1999). Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**, 176-180.
- Ando, T., Israel, D. A., Kusugami, K. & Blaser, M. J. (1999). HP0333, a member of the *dprA* family, is involved in natural transformation in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **181**, 5572-5580.
- Atherton, J. C. (1998). *Helicobacter pylori* virulence factors. *Br Med Bull* **54**, 105-120.
- Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R. M., Jr., Tummuru, M. K., Blaser, M. J. & Cover, T. L. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* **270**, 17771-17777.
- Atherton, J. C., Peek, R. M., Jr., Tham, K. T., Cover, T. L. & Blaser, M. J. (1997). Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **112**, 92-99.
- Aucher, P., Petit, M. L., Mannant, P. R., Pezenec, L., Babin, P. & Fauchère, J. L. (1998). Use of immunoblot assay to define serum antibody patterns associated with *Helicobacter pylori* infection and with *Helicobacter pylori*-related ulcers. *J Clin Microbiol* **36**, 931-936.
- Babiker, H. A., Creasey, A. M., Fenton, B., Bayoumi, R. A., Arnot, D. E. & Walliker, D. (1991). Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in a village in eastern Sudan. 1. Diversity of enzymes, 2D-PAGE proteins and antigens. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **85**, 572-577.
- Bañuls, A. (1998). Apport de la génétique évolutive à l'épidémiologie et à la taxonomie du genre *Leishmania*. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, France.
- Bardhan, P. K. (1997). Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Clin Infect Dis* **25**, 973-978.
- Barnabé, C., Brisse, S. & Tibayrenc, M. (2000). Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology* **120**, 513-526.

- Bart, A., Schuurman, I. G., Achtman, M., Caugant, D. A., Dankert, J. & van der Ende, A. (1998). Randomly amplified polymorphic DNA genotyping of serogroup A meningococci yields results similar to those obtained by multilocus enzyme electrophoresis and reveals new genotypes. *J Clin Microbiol* **36**, 1746-9.
- Beltran, P., Delgado, G., Navarro, A., Trujillo, F., Selander, R. K. & Cravioto, A. (1999). Genetic diversity and population structure of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol* **37**, 581-590.
- Ben Abderrazak, S. B., Oury, B., Lal, A. A., Bosseno, M. F., Force-Barge, P., Dujardin, J. P., Fandeur, T., Molez, J. F., Kjellberg, F., Ayala, F. J. & Tibayrenc, M. (1999). *Plasmodium falciparum*: population genetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and other molecular markers. *Exp Parasitol* **92**, 232-238.
- Berg, D. E., Gilman, R. H., Lelwala-Guruge, J., Srivastava, K., Valdez, Y., Watanabe, J., Miyagi, J., Akopyants, N. S., Ramirez-Ramos, A., Yoshiwara, T. H., Recavarren, S. & Leon-Barua, R. (1997). *Helicobacter pylori* populations in Peruvian patients. *Clin Infect Dis* **25**, 996-1002.
- Bingen, E. H., Denamur, E. & Elion, J. (1994). Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin Microbiol Rev* **7**, 311-327.
- Bizzozero, G. (1893). Sulle ghiandole tubulari del tubo gastroenterico e sui rapporti del loro coll'epithelio di rivestimento della mucosa. *Arch Mikr Anat* **42**, 82.
- Blaser, M. J., Perez-Perez, G. I., Kleanthous, H., Cover, T. L., Peek, R. M., Chyou, P. H., Stemmermann, G. N. & Nomura, A. (1995). Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* **55**, 2111-2115.
- Bode, G., Malfertheimer, P., Lenhardt, G., Nilius, M. & Dischuneit, H. (1993a). Ultrastructural localization of urease of *Helicobacter pylori*. *Med Microbiol Immun* **182**, 223-242.
- Bode, G., Mauch, F. & Malfertheimer, P. (1993b). The coccoid forms of *Helicobacter pylori*: criteria for their variability. *Epidemiol Infect* **111**, 483-490.
- Boerlin, P., Peter, O., Bretz, A., Postic, D., Baranton, G. & Piffaretti, J. (1992). Population genetic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates by multilocus enzyme electrophoresis. *Infect Immun* **60**, 1677-1683.
- Boerlin, P. & Piffaretti, J. C. (1991). Typing of human, animal, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1624-1629.
- Boyd, E. F., Nelson, K., Wang, F. S., Whittam, T. S. & Selander, R. K. (1994). Molecular genetic basis of allelic polymorphism in malate dehydrogenase (*mdh*) in natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1280-1284.
- Boyd, E. F., Wang, F. S., Whittam, T. S. & Selander, R. K. (1996). Molecular genetic relationships of the salmonellae. *Appl Environ Microbiol* **62**, 804-808.
- Brisse, S. (1997). Phylogénie moléculaire des clones naturels de *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas: Evolution clonale, recombinaison génétique et relations phylogénétiques avec d'autres espèces du sous-genre *Schizotrypanum*. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, France.
- Brisse, S., Barnabé, C. & Tibayrenc, M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitology* **30**, 35-44.
- Bronsdon, M. A., Goodwin, C. S., Sly, L. I., Chilvers, T. & Schoenknecht, F. D. (1991). *Helicobacter nemestrinae* sp. nov., a spiral bacterium found in the stomach of a pigtailed macaque (*Macaca nemestrina*). *Int J Syst Bacteriol* **41**, 148-153.

- Broutet, N. & Mégraud, F. (1996). Epidémiologie de l'infection à *Helicobacter pylori*. In *Helicobacter pylori*, vol. 1 (ed. F. Mégraud and H. Lamouliatte), pp. 79-100. Elsevier, Paris.
- Brown, A., Feldman, M. & Nevo, E. (1980). Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* **96**, 523-536.
- Bukanov, N. O. & Berg, D. E. (1994). Ordered cosmid library and high-resolution physical-genetic map of *Helicobacter pylori* strain NCTC11638. *Mol Microbiol* **11**, 509-523.
- Burucoa, C., Blasac, G., Solnick, J. & Fauchère, J. (2000). Mutators in *Helicobacter pylori*: the paradoxal promutator role of a *mutS* homolog. In *European Helicobacter pylori Study Group*, Rome, Italy.
- Burucoa, C., Lhomme, V. & Fauchère, J. L. (1999). Performance Criteria of DNA Fingerprinting Methods for Typing of *Helicobacter pylori* Isolates: Experimental Results and Meta-Analysis. *J Clin Microbiol* **37**, 4071-4080.
- Caugant, D. A., Kristiansen, B. E., Froholm, L. O., Bovre, K. & Selander, R. K. (1988). Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Infect Immun* **56**, 2060-2068.
- Caugant, D. A., Mocca, L. F., Frasc, C. E., Froholm, L. O., Zollinger, W. D. & Selander, R. K. (1987). Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J Bacteriol* **169**, 2781-92.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. & Covacci, A. (1996). *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I- specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14648-14653.
- Chalkauskas, H., Kersulyte, D., Cepulienė, I., Urbonas, V., Ruzeviciene, D., Barakauskiene, A., Raudonikiene, A. & Berg, D. E. (1998). Genotypes of *Helicobacter pylori* in Lithuanian families. *Helicobacter* **3**, 296-302.
- Chan, W., Hui, P., Leung, K., Chow, J., Kwok, F. & Ng, C. (1994). Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in human stomach. *Am J Clin Pathol* **102**, 503-507.
- Chooromoney, K. N., Hampson, D. J., Eamens, G. J. & Turner, M. J. (1994). Analysis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Erysipelothrix tonsillarum* by multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol* **32**, 371-376.
- Clayton, C. L., Pallen, M. J., Kleanthous, H., Wren, B. W. & Tabaqchali, S. (1990). Nucleotide sequence of two genes from *Helicobacter pylori* encoding for urease subunits. *Nucleic Acids Res* **18**, 362.
- Clyne, M. & Drumm, B. (1997). Absence of effect of Lewis A and Lewis B expression on adherence of *Helicobacter pylori* to human gastric cells. *Gastroenterology* **113**, 72-80.
- Covacci, A. (2001). Ilot de pathogénicité *cag* et signalisation cellulaire. In *Réunion Annuelle du Groupe d'Etude Français des Helicobacter*, Paris.
- Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N. & et al. (1993). Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5791-5795.
- Covacci, A., Falkow, S., Berg, D. E. & Rappuoli, R. (1997). Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? *Trends Microbiol* **5**, 205-208.
- Cover, T. L. (1996). The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **20**, 241-246.
- Cover, T. L. & Blaser, M. J. (1992). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* **267**, 10570-10575.

- Cover, T. L., Glupczynski, Y., Lage, A. P., Burette, A., Tummuru, M. K., Perez-Perez, G. I. & Blaser, M. J. (1995). Serologic detection of infection with *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol* **33**, 1496-1500.
- Cover, T. L., Tummuru, M. K., Cao, P., Thompson, S. A. & Blaser, M. J. (1994). Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* **269**, 10566-10573.
- Crabtree, J. E., Xiang, Z., Lindley, I. J., Tompkins, D. S., Rappuoli, R. & Covacci, A. (1995). Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a *cagA* negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* **48**, 967-969.
- Darlu, P. & Tassy, P. (1993). *Reconstruction phylogénétique. Concepts et méthodes*, Masson édition, Paris.
- De Groote, D., Ducatelle, R., van Doorn, L. J., Tilmant, K., Verschuuren, A. & Haesebrouck, F. (2000). Detection of "*Candidatus helicobacter suis*" in gastric samples of pigs by PCR: Comparison with other invasive diagnostic techniques. *J Clin Microbiol* **38**, 1131-1135.
- De Groote, D., van Doorn, L. J., Ducatelle, R., Verschuuren, A., Tilmant, K., Quint, W. G., Haesebrouck, F. & Vandamme, P. (1999). Phylogenetic characterization of '*Candidatus Helicobacter bovis*', a new gastric *Helicobacter* in cattle. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**, 1707-1715.
- Delluva, A., Markley, K. & Davies, R. (1968). The absence of gastric urease in germ-free animals. *Biochim Biophys Acta* **151**, 646-650.
- Denny, T. P., Gilmour, M. N. & Selander, R. K. (1988). Genetic diversity and relationships of two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *J Gen Microbiol* **134**, 1949-1960.
- Desai, M., Linton, D., Owen, R. J. & Stanley, J. (1994). Molecular typing of *Helicobacter pylori* isolates from asymptomatic, ulcer and gastritis patients by urease gene polymorphism. *Epidemiol Infect* **112**, 151-160.
- Desjardins, P., Picard, B., Kaltenbock, B., Elion, J. & Denamur, E. (1995). Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population: evidence from random amplified polymorphic DNA and restriction-fragment-length polymorphism. *J Mol Evol* **41**, 440-448.
- Dewhirst, F., Fox, J., Mendes, E., Paster, B., Gates, C., Kirkbride, C. & Eaton, K. (2000). '*Flexispira rappini*' strains represent at least 10 *Helicobacter* taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1781-1787.
- Dewhirst, F. E., Seymour, C., Fraser, G. J., Paster, B. J. & Fox, J. G. (1994). Phylogeny of *Helicobacter* isolates from bird and swine feces and description of *Helicobacter pametensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 553-560.
- Doig, P., de Jonge, B. L., Alm, R. A., Brown, E. D., Uria-Nickelsen, M., Noonan, B., Mills, S. D., Tummino, P., Carmel, G., Guild, B. C., Moir, D. T., Vovis, G. F. & Trust, T. J. (1999). *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol Molec Biol Rev* **63**, 675-+.
- Domingo, D., Alarcon, T., Prieto, N., Sanchez, I. & Lopez-Brea, M. (1999). *cagA* and *vacA* status of Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* **37**, 2113-2114.
- Dore, M. P., Bilotta, M., Vaira, D., Manca, A., Massarelli, G., Leandro, G., Atzei, A., Pisanu, G., Graham, D. Y. & Realdi, G. (1999). High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in shepherds. *Dig Dis Sci* **44**, 1161-1164.
- Duncan, K. E., Ferguson, N., Kimura, K., Zhou, X. & Istock, C. A. (1994). Fine-scale genetic and phenotypic structure in natural populations of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: implications for bacterial evolution and speciation. *Evolution* **48**, 2002-25.
- Eardly, B. D., Materon, L. A., Smith, N. H., Johnson, D. A., Rumbaugh, M. D. & Selander, R. K. (1990). Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* **56**, 187-194.

- Eaton, K. A., Brooks, C., Morgan, D. & Krakowka, S. (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* **59**, 2470-2475.
- Eaton, K. A., Dewhirst, F. E., Radin, M. J., Fox, J. G., Paster, B. J., Krakowka, S. & Morgan, D. R. (1993). *Helicobacter acinonyx* sp. nov., isolated from cheetahs with gastritis. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 99-106.
- Eaton, K. A., Morgan, D. & Krakowa, S. (1992). Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* **37**, 123-127.
- Eaton, K. A., Ringler, S. S. & Krakowka, S. (1998). Vaccination of gnotobiotic piglets against *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis* **178**, 1399-405.
- Eckloff, B. W., Podzorski, R. P., Kline, B. C. & Cockerill, F. R., 3rd. (1994). A comparison of 16S ribosomal DNA sequences from five isolates of *Helicobacter pylori*. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 320-323.
- Efron, B. (1979). Bootstrap methods: an other look at the jackknife. *Ann Statist* **7**, 1-26.
- El-Zaatari, F., Woo, J., Badr, A., Osato, M., Serna, H., Lichtenberger, L., Genta, R. & Graham, D. (1997). Failure to isolate *Helicobacter pylori* from stray cats indicates that *Helicobacter pylori* in cats may be an anthroponosis-an animal infection with human pathogen. *J Med Microbiol* **46**, 1-5.
- Escoufier, B. & Pagès, J. (1993). Analyse des correspondances multiples. In *Analyses factorielles simples et multiples: objectifs, méthodes et interprétation* (ed. B. Escoufier and J. Pagès), pp. 48-65, Paris, France.
- Evans, D., Evans, D. J., Takemura, T., Nakano, H., Lampert, H., Graham, D., Granger, D. & Kviety, P. (1995). Characterization of *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun* **63**, 2213-2220.
- Evans, D. G., Queiroz, D. M., Mendes, E. N. & Evans, D. J., Jr. (1998). *Helicobacter pylori* *cagA* status and *s* and *m* alleles of *vacA* in isolates from individuals with a variety of *Helicobacter pylori*-associated gastric diseases. *J Clin Microbiol* **36**, 3435-3437.
- Fallone, C. A., Barkun, A. N., Gottke, M. U. & Beech, R. N. (1998). A review of the possible bacterial determinants of clinical outcome in *Helicobacter pylori* infection. *Can J Microbiol* **44**, 201-210.
- Fauchère, J. L. & Blaser, M. J. (1990). Adherence of *Helicobacter pylori* cells and their surface components to HeLa cell membranes. *Microb Pathog* **9**, 427-439.
- Fauchère, J. L., Rosenau, A., Veron, M., Moyen, E. N., Richard, S. & Pfister, A. (1986). Association with HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. *Infect Immun* **54**, 283-7.
- Feil, E. J., Maiden, M. C. J., Achtman, M. & Spratt, B. G. (1999). The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol* **16**, 1496-1502.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Ferrero, R. & Labigne, A. (1993). Cloning, expression and sequencing of *Helicobacter felis* urease genes. *Mol Microbiol* **9**, 323-333.
- Ferrero, R. & Lee, A. (1991). The importance of urease in acid protection for the gastric-colonising bacteria *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis* sp nov. *Microbiol Ecol Health Dis* **4**, 121-134.

- Forbes, K. J., Fang, Z. & Pennington, T. H. (1995). Allelic variation in the *Helicobacter pylori* flagellin genes *flaA* and *flaB*: its consequences for strain typing schemes and population structure. *Epidemiol Infect* **114**, 257-266.
- Fox, J. (1995). Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* **9** (suppl2), 93-103.
- Fox, J., Chilvers, T., Goodwin, C., Taylor, N., Edmonds, P., Sly, L. & Brenner, D. (1989). *Campylobacter mustelae*, a new species resulting from the elevation of *Campylobacter subsp. mustelae* to species status. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 301-303.
- Fox, J., Taylor, N., Edmonds, P. & Brenner, D. (1988). *Campylobacter pylori subsp. mustelae subsp. nov.*; isolated from the gastric mucosa of ferrets (*Mustela putorius furo*), and emended description of *Campylobacter pylori*. *Int J Syst Bacteriol* **38**, 367-370.
- Fox, J. G., Chien, C. C., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Shen, Z., Melito, P. L., Woodward, D. L. & Rodgers, F. G. (2000). *Helicobacter canadensis* sp. nov. isolated from humans with diarrhea as an example of an emerging pathogen. *J Clin Microbiol* **38**, 2546-2549.
- Fox, J. G., Dewhirst, F. E., Tully, J. G., Paster, B. J., Yan, L., Taylor, N. S., Collins, M. J., Jr., Gorelick, P. L. & Ward, J. M. (1994). *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol* **32**, 1238-1245.
- Fox, J. G., Yan, L. L., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Shames, B., Murphy, J. C., Hayward, A., Belcher, J. C. & Mendes, E. N. (1995). *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. *J Clin Microbiol* **33**, 445-454.
- Foxall, P. A., Hu, L. T. & Mobley, H. L. (1992). Use of polymerase chain reaction-amplified *Helicobacter pylori* urease structural genes for differentiation of isolates. *J Clin Microbiol* **30**, 739-741.
- Franklin, C. L., Beckwith, C. S., Livingston, R. S., Riley, L. K., Gibson, S. V., Besch-Williford, C. L. & Hook, R. R., Jr. (1996). Isolation of a novel *Helicobacter* species, *Helicobacter cholecystus* sp. nov., from the gallbladders of Syrian hamsters with cholangiofibrosis and centrilobular pancreatitis. *J Clin Microbiol* **34**, 2952-2958.
- Franklin, C. L., Riley, L. K., Livingston, R. S., Beckwith, C. S., Hook, R. R., Jr., Besch-Williford, C. L., Hunziker, R. & Gorelick, P. L. (1999). Enteric lesions in SCID mice infected with "*Helicobacter typhlonicus*," a novel urease-negative *Helicobacter* species. *Lab Anim Sci* **49**, 496-505.
- Fujimoto, S., Marshall, B. & Blaser, M. J. (1994). PCR-based restriction fragment length polymorphism typing of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* **32**, 331-334.
- Galvez, A., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M. & Valvidia, E. (1998). Publication rates reveals trends in microbiological research. *ASM News* **64**, 269-275.
- Garner, R. M., Fulkerson, J., Jr. & Mobley, H. L. (1998). *Helicobacter pylori* glutamine synthetase lacks features associated with transcriptional and posttranslational regulation. *Infect Immun* **66**, 1839-1847.
- Ge, Z. & Taylor, D. E. (1999). Contributions of genome sequencing to understanding the biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Microbiol* **53**, 353-387.
- Ghiara, P., Marchetti, M., Blaser, M., Tummu, M., Cover, T., Segal, E., Tompkins, L. & Rappuoli, R. (1995). Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors : vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in a mouse model of disease. *Infect Immun* **63**, 4154-4160.
- Go, M. F., Cissell, L. & Graham, D. Y. (1998). Failure to confirm association of *vac A* gene mosaicism with duodenal ulcer disease. *Scand J Gastroenterol* **33**, 132-136.
- Go, M. F., Kapur, V., Graham, D. Y. & Musser, J. M. (1996). Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol* **178**, 3934-3938.

- Goodman, K., Correa, P., Tengana, A. H., Ramirez, H., DeLany, J., Guerrero Pepinosa, O., Lopez Quinones, M. & Collazos Parra, T. (1996). *Helicobacter pylori* infection in the Columbian Andes: a population based study of transmission pathways. *Am J Epidemiol* **144**, 290-299.
- Goodwin, C., Armstrong, J., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M., Sly, L., McConnell, W. & Harper, W. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter pylori* gen. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. respectively. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 397-405.
- Goto, K., Ohashi, H., Ebukuro, S., Itoh, K., Tohma, Y., Takakura, A., Wakana, S., Ito, M. & Itoh, T. (1998). Isolation and characterization of *Helicobacter* species from the stomach of the house musk shrew (*Suncus murinus*) with chronic gastritis. *Curr Microbiol* **37**, 44-51.
- Göttke, M. U., Fallone, C. A., Barkun, A. N., Vogt, K., Loo, V., Trautmann, M., Tong, J. Z., Nguyen, T. N., Fainsilber, T., Hahn, H. H., Korber, J., Lowe, A. & Beech, R. N. (2000). Genetic variability determinants of *Helicobacter pylori*: influence of clinical background and geographic origin of isolates. *J Infect Dis* **181**, 1674-1681.
- Graham, D., Malaty, H., Evans, D., Klein, P. & Adam, E. (1991). Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United-States. *Gastroenterology* **100**, 1495-1501.
- Grandhomme, M. (1999). Etude phylogénétique d'*Escherichia coli* par la technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Thèse de Diplôme d'Etat en Pharmacie, Université de Montpellier, France.
- Greenacre, M. (1984). *Theory and applications of correspondence analysis*, Academic Press, Ltd. edition, London, United Kingdom.
- Grimont, F. & Grimont, P. A. (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **137B**, 165-175.
- Grubel, P., Huang, L., Masubuchi, N., Stutzenberger, F. J. & Cave, D. R. (1998). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in houseflies (*Musca domestica*) on three continents. *Lancet* **352**, 788-789.
- Gupta, S. & Anderson, R. M. (1999). Population structure of pathogens: The role of immune selection. *Parasitol Today* **15**, 497-501.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I. & Tschape, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**, 1089-1097.
- Hammar, M., Tyszkiewicz, T., Wadstrom, T. & O'Toole, P. W. (1992). Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**, 54-58.
- Han, S. R., Zschausch, H. C., Meyer, H. G., Schneider, T., Loos, M., Bhakdi, S. & Maeurer, M. J. (2000). *Helicobacter pylori*: clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. *J Clin Microbiol* **38**, 3646-3651.
- Hanninen, M. L., Happonen, I., Saari, S. & Jalava, K. (1996). Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 160-166.
- Hawtin, P., Stacey, A. & Newell, D. (1990). Investigation of the structure and localization of the urease of *Helicobacter pylori* using monoclonal antibodies. *J Gen Microbiol* **136**, 1995-2000.
- Hazell, S. L., Andrews, R. H., Mitchell, H. M. & Daskalopoulous, G. (1997). Genetic relationship among isolates of *Helicobacter pylori*: evidence for the existence of a *Helicobacter pylori* species-complex. *FEMS Microbiol Lett* **150**, 27-32.
- Hegarty, J. P., Dowd, M. T. & Baker, K. H. (1999). Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the united states. *J Appl Microbiol* **87**, 697-701.
- Helgason, E., Caugant, D. A., Olsen, I. & Kolsto, A. B. (2000). Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *J Clin Microbiol* **38**, 1615-1622.

- Heneghan, M. A., McCarthy, C. F. & Moran, A. P. (2000). Relationship of blood group determinants on *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide with host Lewis phenotype and inflammatory response. *Infect Immun* **68**, 937-941.
- Herzer, P., Inouye, S., Inouye, M. & Whittam, T. (1990). Phylogenetic distribution branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**, 6175-6181.
- Ho, S. A., Hoyle, J. A., Lewis, F. A., Secker, A. D., Cross, D., Mapstone, N. P., Dixon, M. F., Wyatt, J. I., Tompkins, D. S., Taylor, G. R. & et al. (1991). Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol* **29**, 2543-2549.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S., Henke, G. & Haas, R. (1998). Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: identification and genetic characterization of the *comB* locus. *Mol Microbiol* **28**, 1027-1038.
- Hook-Nikanne, J., Berg, D. E., Peek, R. M., Jr., Kersulyte, D., Tummuru, M. K. & Blaser, M. J. (1998). DNA sequence conservation and diversity in transposable element IS605 of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **3**, 79-85.
- Hook-Nikanne, J., Sistonen, P. & Kosunen, T. (1990). Effect of ABO blood group and secretor status on the frequency of *Helicobacter pylori* antibodies. *Scand J Gastroenterol* **25**, 815-818.
- Howden, C. W. (1996). Clinical expressions of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Med* **100**, 27S-32S; discussion 32S-34S.
- Hu, L. & Mobley, H. (1990). Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **58**, 992-998.
- Hulten, K., Enroth, H., Nystrom, T. & Engstrand, L. (1998). Presence of *Helicobacter pylori* in Swedish water. *J Appl Microbiol* **85**, 282-286.
- Hulten, K., Han, S., Enroth, H., Klein, P., Opekun, A., Gilman, R., Evans, D., Engstrand, L., Graham, D. & El-Zaatari, F. (1996). *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* **110**, 1031-1035.
- Hurtado, A. & Owen, R. J. (1994). Identification of mixed genotypes in *Helicobacter pylori* from gastric biopsy tissue by analysis of urease gene polymorphisms. *FEMS Immunol Med Microbiol* **8**, 307-313.
- Hurtado, A., Owen, R. J. & Desai, M. (1994). Flagellin gene profiling of *Helicobacter pylori* infecting symptomatic and asymptomatic individuals. *Res Microbiol* **145**, 585-594.
- Husson, M., Vincent, P., Grabiand, M., Furon, D. & Leclerc, H. (1991). Anti-*Helicobacter pylori* IgG levels in abattoir workers. *Gastroenterol Clin Biol* **15**, 723-726.
- International Agency for Research on Cancer (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **61**, 177-241.
- Ito, Y., Azuma, T., Ito, S., Miyaji, H., Hirai, M., Yamazaki, Y., Sato, F., Kato, T., Kohli, Y. & Kuriyama, M. (1997). Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. *J Clin Microbiol* **35**, 1710-4.
- Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise de Sciences Naturelles* **44**, 223-270.
- Jalava, K., Kaartinen, M., Utriainen, M., Happonen, I. & Hanninen, M. L. (1997). *Helicobacter salomonis* sp. nov., a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 975-982.

- Jalava, K., On, S. L. W., Vandamme, P. A., Happonen, I., Sukura, A. & Hanninen, M. L. (1998). Isolation and identification of *Helicobacter* spp. from canine and feline gastric mucosa. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3998-4006.
- Jenks, P. J., Mégraud, F. & Labigne, A. (1998). Clinical outcome after infection with *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the *cag* pathogenicity island. *Gut* **43**, 752-758.
- Jiang, Q., Hiratsuka, K. & Taylor, D. E. (1996). Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol* **20**, 833-842.
- Josenhans, C., Labigne, A. & Suerbaum, S. (1995). Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol* **177**, 3010-3020.
- Kansau, I., Guillain, F., Thiberge, J. M. & Labigne, A. (1996). Nickel binding and immunological properties of the C-terminal domain of the *Helicobacter pylori* GroES homologue (HspA). *Mol Microbiol* **22**, 1013-1023.
- Kelly, D. J. (1998). The physiology and metabolism of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Adv Microb Physiol* **40**, 137-189.
- Kelly, S., Pritcher, M., Farmery, S. & Gibson, G. (1994). Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterology* **107**, 1671-1674.
- Kerr, J. R., Al-Khattaf, A., Barson, A. J. & Burnie, J. P. (2000). An association between sudden infant death syndrome (SIDS) and *Helicobacter pylori* infection. *Arch Dis Child* **83**, 429-434.
- Kersulyte, D., Akopyants, N. S., Clifton, S. W., Roe, B. A. & Berg, D. E. (1998). Novel sequence organization and insertion specificity of IS605 and IS606: chimaeric transposable elements of *Helicobacter pylori*. *Gene* **223**, 175-186.
- Kersulyte, D., Chalkauskas, H. & Berg, D. E. (1999). Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol Microbiol* **31**, 31-43.
- Kersulyte, D., Mukhopadhyay, A. K., Velapatino, B., Su, W., Pan, Z., Garcia, C., Hernandez, V., Valdez, Y., Mistry, R. S., Gilman, R. H., Yuan, Y., Gao, H., Alarcon, T., Lopez-Brea, M., Balakrish Nair, G., Chowdhury, A., Datta, S., Shirai, M., Nakazawa, T., Ally, R., Segal, I., Wong, B. C., Lam, S. K., Olfat, F. O., Boren, T. & Engstrand, L. (2000). Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *J Bacteriol* **182**, 3210-3218.
- Klein, P., Gillman, R., Leon-Barua, R., Diaz, F., Smith, E. & Graham, D. (1994). The epidemiology of *Helicobacter pylori* in Peruvian children between 6 and 30 months of age. *Am J Gastroenterol* **89**, 2196-2200.
- Kreig, N. & Holt, J. (1984). *Berguey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkens, Baltimore.
- Krienitz, W. (1906). Über das Auftreten von Spirochaeten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. *Dtscht Med Wochenschr* **32**, 872.
- Kuipers, E. J., Israel, D. A., Kusters, J. G. & Blaser, M. J. (1998). Evidence for a conjugation-like mechanism of DNA transfer in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **180**, 2901-2905.
- Kuipers, E. J., Israel, D. A., Kusters, J. G., Gerrits, M. M., Weel, J., van der Ende, A., van der Hulst, R. W. M., Wirth, H. P., Hook-Nikanne, J., Thompson, S. A. & Blaser, M. J. (2000). Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis* **181**, 273-282.
- Kuo, C. H., Poon, S. K., Su, Y. C., Su, R., Chang, C. S. & Wang, W. C. (1999). Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from *Helicobacter pylori*-infected couples in Taiwan. *J Infect Dis* **180**, 2064-2068.

- Kusters, J., Gerrits, M., Van Strijp, J. & Vandenbroucke-Grauls, C. (1997). Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun* **65**, 3672-3679.
- Labenz, J., Blum, A. L., Bayerdorffer, E., Meining, A., Stolte, M. & Borsch, G. (1997). Curing *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer may provoke reflux esophagitis. *Gastroenterology* **112**, 1442-7.
- Labigne, A. (1994). Existe-t-il des souches ulcérogènes de *Helicobacter pylori* ? *La Lettre de l'Infectiologue* **9**, 21-27.
- Labigne, A., Cussac, V. & Courcoux, P. (1991). Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol* **173**, 1920-1931.
- Labigne, A. & de Reuse, H. (1996). Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Infect Agents Dis* **5**, 191-202.
- Langenberg, W., Rauws, E. A., Widjojokusumo, A., Tytgat, G. N. & Zanen, H. C. (1986). Identification of *Campylobacter pyloridis* isolates by restriction endonuclease DNA analysis. *J Clin Microbiol* **24**, 414-417.
- Lebart, L., Morineau, A. & Warwick, K. (1984). *Multivariate descriptive analysis: correspondence analysis and related technique for large matrices*, Wiley-Interscience edition, New York, USA.
- Lee, A. (1996). Les *Helicobacter*. Bactériologie, écologie. In *Helicobacter pylori*, vol. 1 (ed. F. Mégraud and H. Lamouliatte). Elsevier, Paris.
- Lee, A., Chen, M., Coltro, N., O'Rourke, J., Hazell, S., Hu, P. & Li, Y. (1992a). Long term infection of the gastric mucosa with *Helicobacter* species does induce atrophic gastritis in an animal model of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* **280**, 38-50.
- Lee, A., O'Rourke, J., De Ungria, M. C., Robertson, B., Daskalopoulos, G. & Dixon, M. F. (1997). A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* **112**, 1386-1397.
- Lee, A., Phillips, M. W., O'Rourke, J. L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Fraser, G. J., Fox, J. G., Sly, L. I., Romaniuk, P. J., Trust, T. J. & et al. (1992b). *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 27-36.
- Letley, D. P., Lastovica, A., Louw, J. A., Hawkey, C. J. & Atherton, J. C. (1999). Allelic diversity of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in South Africa: rarity of the *vacA* s1a genotype and natural occurrence of an s2/m1 allele. *J Clin Microbiol* **37**, 1203-1205.
- Leunk, R., Johnson, P., David, B., Kraft, W. & Morgan, D. (1988). Cytotoxin activity in broth culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* **26**, 93-99.
- Levin, B. R. & Svanborg Eden, C. (1990). Selection and evolution of virulence in bacteria: an ecumenical excursion and modest suggestion. *Parasitology* **100 Suppl**, S103-15.
- Leying, H., Suerbaum, S., Geis, G. & Haas, R. (1992). Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol Microbiol* **6**, 2863-74.
- Liau, Y., Lopez, R., Slomiany, A. & Slomiany, B. (1992). *Helicobacter pylori* polysaccharide effect on the synthesis and secretion of gastric sulfomucin. *Biochem Res Commun* **184**, 1411-1417.
- Lieber, C. & LeFevre, A. (1959). Ammonia as a source of hypoacidity in patients with uraemia. *J Clin Invest* **38**, 1271-1277.
- Lin, S. K., Lambert, J. R., Schembri, M. A., Nicholson, L. & Johnson, I. H. (1998). The prevalence of *Helicobacter pylori* in practising dental staff and dental students. *Aust Dent J* **43**, 35-39.

- Linton, D., Moreno, M., Owen, R. J. & Stanley, J. (1992). 16S rrm gene copy number in *Helicobacter pylori* and its application to molecular typing. *J Appl Bacteriol* **73**, 501-506.
- Loeb, M., Jayaratne, P., Jones, N., Sihoe, A. & Sherman, P. (1998). Lack of correlation between vacuolating cytotoxin activity, *cagA* gene in *Helicobacter pylori*, and peptic ulcer disease in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**, 653-656.
- Logan, R. P. & Berg, D. E. (1996). Genetic diversity of *Helicobacter pylori*. *Lancet* **348**, 1462-1463.
- Lopez, C. R., Owen, R. J. & Desai, M. (1993). Differentiation between isolates of *Helicobacter pylori* by PCR-RFLP analysis of urease A and B genes and comparison with ribosomal RNA gene patterns. *FEMS Microbiol Lett* **110**, 37-43.
- Maeda, S., Ogura, K., Yoshida, H., Funai, F., Ikenoue, T., Kato, N., Shiratori, Y. & Omata, M. (1998). Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut* **42**, 338-343.
- Maeda, S., Yoshida, H., Ikenoue, T., Ogura, K., Kanai, F., Kato, N., Shiratori, Y. & Omata, M. (1999). Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* **44**, 336-341.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. & Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3140-3145.
- Majewski, S. I. & Goodwin, C. S. (1988). Restriction endonuclease analysis of the genome of *Campylobacter pylori* with a rapid extraction method: evidence for considerable genomic variation. *J Infect Dis* **157**, 465-471.
- Majumbar, P., Shah, S., Dhunjibhoy, K. & Desai, H. (1990). Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in healthy volunteers. *Ind J Gastroenterol* **9**, 271-272.
- Malaty, H. M., Engstrand, L., Pedersen, N. L. & Graham, D. Y. (1994). *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann Intern Med* **120**, 982-986.
- Malaty, H. M., Graham, D. Y., Isaksson, I., Engstrand, L. & Pedersen, N. L. (1998). Co-twin study of the effect of environment and dietary elements on acquisition of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Epidemiol* **148**, 793-797.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* **27**, 209-220.
- Marais, A., Mendz, G. L., Hazell, S. L. & F, M. (1999). Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 642-674.
- Marshall, B. (1994). *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* **89**, S116-118.
- Marshall, B. (1996). Histoire de la découverte de *Helicobacter pylori*. In *Helicobacter pylori*, vol.1: Epidémiologie, Pathogénie, Diagnostic (ed. F. Mégraud and H. Lamouliatte), pp. 35-43. Elsevier, Paris.
- Marshall, B., Armstrong, J., McGeachie, D. & Glancy, R. (1985a). Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust* **142**, 436-439.
- Marshall, B., Barrett, L., Prakash, C., McCallum, R. & Guerrant, R. (1990). Urea protects of *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology* **99**, 269-276.
- Marshall, B. & Goodwin, C. (1987). Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 68.
- Marshall, B., McGeachie, D., Rogers, P. & Glancy, R. (1985b). Pyloric *campylobacter* infection and gastroduodenal disease. *Med J Austr* **142**, 439-444.

- Marshall, B., Royce, H., Annear, D., Goodwin, C., Pearman, J., Warren, J. & Armstrong, J. (1984). Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Lett* **25**, 83-88.
- Marshall, B. J. & Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**, 1311-5.
- Marshall, D. G., Chua, A., Keeling, P. W., Sullivan, D. J., Coleman, D. C. & Smyth, C. J. (1995). Molecular analysis of *Helicobacter pylori* populations in antral biopsies from individual patients using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *FEMS Immunol Med Microbiol* **10**, 317-323.
- Matsuoka, M., Maeda, S., Kai, M., Nakata, N., Chae, G. T., Gillis, T. P., Kobayashi, K., Izumi, S. & Kashiwabara, Y. (2000). Mycobacterium leprae typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* **68**, 121-128.
- Maynard Smith, J., Dowson, C. G. & Spratt, B. G. (1991). Localized sex in bacteria. *Nature* **349**, 29-31.
- Maynard Smith, J., Smith, N. H., O'Rourke, M. & Spratt, B. G. (1993). How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4384-4388.
- Mayr, M., Kiechl, S., Willeit, J., Wick, G. & Xu, Q. (2000). Infections, immunity, and atherosclerosis: associations of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, and cytomegalovirus with immune reactions to heat-shock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. *Circulation* **102**, 833-839.
- McGee, D. J. & Mobley, H. L. (1999). Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: bacterial factors. *Curr Top Microbiol Immunol* **241**, 155-180.
- McNulty, C. A., Dent, J. C., Curry, A., Uff, J. S., Ford, G. A., Gear, M. W. & Wilkinson, S. P. (1989). New spiral bacterium in gastric mucosa. *J Clin Pathol* **42**, 585-591.
- Mégraud, F. (1994). *Helicobacter pylori*. In *Manuel de Bactériologie Clinique, 2ème édition*, vol. 3 (ed. J. Freney, F. Renaud, W. Hansen and C. Bollet), pp. 1311-1326. Elsevier, Paris.
- Mégraud, F. (1996). Diagnostic bactériologique standard de l'infection à *Helicobacter pylori*. In *Helicobacter pylori*, vol. 1 (ed. F. Mégraud and H. Lamouliatte), pp. 249-266. Elsevier, Paris.
- Mégraud, F. (2000). Mécanismes de résistance de *Helicobacter pylori* aux antibiotiques. *La Lettre de l'Infectiologue* **15**, 7-8.
- Mégraud, F., Bonnet, F., Garnier, M. & Lamouliatte, H. (1985). Characterization of "*Campylobacter pyloridis*" by culture, enzymatic profile, and protein content. *J Clin Microbiol* **22**, 1007-1010.
- Mégraud, F., Bouchard, S., Brugmann, D., Boyanova, L., Coman, G., Fixa, B., Matysiak-Budnik, T., Prifti, S. & Tamassy, K. (1995). Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in six countries of eastern Europe using a common methodology. *Gut* **37 (suppl1)**, A71.
- Mégraud, F., Brassens-Rabbe, M., Denis, F., Belbouri, A. & Hoa, D. (1989). Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol* **27**, 1870-1873.
- Mendes, E. N., Queiroz, D. M., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Moura, S. B. & Fox, J. G. (1996). *Helicobacter trogonum* sp. nov., isolated from the rat intestine. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 916-921.
- Mendes, E. N., Queiroz, D. M., Rocha, G. A., Moura, S. B., Leite, V. H. & Fonseca, M. E. (1990). Ultrastructure of a spiral micro-organism from pig gastric mucosa ("*Gastrospirillum suis*"). *J Med Microbiol* **33**, 61-66.
- Menz, G. & Hazell, S. (1994). The urea cycle of *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* **89**, 1289.
- Menz, G., Hazell, S. & Burns, B. (1993). Glucose utilization and lactate production of *Helicobacter pylori*. *J Gen Microbiol* **139**, 3023-3028.

- Menz, G., Hazell, S. & Burns, B. (1994a). The Entner Doudoroff pathway in *Helicobacter pylori*. *Arch Biochem Biophys* **312**, 349-356.
- Menz, G., Jimenez, B., Hazell, S., Gero, A. & O'Sullivan, W. (1994b). Salvage synthesis of pyrimidine nucleotides by *Helicobacter pylori*. *J Appl Bacteriol* **77**, 1-8.
- Mentis, A., Blackwell, C. C., Weir, D. M., Spiliadis, C., Dailianas, A. & Skandalis, N. (1991). ABO blood group, secretor status and detection of *Helicobacter pylori* among patients with gastric or duodenal ulcers. *Epidemiol Infect* **106**, 221-9.
- Miehlke, S., Kibler, K., Kim, J. G., Figura, N., Small, S. M., Graham, D. Y. & Go, M. F. (1996). Allelic variation in the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* obtained from Korea compared to the United States. *Am J Gastroenterol* **91**, 1322-5.
- Mihok, S., Otieno, L. H. & Darji, N. (1990). Population genetics of *Trypanosoma brucei* and the epidemiology of human sleeping sickness in the Lambwe Valley, Kenya. *Parasitology* **100 Pt 2**, 219-233.
- Mobley, H., Island, M. & Hausinger, R. (1995). Molecular biology of ureases. *Microbiol Rev* **59**, 451-480.
- Monteiro, L., Cabrita, J. & Mégraud, F. (1997). Evaluation of performances of three DNA enzyme immunoassays for detection of *Helicobacter pylori* PCR products from biopsy specimens. *J Clin Microbiol* **35**, 2931-2936.
- Morales-Espinosa, R., Castillo-Rojas, G., Gonzalez-Valencia, G., Ponce de Leon, S., Cravioto, A., Atherton, J. C. & Lopez-Vidal, Y. (1999). Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. *J Clin Microbiol* **37**, 3001-3004.
- Moran, A. (1995). Cell surface characteristics of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Immunol* **10**, 271-280.
- Morgan, D. D. & Owen, R. J. (1990). Use of DNA restriction endonuclease digest and ribosomal RNA gene probe patterns to fingerprint *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* isolated from human and animal hosts. *Mol Cell Probes* **4**, 321-334.
- Mukhopadhyay, A. K., Kersulyte, D., Jeong, J. Y., Datta, S., Ito, Y., Chowdhury, A., Chowdhury, S., Santra, A., Bhattacharya, S. K., Azuma, T., Nair, G. B. & Berg, D. E. (2000). Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. *J Bacteriol* **182**, 3219-3227.
- Murphy, R., Sites, J., Buth, D. & Haufler, C. (1990). Proteins I: isoenzymes electrophoresis. In *Molecular Systematics* (ed. D. Hillis and C. Morritz), pp. 45-126.
- Musser, J. & Selander, R. (1986). Genetic analysis of natural populations of *Staphylococcus aureus*. In *Molecular biology of the staphylococci* (ed. R. Novick and R. Skurray), pp. 59-67. VCH Publishers, New York.
- Musser, J. M., Hauser, A. R., Kim, M. H., Schlievert, P. M., Nelson, K. & Selander, R. K. (1991). *Streptococcus pyogenes* causing toxic-shock-like syndrome and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2668-2672.
- Musser, J. M., Kroll, J. S., Granoff, D. M., Moxon, E. R., Brodeur, B. R., Campos, J., Dabernat, H., Frederiksen, W., Hamel, J., Hammond, G. & et al. (1990). Global genetic structure and molecular epidemiology of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Rev Infect Dis* **12**, 75-111.
- Nedenskov-Sorensen, P., Bukholm, G. & Bovre, K. (1990). Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J Infect Dis* **161**, 365-366.
- Negrini, R., Lisato, L., Zanella, I., Cavazzini, L., Gullini, S., Villanacci, V., Poiesi, C., Albertini, A. & Ghielmi, S. (1991). *Helicobacter pylori* infection induces antibodies cross-reacting with human gastric mucosa. *Gastroenterol* **101**, 437-445.

- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small sample of individuals. *Genetics* **89**, 583-590.
- Nwokolo, C. U., Bickley, J., Attard, A. R., Owen, R. J., Costas, M. & Fraser, I. A. (1992). Evidence of clonal variants of *Helicobacter pylori* in three generations of a duodenal ulcer disease family. *Gut* **33**, 1323-1327.
- Ochman, H. & Selander, R. (1984). Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* **157**, 690-693.
- O'Rourke, J., Lee, A. & Fox, J. (1992). An ultrastructural study of *Helicobacter mustelae* and evidence of a specific association with gastric mucosa. *J Med Microbiol* **36**, 420-427.
- O'Rourke, M. & Stevens, E. (1993). Genetic structure of *Neisseria gonorrhoeae* populations: a non-clonal pathogen. *J Gen Microbiol* **139**, 2603-2611.
- Ørskov, F. & Ørskov, I. (1983). Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the Enterobacteriaceae and other Bacteria. *J Infect Dis* **148**, 346-357.
- Osato, M. S., Ayub, K., Le, H. H., Reddy, R. & Graham, D. Y. (1998). Houseflies are an unlikely reservoir or vector for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* **36**, 2786-2788.
- Oudbier, J. H., Langenberg, W., Rauws, E. A. & Bruin-Mosch, C. (1990). Genotypical variation of *Campylobacter pylori* from gastric mucosa. *J Clin Microbiol* **28**, 559-565.
- Oury, B., Dutrait, N., Bastrenta, B. & Tibayrenc, M. (1997). *Trypanosoma cruzi*: evaluation of a RAPD synapomorphic fragment as a species-specific DNA probe. *J Parasitol* **83**, 52-57.
- Owen, R. J. (1998). *Helicobacter* - species classification and identification. *Br Med Bull* **54**, 17-30.
- Owen, R. J., Bickley, J., Moreno, M., Costas, M. & Morgan, D. R. (1991). Biotype and macromolecular profiles of cytotoxin-producing strains of *Helicobacter pylori* from antral gastric mucosa. *FEMS Microbiol Lett* **63**, 199-204.
- Owen, R. J., Hunton, C., Bickley, J., Moreno, M. & Linton, D. (1992). Ribosomal RNA gene restriction patterns of *Helicobacter pylori*: analysis and appraisal of *HaeIII* digests as a molecular typing system. *Epidemiol Infect* **109**, 35-47.
- Pace, N. R., Olsen, G. J. & Woese, C. R. (1986). Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* **45**, 325-326.
- Page, R. (1996). Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* **12**, 357-358.
- Pan, Z. J., Berg, D. E., van der Hulst, R. W., Su, W. W., Raudonikiene, A., Xiao, S. D., Dankert, J., Tytgat, G. N. & van der Ende, A. (1998). Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct *vacA* alleles in *Helicobacter pylori* from China. *J Infect Dis* **178**, 220-226.
- Pan, Z. J., van der Hulst, R. W., Feller, M., Xiao, S. D., Tytgat, G. N., Dankert, J. & van der Ende, A. (1997). Equally high prevalences of infection with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. *J Clin Microbiol* **35**, 1344-1347.
- Parsonnet, J. (1995). The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* **9**, 45-51.
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Orentreich, N. & Vogelman, H. (1997). Risk for gastric cancer in people with *CagA* positive or *CagA* negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **40**, 297-301.
- Paster, B. J., Lee, A., Fox, J. G., Dewhirst, F. E., Tordoff, L. A., Fraser, G. J., O'Rourke, J. L., Taylor, N. S. & Ferrero, R. (1991). Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 31-38.

- Patterson, M. M., Schrenzel, M. D., Feng, Y., Xu, S., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Thibodeau, S. A., Versalovic, J. & Fox, J. G. (2000). *Helicobacter aurati* sp. nov., A urease-positive *Helicobacter* species cultured from gastrointestinal tissues of syrian hamsters. *J Clin Microbiol* **38**, 3722-3728.
- Pattison, C. & Marshall, B. (1997). Proposed link between *Helicobacter pylori* and sudden infant death syndrome. *Med Hypotheses* **49**, 365-369.
- Peek, R. M., Jr., Miller, G. G., Tham, K. T., Perez-Perez, G. I., Cover, T. L., Atherton, J. C., Dunn, G. D. & Blaser, M. J. (1995a). Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *J Clin Microbiol* **33**, 28-32.
- Peek, R. M., Jr., Miller, G. G., Tham, K. T., Perez-Perez, G. I., Zhao, X., Atherton, J. C. & Blaser, M. J. (1995b). Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest* **73**, 760-770.
- Peek, R. M., Jr., Thompson, S. A., Donahue, J. P., Tham, K. T., Atherton, J. C., Blaser, M. J. & Miller, G. G. (1998). Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians* **110**, 531-544.
- Pellicano, R., Mladenova, I., Broutet, N., Salmi, L. R. & Mégraud, F. (1999). Is there an association between *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease? *European J Epidemiol* **15**, 611-619.
- Perez-Perez, G. & Blaser, M. (1987). Conservation and diversity of *Campylobacter pyloridis* major antigens. *Infect Immun* **55**, 1256-1263.
- Perrier, X., Flori, A. & Bonnot, F. (1999). Les méthodes d'analyse des données. In *Diversité génétique des plantes tropicales cultivées* (ed. P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier and J. Glaszmann), pp. 43-76, CIRAD Montpellier, France.
- Picard-Pasquier, N., Ouagued, M., Picard, B., Goullet, P. & Krishnamoorthy, R. (1989). A simple, sensitive method of analyzing bacterial ribosomal DNA polymorphism. *Electrophoresis* **10**, 186-189.
- Pounder, R. & Ng, D. (1995). The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* **9** (suppl2), 33-39.
- Rautelin, H., Blomberg, B., Fredlund, H., Jarnerot, G. & Danielsson, D. (1993). Incidence of *Helicobacter pylori* strains activating neutrophils in patients with peptic ulcer disease. *Gut* **34**, 599-603.
- Richardson, B. J., Baverstock, P. R. & Adams, M. (1986). *Allozyme electrophoresis : a handbook for animal systematics and population studies*. Academic Press Australia.
- Rudi, J., Kolb, C., Maiwald, M., Kuck, D., Sieg, A., Galle, P. R. & Stremmel, W. (1998). Diversity of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol* **36**, 944-948.
- Saborio, G., Castillo, G., Luqueno, V., Perea, L., Lopez-Vidal, Y. & Ruiz-Palacios, G. (1994). Excretion of *Helicobacter pylori* in human feces detected by PCR. *Am J Gastroenterol* **89**, 1308.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Salaün, L., Audibert, C., Le Lay, G., Burucoa, C., Fauchère, J. L. & Picard, B. (1998). Panmictic structure of *Helicobacter pylori* demonstrated by the comparative study of six genetic markers. *FEMS Microbiol Lett* **161**, 231-9.
- Salomon, H. (1896). Uber das spirillum des saugetierrmagens und sein verhalten zu den belegzellen. *Zbl F Bakt* **19**, 433-441.
- Sasaki, K., Tajiri, Y., Sata, M., Fujii, Y., Matsubara, F., Zhao, M. G., Shimizu, S., Toyonaga, A. & Tanikawa, K. (1999). *Helicobacter pylori* in the natural environment. *Scand J Infect Dis* **31**, 275-280.

- Saunders, N. J., Peden, J. F., Hood, D. W. & Moxon, E. R. (1998). Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome. *Mol Microbiol* **27**, 1091-1098.
- Scherrer, B. (1984). *Biostatistique*, Gaëtan Morin edition, Boucherville, Québec, Canada.
- Schmid, E. N., von Recklinghausen, G. & Ansorg, R. (1990). Bacteriophages in *Helicobacter (Campylobacter) pylori*. *J Med Microbiol* **32**, 101-104.
- Schmitt, W. & Haas, R. (1994). Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol* **12**, 307-319.
- Schmitt, W., Odenbreit, S., Heuermann, D. & Haas, R. (1995). Cloning of the *Helicobacter pylori* *recA* gene and functional characterization of its product. *Mol Gen Genet* **248**, 563-572.
- Segal, E. D., Falkow, S. & Tompkins, L. S. (1996). *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1259-1264.
- Selander, R. & Levin, B. (1980). Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* **210**, 245-247.
- Selander, R., Li, J. & Nelson, K. (1996). Evolutionary analysis of *Salmonella enterica*. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology 2nd ed* (ed. F. Neidhardt, R. Curtiss III, J. Ingraham, E. Lin, K. Low, B. Magasanik, W. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and M. Umberger), pp. 2692-2707. ASM Press, Washington, DC.
- Selander, R., McKinney, R., Whittam, T., Bibb, W., Brenner, D., Nolte, F. & Pattison, P. (1985). Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **163**, 1021-1037.
- Sevin, E., Soussy, C. J. & Tankovic, J. (1998). *Helicobacter pylori* en 1998. *Feuillets de Biologie* **34**, 15-28.
- Shahamat, M., Mai, U., Paszko-Kolva, H., Kessel, M. & Colwell, R. (1993). Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1231-1235.
- Shen, Z., Fox, J. G., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Foltz, C. J., Yan, L., Shames, B. & Perry, L. (1997). *Helicobacter rodentium* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from laboratory mice. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 627-634.
- Sherbourne, R. & Taylor, D. (1995). *Helicobacter pylori* expresses a complex surface carbohydrate, Lewis X. *Infect Immun* **63**, 4564-4568.
- Simmons, J. H., Riley, L. K., Besch-Williford, C. L. & Franklin, C. L. (2000). *Helicobacter mesocricetorum* sp. nov., A novel *Helicobacter* isolated from the feces of Syrian hamsters. *J Clin Microbiol* **38**, 1811-1817.
- Simor, A. E., Shames, B., Drumm, B., Sherman, P., Low, D. E. & Penner, J. L. (1990). Typing of *Campylobacter pylori* by bacterial DNA restriction endonuclease analysis and determination of plasmid profile. *J Clin Microbiol* **28**, 83-86.
- Slater, E., Owen, R. J., Williams, M. & Pounder, R. E. (1999). Conservation of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*: associations with vacuolating cytotoxin allele and IS605 diversity. *Gastroenterology* **117**, 1308-1315.
- Smeets, L. C., Bijlsma, J. J., Kuipers, E. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. & Kusters, J. G. (2000). The *dprA* gene is required for natural transformation of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**, 99-102.
- Sneath, P. & Sokal, R. (1973). The principle and practice of numerical classification. In *Numerical Taxonomy* (ed. D. Kennedy and R. Park), San Francisco.

- Sobhani, I., Vallot, T. & Mignon, M. (1995). *Helicobacter pylori*, a rediscovered bacterium. Implication in gastroduodenal diseases. *La Presse Medicale* **24**, 67-73, 75-6, 78-9.
- Solnick, J., Josenhans, C., Suerbaum, S., Tompkins, L. & Labigne, A. (1995). Construction and characterization of an isogenic urease-negative mutant of *Helicobacter mustelae*. *Infect Immun* **63**, 3718-3721.
- Souza, V., Rocha, M., Valera, A. & Eguiarte, L. E. (1999). Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3373-85.
- Stanley, J., Linton, D., Burnens, A. P., Dewhirst, F. E., On, S. L., Porter, A., Owen, R. J. & Costas, M. (1994). *Helicobacter pullorum* sp. nov.-genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiology* **140**, 3441-3449.
- Stanley, J., Linton, D., Burnens, A. P., Dewhirst, F. E., Owen, R. J., Porter, A., On, S. L. & Costas, M. (1993). *Helicobacter canis* sp. nov., a new species from dogs: an integrated study of phenotype and genotype. *J Gen Microbiol* **139**, 2495-2504.
- Strobel, S., Bereswill, S., Balig, P., Allgaier, P., Sonntag, H. G. & Kist, M. (1998). Identification and analysis of a new *vacA* genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient groups in Germany. *J Clin Microbiol* **36**, 1285-1289.
- Stull, T. L., LiPuma, J. J. & Edlind, T. D. (1988). A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *J Infect Dis* **157**, 280-286.
- Suerbaum, S. & Josenhans, C. (1999). Virulence factors of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development. *Mol Med Today* **5**, 32-39.
- Suerbaum, S., Josenhans, C. & Labigne, A. (1993). Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flaB* flagellin genes and construction of *Helicobacter pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol* **175**, 3278-3288.
- Suerbaum, S., Smith, J. M., Bapumia, K., Morelli, G., Smith, N. H., Kunstmann, E., Dyrek, I. & Achtman, M. (1998). Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12619-12624.
- Takala, A. K., Vuopio-Varkila, J., Tarkka, E., Leinonen, M. & Musser, J. M. (1996). Subtyping of common pediatric pneumococcal serotypes from invasive disease and pharyngeal carriage in Finland. *J Infect Dis* **173**, 128-135.
- Tanahashi, T., Kita, M., Kodama, T., Sawai, N., Yamaoka, Y., Mitsufuji, S., Katoh, F. & Imanishi, J. (2000). Comparison of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and PCR-direct sequencing methods for differentiating *Helicobacter pylori* *ureB* gene variants. *J Clin Microbiol* **38**, 165-169.
- Taylor, D. E., Eaton, M., Chang, N. & Salama, S. M. (1992). Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *J Bacteriol* **174**, 6800-6806.
- Taylor, D. E., Ge, Z., Purych, D., Lo, T. & Hiratsuka, K. (1997). Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2621-2628.
- Taylor, D. E., Rasko, D. A., Sherburne, R., Ho, C. & Jewell, L. D. (1998). Lack of correlation between Lewis antigen expression by *Helicobacter pylori* and gastric epithelial cells in infected patients. *Gastroenterology* **115**, 1113-1122.
- Taylor, N. S., Fox, J. G., Akopyants, N. S., Berg, D. E., Thompson, N., Shames, B., Yan, L., Fontham, E., Janney, F., Hunter, F. M. & et al. (1995). Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* **33**, 918-923.

- Tee, W., Lambert, J., Smallwood, R., Schembri, M., Ross, B. C. & Dwyer, B. (1992). Ribotyping of *Helicobacter pylori* from clinical specimens. *J Clin Microbiol* **30**, 1562-1567.
- Tee, W., Lambert, J. R. & Dwyer, B. (1995). Cytotoxin production by *Helicobacter pylori* from patients with upper gastrointestinal tract diseases. *J Clin Microbiol* **33**, 1203-1205.
- Tenehaus, M. & Young, F. (1985). An analysis and synthesis of multiple correspondence analysis, optimal scaling, dual scaling, homogeneity analysis and other methods for quantifying categorical multivariate data. *Psychometrika* **50**, 91-119.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S. & Olivier, J. (1997). ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing* **7**, 75-83.
- Thomas, G., Gibson, J., Darboe, M., Dale, A. & Weaver, L. (1992). Isolation of *Helicobacter pylori* from human feces. *Lancet* **340**, 1194-1195.
- Tibayrenc, M. (1995a). Population genetics and strain typing of microorganisms: how to detect departures from panmixia without individualizing alleles and loci. *C R Acad Sci III* **318**, 135-139.
- Tibayrenc, M. (1995b). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasitol* **36**, 47-115.
- Tibayrenc, M. (1996). Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. *Annu Rev Microbiol* **50**, 401-429.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F. & Ayala, F. J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2414-2418.
- Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabé, C., Guerrini, F., Skarecky, D. & Ayala, F. J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1335-1339.
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A. & Ayala, F. (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **83**, 115-119.
- Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., Hickey, E. K., Berg, D. E., Gocayne, J. D., Utterback, T. R., Peterson, J. D., Kelley, J. M., Cotton, M. D., Weidman, J. M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W. S., Borodovsky, M., Karp, P. D., Smith, H. O., Fraser, C. M. & Venter, J. C. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539-547.
- Trivett-More, N., Rawlinson, W., Yuen, M. & Gilbert, G. (1997). *Helicobacter westmeadii* sp nov., a new species isolated from blood cultures of two AIDS patients. *J Clin Microbiol* **35**, 1144-1150.
- Truper, H. & De Clari, L. (1997). Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". *Int J Syst Bacteriol* **47**, 908-909.
- Tsuda, M., Karita, M. & Nakazawa, T. (1993). Genetic transformation in *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol* **37**, 85-89.
- Tummuru, M. K., Cover, T. L. & Blaser, M. J. (1993). Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* **61**, 1799-1809.
- Tummuru, M. K., Cover, T. L. & Blaser, M. J. (1994). Mutation of the cytotoxin-associated *cagA* gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **62**, 2609-2613.

- Tummuru, M. K., Sharma, S. A. & Blaser, M. J. (1995). *Helicobacter pylori* *picB*, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* **18**, 867-876.
- Uriel, J. (1961). Caractérisation des cholinestérases et d'autres estérases carboxyliques après électrophorèse et immuno-électrophorèse en gélose (application à l'étude des estérases du sérum humain normal). *Ann Inst Pasteur* **101**.
- Uriel, J. (1966). Method of electrophoresis in acrylamide-agarose gels. *Bull Soc Chim Biol* **48**, 969-982.
- Vaira, D., D'Anastasio, C., Holton, J., Dowsett, J., Londei, M., Bertoni, F., Beltrandi, E., Grauenfels, P., Salmon, P. & Gandolfi, L. (1988). *Campylobacter pylori* in abattoir workers : is it a zoonosis ? *Lancet* **2**, 725-726.
- Valentine, J. L., Arthur, R. R., Mobley, H. L. & Dick, J. D. (1991). Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29**, 689-695.
- van der Ende, A., Pan, Z. J., Bart, A., van der Hulst, R. W., Feller, M., Xiao, S. D., Tytgat, G. N. & Dankert, J. (1998). *cagA*-positive *Helicobacter pylori* populations in China and The Netherlands are distinct. *Infect Immun* **66**, 1822-1826.
- van der Ende, A., Rauws, E. A., Feller, M., Mulder, C. J., Tytgat, G. N. & Dankert, J. (1996). Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from members of a family with a history of peptic ulcer disease. *Gastroenterology* **111**, 638-647.
- van der Zee, A., Mooi, F., Van Embden, J. & Musser, J. (1997). Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. *J Bacteriol* **179**, 6609-6617.
- Van Doorn, L. J., Figueiredo, C., Mégraud, F., Pena, S., Midolo, P., Queiroz, D. M., Carneiro, F., Vanderborght, B., Pegado, M. D., Sanna, R., De Boer, W., Schneeberger, P. M., Correa, P., Ng, E. K., Atherton, J., Blaser, M. J. & Quint, W. G. (1999). Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **116**, 823-830.
- van Doorn, L. J., Figueiredo, C., Sanna, R., Blaser, M. J. & Quint, W. G. (1999a). Distinct variants of *Helicobacter pylori* *cagA* are associated with *vacA* subtypes. *J Clin Microbiol* **37**, 2306-2311.
- van Doorn, L. J., Figueiredo, C., Sanna, R., Pena, S., Midolo, P., Ng, E. K., Atherton, J. C., Blaser, M. J. & Quint, W. G. (1998a). Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* *vacA*. *J Clin Microbiol* **36**, 2597-2603.
- van Doorn, L. J., Figueiredo, C., Sanna, R., Plaisier, A., Schneeberger, P., de Boer, W. & Quint, W. (1998b). Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **115**, 58-66.
- van Doorn, N. E., Namavar, F., van Doorn, L. J., Durrani, Z., Kuipers, E. J. & Vandenbroucke-Grauls, C. M. (1999b). Analysis of *vacA*, *cagA*, and IS605 genotypes and those determined by PCR amplification of DNA between repetitive sequences of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with nonulcer dyspepsia or mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Clin Microbiol* **37**, 2348-2349.
- van Soolingen, D., Qian, L., de Haas, P. E., Douglas, J. T., Traore, H., Portaels, F., Qing, H. Z., Enkhsaikan, D., Nymadawa, P. & van Embden, J. D. (1995). Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* **33**, 3234-3238.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. & De Ley, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 88-103.
- Vandamme, P., Harrington, C., Jalava, K. & On, S. (2000). Misidentifying *Helicobacter*. the *Helicobacter cinaedi* example. *J Clin Microbiol* **38**, 2261-2266.

- Versalovic, J., Osato, M. S., Spakovsky, K., Dore, M. P., Reddy, R., Stone, G. G., Shortridge, D., Flamm, R. K., Tanaka, S. K. & Graham, D. Y. (1997). Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother* **40**, 283-286.
- Vincent, P. (1996). Acquisition et transmission de l'infection à *Helicobacter pylori*. In *Helicobacter pylori*, vol. 1 (ed. F. Mégraud and H. Lamouliatte), pp. 101-117. Elsevier, Paris.
- Wang, H. J., Kuo, C. H., Yeh, A. A., Chang, P. C. & Wang, W. C. (1998). Vacuolating toxin production in clinical isolates of *Helicobacter pylori* with different *vacA* genotypes. *J Infect Dis* **178**, 207-12.
- Wang, J. F., Caugant, D. A., Li, X., Hu, X., Poolman, J. T., Crowe, B. A. & Achtman, M. (1992). Clonal and antigenic analysis of serogroup A *Neisseria meningitidis* with particular reference to epidemiological features of epidemic meningitis in the People's Republic of China. *Infect Immun* **60**, 5267-5282.
- Ward, J., Fox, J., Anver, M., Haines, D., George, C., Collins, M., Gorelick, P., Nagashima, K., Gonda, M., Gilden, R., Tully, J., Russell, R., Benveniste, R., Paster, B., Dewhirst, F., Donovan, J., Anderson, L. & Rice, J. (1994). Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. *J Nat cancer Inst* **86**, 1222-1227.
- Warren, J. & Marshall, B. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **1**, 1273-1275.
- Wasem, C. F., McCarthy, C. M. & Murray, L. W. (1991). Multilocus enzyme electrophoresis analysis of the *Mycobacterium avium* complex and other mycobacteria. *J Clin Microbiol* **29**, 264-71.
- Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* **18**, 7213-7218.
- West, A., Millar, M. & Tompkins, D. (1992). Effect of physical environment on survival of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* **45**, 228-231.
- Whittam, T., Ochman, H. & Selander, R. (1983). Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 1751-1755.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**, 6531-6535.
- Wise, M. G., Shimkets, L. J. & McArthur, J. V. (1995). Genetic structure of a lotic population of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1791-1798.
- Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P. F., Telford, J. L., Figura, N., Rappuoli, R. & Covacci, A. (1995). Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* **63**, 94-98.
- Yamaoka, Y., Kodama, T., Kita, M., Imanishi, J., Kashima, K. & Graham, D. Y. (1998). Relationship of *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* to *cagA* status, cytotoxin production, and clinical outcome. *Helicobacter* **3**, 241-253.
- Yamaoka, Y., Kodama, T., Kita, M., Imanishi, J., Kashima, K. & Graham, D. Y. (1999). Relation between clinical presentation, *Helicobacter pylori* density, interleukin 1 beta and 8 production, and *cagA* status. *Gut* **45**, 804-811.
- Yamaoka, Y., Malaty, H. M., Osato, M. S. & Graham, D. Y. (2000a). Conservation of *Helicobacter pylori* genotypes in different ethnic groups in Houston, Texas. *J Infect Dis* **181**, 2083-2086.
- Yamaoka, Y., Osato, M. S., Sepulveda, A. R., Guttierrez, O., Figura, N., Kim, J. G., Kodama, T., Kashima, K. & Graham, D. Y. (2000b). Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori*: separation of *H-pylori* from East Asian and non-Asian countries. *Epidemiol Infect* **124**, 91-96.

- Zhang, Q., Nakshabendi, I., Mokhashi, M., Dawoder, J., Gemmell, C. & Russell, R. (1996). Association of cytotoxin production and neutrophil activation by strains of *Helicobacter pylori* isolated from patients with peptic ulceration and chronic gastritis. *Gut* **38**, 841-845.
- Zhang, Q., Tibayrenc, M. & Ayala, F. J. (1988). Linkage disequilibrium in natural populations of *Trypanosoma cruzi* (flagellate), the agent of Chagas' disease. *J Protozool* **35**, 81-85.

ANNEXES

Annexe 1 : Les 87 souches de *Helicobacter pylori* considérées dans l'étude.

Souche	Origine géographique	Origine pathologique	Année de prélèvement	Age du patient	Sexe du patient
CIP101260 *	France	gastrite	1985	n.d.	n.d.
SS1 *	Australie	ulcère	1995	36	f
ATCC43579 *	Etats Unis	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
26695 *	Grande-Bretagne	gastrite	avant 1987	n.d.	n.d.
J99 *	Etats Unis	ulcère	1994	n.d.	n.d.
Tx30a *	Etats Unis	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
84-183 *	Etats Unis	n.d.	1984	n.d.	n.d.
85-456 *	Etats Unis	n.d.	1985	n.d.	n.d.
86-338 *	Etats Unis	n.d.	1986	n.d.	n.d.
B30	France (Brest)	gastrite	1995	57	m
B33	France (Brest)	ulcère	1995	48	m
B46	France (Brest)	gastrite	1995	43	m
B53	France (Brest)	ulcère	1996	76	f
B81	France (Brest)	ulcère	1996	62	m
B101	France (Brest)	ulcère	1997	59	f
B102	France (Brest)	ulcère	1997	45	m
B104	France (Brest)	ulcère	1997	71	m
B109	France (Brest)	ulcère	1997	48	m
B110	France (Brest)	ulcère	1997	31	m
B123	France (Brest)	gastrite	1997	40	m
B129	France (Brest)	gastrite	1997	46	m
B133	France (Brest)	gastrite	1997	28	f
B136	France (Brest)	gastrite	1997	83	f
B139	France (Brest)	n.d.	1997	54	m
B147	France (Brest)	gastrite	1997	77	f
B148	France (Brest)	gastrite	1997	62	f
B166	France (Brest)	gastrite	1997	61	m
B171	France (Brest)	gastrite	1997	52	m
B174	France (Brest)	gastrite	1997	34	m
B189	France (Brest)	gastrite	1997	63	m
B207	France (Brest)	gastrite	1997	58	m
B213	France (Brest)	n.d.	1997	53	m
B214	France (Brest)	cancer	1998	80	m
B225	France (Brest)	cancer	1997	74	f
B229	France (Brest)	cancer	1997	54	m
B252	France (Brest)	gastrite	1998	57	f
P1	France (Poitiers)	gastrite	1992	32	m
P5	France (Poitiers)	gastrite	1992	32	m
P6avtt	France (Poitiers)	gastrite	1992	33	f
P6aptt	France (Poitiers)	gastrite	1992	33	f
P7	France (Poitiers)	gastrite	1992	46	m
P14	France (Poitiers)	ulcère	1992	50	f
P15	France (Poitiers)	gastrite	1992	84	f
P17	France (Poitiers)	gastrite	1993	41	m
P19	France (Poitiers)	gastrite	1993	38	m
P20	France (Poitiers)	gastrite	1993	61	m
P24	France (Poitiers)	ulcère	1993	71	f
P25	France (Poitiers)	gastrite	1993	46	m
P26	France (Poitiers)	gastrite	1993	81	f
P34	France (Poitiers)	gastrite	1993	69	f
P41	France (Poitiers)	ulcère	1993	17	m
P45	France (Poitiers)	gastrite	1994	78	m
P48	France (Poitiers)	gastrite	1994	78	f
P54	France (Poitiers)	ulcère	1994	29	m
P55	France (Poitiers)	gastrite	1994	51	m
P91	France (Poitiers)	gastrite	1995	52	m
P98	France (Poitiers)	ulcère	1995	31	m
P122	France (Poitiers)	ulcère	1996	54	m

Suite page suivante

Souche	Origine géographique	Origine pathologique	Année de prélèvement	Age du patient	Sexe du patient
P123	France (Poitiers)	ulcère	1996	69	f
P124	France (Poitiers)	ulcère	1996	57	m
P127	France (Poitiers)	gastrite	1996	76	f
P130	France (Poitiers)	n.d.	1996	n.d.	n.d.
P133	France (Poitiers)	ulcère	1996	n.d.	n.d.
P136	France (Poitiers)	gastrite	1997	n.d.	n.d.
P141	France (Poitiers)	gastrite	1997	n.d.	n.d.
P145	France (Poitiers)	gastrite	1997	n.d.	n.d.
VZ1	Venezuela	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VZ2	Venezuela	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VZ3	Venezuela	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VZ5	Venezuela	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VZ17	Venezuela	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VZ21	Venezuela	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VZ435	Venezuela	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VZ503	Venezuela	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HK2559	Hong-Kong	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HK2560	Hong-Kong	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HK2561	Hong-Kong	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CH95-10	Chine	n.d.	1995	n.d.	n.d.
CH95-12	Chine	n.d.	1995	n.d.	n.d.
JP96-9	Japon	n.d.	1996	n.d.	n.d.
JP98-8	Japon	n.d.	1998	n.d.	n.d.
JP98-10	Japon	n.d.	1998	n.d.	n.d.
JP98-25	Japon	n.d.	1998	n.d.	n.d.
JP98-716	Japon	n.d.	1998	n.d.	n.d.
IN97-645	Inde	n.d.	1997	n.d.	n.d.
IN97-650	Inde	n.d.	1997	n.d.	n.d.
IN97-762	Inde	n.d.	1997	n.d.	n.d.

Notes :

Les 87 souches de *H. pylori* de l'étude ont été isolées à partir de biopsies pratiquées chez autant de patients, à l'exception des souches P6avtt et P6aptt qui ont été isolées à partir de biopsies réalisées chez un même patient, respectivement avant puis après antibiothérapie dirigée contre l'infection à *H. pylori* (échec de l'éradication de *H. pylori*).

* indique les souches de référence (notées CIP, SYDN, ATCC, 26695, J99, Tx30, 84-183, US456 et 86338 sur les figures)

m : masculin, f : féminin

n.d. : non déterminé.

Annexe 2 : Les 83 amorces décimériques testées pour l'étude par Random Amplified Polymorphic DNA

Kit A	Kit B	Kit F	Kit N	Kit R	Kit U
A-01	B-01 *		N-01	R-01	
A-02		F-02	N-02		U-02
A-03	B-03	F-03			U-03
A-04	B-04	F-04	N-04 *		
A-05	B-05 *	F-05	N-05 *		U-05
A-06	B-06				
A-07	B-07	F-07 *	N-07		U-07
A-08	B-08	F-08	N-08		
A-09	B-09	F-09	N-09 *		
A-10	B-10	F-10		R-10 *	U-10
A-11 *	B-11	F-11			U-11
A-12	B-12	F-12			U-12 *
A-13 *		F-13	N-13	R-13	U-13
A-14		F-14	N-14		
A-15	B-15 *	F-15	N-15	R-15	
A-16	B-16	F-16		R-16	U-16
A-17 *	B-17	F-17	N-17		U-17
A-18	B-18	F-18	N-18		
A-19		F-19	N-19		
A-20		F-20	N-20	R-20	

Notes :

* amorces retenues pour l'étude par RAPD

La séquence de chacune des amorces est disponible sur le site :

<http://www.operon.com/stock/10merkitemenu.php>

Annexe 3 : Les 30 systèmes enzymatiques testés pour l'étude par Multilocus Enzyme Electrophoresis

Enzymes	Abbréviations	Code EC	Support de migration
Aconitase	ACON	EC 4.2.1.3	a
Adénylate kinase *	AK	EC 2.7.4.3	a*+b
Alanine aminotransférase	ALAT	EC 2.6.1.2	a
Alanine déshydrogénase	alaDH	EC 1.4.1.1	a
Alcool déshydrogénase	ADH	EC 1.1.1.1	a
Aldolase	ALD	EC 4.1.2.13	a
Anhydrase carbonique	CA	EC 4.2.1.1	a
Aspartate amino-transférase *	GOT	EC 2.6.1.1	a*
Diaphorase (NADH) *	DIA	EC 1.6.2.2	a*
Estérases *	EST	EC 3.1.1.1	a+b*
Fructose 1-6 bisphosphatase	FDP	EC 3.1.3.11	a
Fumarate hydratase	FUM	EC 4.2.1.2	a
Glucose 6 phosphate deshydrogénase *	G6PD	EC 1.1.1.49	a*+b
Glucose phosphate isomérase	GPI	EC 5.3.1.9	a
Glutamate deshydrogénase (NADP+) *	GDH	EC 1.4.1.4	a*+b
Glyceraldehyde 3 phosphate deshydrogénase	GAPD	EC 1.2.1.12	a
Glycerol 3 phosphate deshydrogénase	αGPD	EC 1.1.1.18	a
Hexokinase	HK	EC 2.7.1.1	a
Isocitrate deshydrogénase *	IDH	EC 1.1.1.42	a*+b
Lactate deshydrogénase	LDH	EC 1.1.1.27	a+b
Leucine aminopeptidase	LAP	EC 3.4.11.1	a
Malate deshydrogénase	MDH	EC 1.1.1.37	a+b
Malate enzyme	ME	EC 1.1.1.40	a
Mannose 6 phosphate isomérase	MPI	EC 5.3.1.8	a
Nucleoside phosphorylase *	NP	EC 2.4.2.1	a*+b
Peptidases			
Peptidase leu-leu-leu *	PEP1	EC 3.4.22.3	a*
Peptidase leu-ala	PEP2	EC 3.4.13.°	a
Peptidase val-leu	PEP val-leu	EC 3.4.11.4	a
Phosphatase alcaline	ACP	EC 3.1.3.2	a+b
Phosphoglucomutase	PGM	EC 2.7.5.1	a
6 Phosphogluconate deshydrogénase	6PGD	EC 1.1.1.44	a
Superoxyde dismutase *	SOD	EC 1.15.1.1	a*+b

Notes :

* enzymes et supports de migration retenus pour l'étude par MLEE

EC : Enzyme Collection

Support de migration :

(a) migration en support acétate de cellulose

(b) migration en gel d'acrylamide-agarose

Annexe 4a : Données de PCR-RFLP obtenues sur les gènes *ureA-ureB* et *flaA* pour les 87 souches de *Helicobacter pylori* de l'étude.

S.L	<i>ureA-ureB/HaeIII</i>	<i>ureA-ureB/NdeII</i>	<i>flaA/HaeIII</i>	<i>flaA/NdeII</i>
B30	4-11-13-16	9-10-12-14	2-5	4-8-10
B33	8-11-13-14-16	4-9-10-12-14	2-5	2-8-10
B46	4-7-11	4-9-10-12-14	2-5	4-8-12-13
B53	8-11-13-14-16	4-9-10-11-12-14	2-5	4-9
B81	2-13-16	4-8-9-11-12-14	2-5	4-9-10-13
B101	5-8-9-11-16	4-9-10-12-13-14	3-5	4-9-10-12
B102	11-13-15-16	4-9-10-12-14	2-5	4-9-10
B104	4-11-13-16	4-9-10-12-14	2-5	2-4
B109	5-8-11-12-15-16-17	4-7-10-12-13-14	3-5	4-8-10-13
B110	7-9-11-13	4-9-10-12-14	2-5	6-9-10
B123	3-11-13-14-15-16	4-8-9-10-12-14	2-5	2-9
B129	5-8-11-16	4-10-12-14	2-5	4-9-10-12
B133	4-7-11	4-9-10-11-12-13-14	3-5	4-8-10
B136	4-8-11-13-16	4-9-10-12-14	2-5	4-9-10-13
B139	11-13-14-15-16-17	4-10-11-12	2-5	2-9-10
B147	10-11-13-14-16	4-9-10-11-12-14	5-6-9	4-5-11
B148	8-11-13-16	4	5-6-9	4
B166	4-11-13-16	4-9-10-12-14	2-5	4-8-10-13
B171	2-11-16	4-10-12-14	2-5	4-9-10
B174	7-8-11-14	4-9-10-12-14	2-5	5-8-10-13
B189	4-11-13-16	4-9-10-12-14	3-5	6-8-10-13
B207	6-7-11	4-9-10-11-12	2-5	4-9-10-13
B213	6-11-13-16-17	1-9-10-12-14	2-5	4-8-10-13
B214	4-8-11-13-16	4-9-10-12-14	2-5	2-9-10
B225	7-8-11-13	4-9-10-12-14	2-5	4-8-10
B229	8-11-13-16	4-9-10-12-14	2-5	4-8-10
B252	7-8-11-13	4-9-10-12-14	3-5	2-8-10
P1	1-11	3-4-7-10-11-12	5-6-9	4-8-10-13
P5	6-7-11	4-5-9-10-12-14	2-5	7-9-10-11-13
P6avtt	6-11-13-16	4-10-11-12	2-5	4-8-10-13
P6aptt	6-11-13-16	4-10-11-12	2-5	4-8-10-13
P7	11-13-14-16	4-9-10-12-14	2-5	4-8-10
P14	3-11-16-17	4-5-8-9-10-12-13-14	2-5	6-8-9-10
P15	11-13-14-15-17	4-9-10-11-12-14	2-5	4-9-10
P17	9-11-13-16	1-9-10-12-14	2-5	1-8-10
P19	6-10-13-15	4-9-10-11-12-14	2-5	4-8-10
P20	2-13	4-9-10-11-12-14	2-5	1-8-10
P24	6-8-11-13	9-10-12-13-14	2-5	2-8-10
P25	4-7-11	1-9-10-11-12-14	2-5	4-8-10-13
P26	4-7-11	1-9-10-11-12-14	2-5	4-8-10-13
P34	8-11-13-14-16	4-9-10-12-14	2-5	4-8-10
P41	7-11-16	4-10-12-14	2-5	4-8-10
P45	6-7-11-17	4-9-10-12-14	2-5	4-9-10-13
P48	11-13-14-15-16	4-5-10-12	2-5	4-8-10-13
P54	6-13-15-16	4-9-10-12-14	2-5	4-8-10-13

S.L	<i>ureA-ureB/HaeIII</i>	<i>ureA-ureB/NdeII</i>	<i>flaA/HaeIII</i>	<i>flaA/NdeII</i>
P55	6-10-13-16	4-9-10-12-14	2-5	4-8-10-13
P91	11-13-14-15-16-17	4-9-10-12-14	5-6-9	1-8-10
P98	6-7-11-17	4-9-10-12-14	3-5	5-8-10-13
P122	4-11-13-16	4-9-10-11-12-14	2-5	4-8-10-13
P123	4-11-13-16	1-8-9-12-14	2-5	2-9-10
P124	11-13-15-16-17	7-10-12-14	3-4	4-12
P127	2-13-16	4-9-10-12-14	3-5	4-9-10
P130	11-13-14-15-16-17	4-9-10-12-14	2-5	4-9-10
P133	8-11-13-14-16	9-10-12-14	2-5	4-8-10-12
P136	3-8-11	4-9-10-11-12-14	2-5	1-8-10
P141	6-7-11-17	4-9-10-11-12-14	3-5	6-8-10
P145	9-11-13-16	4-9-10-12-14	2-5	4-8-10
CIP	6-7-11-17	1-9-10-11-12-14	5-7-9	4-8-10-13
SYDN	6-11-13-16	4-9-10-12-14	2-5	4-8-10-13
ATCC	8-11-13-16	4-9-10-12-14	2-5	2-9-10
26695	4-8-11-13-16	4-9-10-12-14	2-5	1-8-12
J99	6-7-11-17	4-8-9-10-12-14	2-5	6-9-10-13
Tx30	4-11-13-16	4-10-12-14	2-5	4-9-10
84-183	7-11-17	1-8-9-10-12-14	2-5	6-9-10-13
86338	6-11-13-16	4-9-10-11-12-14	2-5	4-9-10
US456	6-11-13-17	4-9-10-12-14	2-5	2-8-10
VZ1	7-10-13-16	4-9-10-12-14	2-5	4-8-10
VZ2	6-11-13-16	4-9-10-12-14	2-5	6-9-12
VZ3	6-7-11	4-9-10-11-12-14	3-5	4-8-10
VZ5	6-13-16	4-9-10-11-12-14	2-5	4-9-10
VZ17	3-11-15	4-9-10-11-12-14	2-5	4-9-10-13
VZ21	7-10-13-16	4-9-10-12-14	2-5	4-8-10
VZ435	7-11-13-15	4-9-10-12-14	2-8	4-8-10-12
VZ503	3-11-16	4-9-10-11-12-14	2-5	4-8-10-13
HK2559	3-7-8-11-13	4-10-11-12	2-5	4-10
HK2560	7-8-11-13	4-9-10-12-14	5-7-9	4-8-10-13
HK2561	7-11-16	4-9-10-12	2-5	6-8-9
CH95-10	1-11	9-10-11-12-14	2-5	4-9-10
CH95-12	4-8-11	4-10-11-12	1-9	1-4
JP96-9	7-8-11-13-16	4-9-10-11-12-14	5-7-9	4
JP98-8	7-11-13-15-17	4-9-10-11-12	5-6-9	3-4
JP98-10	8-11-13-17	4-9-10-12-14	5-6-9	2-4
JP98-25	3-8-11-13-15	4-9-10-11-12	5-6-9	2-4
JP98-716	8-11-13-16	4-9-10-12	5-6-9	2-4
IN97-645	3-5-8-11	4-9-10-11-12-14	2-5	4-9-10
IN97-650	3-4	4-9-10-12-14	2-5	4-9-10
IN97-762	7-11-13-17	4-9-10-11-12-14	5-6-9	2-8-10

Annexe 4b : Génotype *vacA* et statuts *cagA* et IS605 des 87 souches de *Helicobacter pylori* de l'étude.

S.L	<i>vacA</i> s	<i>vacA</i> m	<i>cagA</i>	IS605
B30	s1a	n.d.	+	-
B33	s1	m1	-	+
B46	s1a	m1	+	+
B53	s1a	m2	-	+
B81	s1a	m2	-	+
B101	s1a	m1	+	-
B102	s1a	n.d.	+	-
B104	s2	m2	-	-
B109	s1a	m1	+	-
B110	s1b	m1	+	-
B123	s2	m2	-	-
B129	s1a	m2	-	-
B133	s1a	m2	-	-
B136	s2	m2	-	+
B139	s1b	m2	-	-
B147	s2	m2	-	-
B148	s1a	m2	-	-
B166	s1a	m1	+	-
B171	s1a	m1	+	-
B174	s1a	m2	-	-
B189	s1a	m2	-	+
B207	s1a	m2	+	-
B213	s2	m2	-	+
B214	s1a	m1	+	+
B225	s1a	m2	-	-
B229	s1a	m1	+	+
B252	s2	m2	-	-
P1	s1b	m1	+	+
P5	s1b	m1	+	-
P6avtt	s2	m2	-	-
P6aptt	s2	m2	+	+
P7	s1a	m1	-	-
P14	s1b	m1	+	-
P15	s1a	m1	+	+
P17	s2	m2	-	+
P19	s2	m2	-	-
P20	s1a	m1	+	+
P24	s1b	m1	+	-
P25	s2	m2	-	-
P26	s1b	n.d.	+	+
P34	s1	m1	+	-
P41	s2	m2	-	-
P45	s1b	m1	+	-
P48	s1b	m2	+	-
P54	s1b	m1	+	+

S.L	<i>vacA</i> s	<i>vacA</i> m	<i>cagA</i>	IS605
P55	s1a	m2	+	+
P91	s1a	m2	-	+
P98	s1b	m1	+	-
P122	s1	m2	+	-
P123	s2	m2	-	+
P124	s1b	m2	-	-
P127	s1b	m1	+	+
P130	s1b	m2	+	-
P133	s1a	m1	+	-
P136	s1b	m1	+	+
P141	s1a	m1	+	+
P145	s2	m2	-	-
CIP	s1b	m1	+	-
SYDN	s2	m2	+	-
ATCC	s1a	m2	+	+
26695	s1a	m1	+	+
J99	s1b	m1	+	+
Tx30	s2	m2	-	+
84-183	s1b	m1	+	+
86338	s2	m2	-	-
US456	s1a	m1	+	+
VZ1	s1	m1	+	-
VZ2	s1	m1	+	-
VZ3	s2	m2	-	-
VZ5	s2	m2	-	-
VZ17	s1	m2	+	+
VZ21	s1a	m1	+	-
VZ435	s1a	m1	+	-
VZ503	s2	m2	+	+
HK2559	s1a	m2	+	-
HK2560	s1a	n.d.	+	-
HK2561	s1a	m2	-	+
CH95-10	s1a	m2	+	+
CH95-12	s1a	m2	+	+
JP96-9	s1a	m2	+	+
JP98-8	s1a	m2	+	+
JP98-10	s1a	m2	+	+
JP98-25	s1a	m2	+	+
JP98-716	s1a	m2	-	+
IN97-645	s1a	m2	+	+
IN97-650	s1a	m2	+	+
IN97-762	s1a	m2	+	+

Annexe 4c : Données du ribotypage obtenues avec deux endonucléases de restriction (*Hind*III et *Hae*III) pour 41 des 87 souches de *Helicobacter pylori* de l'étude.

S.L	<i>Hind</i> III	<i>Hae</i> III
B30	1-3-6-11-14	0
B33	2-7-9-11	1-2-9-11-17-28-30-31
B46	1-6-12	2-9-11-13-22-32
B53	1-7-9	3-8-10-13-20-22-28-30-32
B81	5-6	0
B101	1-6-12	1-2-8-22-28
B102	1-2-6-11	2-8-11-16-24
B104	1-6	1-2-6-18-25
B109	1-2-6-8	2-13-16-17-19-23-25-26
B110	2-5-6-9	2-4-8-20-21-24
B123	n.d.	n.d.
B129	n.d.	n.d.
B133	n.d.	n.d.
B136	n.d.	n.d.
B139	n.d.	n.d.
B147	n.d.	n.d.
B148	n.d.	n.d.
B166	n.d.	n.d.
B171	n.d.	n.d.
B174	n.d.	n.d.
B189	n.d.	n.d.
B207	n.d.	n.d.
B213	n.d.	n.d.
B214	n.d.	n.d.
B225	n.d.	n.d.
B229	n.d.	n.d.
B252	n.d.	n.d.
P1	1-6	1-2-3-8-16-20
P5	1-6-8	1-2-5-8-9-11-15-18-19
P6avtt	1-6	1-5-9-13-17-20-27
P6aptt	1-6	1-5-9-13-17-20-27
P7	1-6	1-2-15-16-17-19-25-26
P14	1-6	2-8-25-29
P15	1-6	1-2-5-6-13-15-17
P17	1-6-8	1-2-7-11-16
P19	1-6-7	2-7-11-23-25-28-30-32
P20	2-6-9	1-2-9-11-20-25
P24	1-6-9	2-3-5-8-20-21-23
P25	1-6-12	2-5-9-13-20-30-32
P26	6-8-10-12-13	0
P34	1-8-13	0
P41	1-2-5-6-9-12-13-15-16-17-18-19-20	1-2-8-11-20-24-26
P45	1-7-11	3-7-9-13-20-28-30
P48	1-6-13-15	1-2-4-6-8-10-16-20-24-30
P54	1-6-9	0

S.L	<i>Hind</i> III	<i>Hae</i> III
P55	1-4	1-2-3-7-10-20-23
P91	1-6	0
P98	1-2-4-6-7-9-13-15-18	2-8-12-14-19-25-30
P122	1-6-12	3-9-16-17-20-30
P123	1-3-6-11	2-7-10-13-16-17-20
P124	1-7-8	1-2-3-9-14-20-26
P127	1-6-10	0
P130	1-6-8	0
P133	1-6	0
P136	5-6-7-9	0
P141	n.d.	n.d.
P145	n.d.	n.d.
CIP	1-6-8	2-8-11-13-17-20-32
SYDN	1-5-6	0
ATCC	1-2-6-8	0
26695	n.d.	n.d.
J99	n.d.	n.d.
Tx30	n.d.	n.d.
84-183	n.d.	n.d.
86338	n.d.	n.d.
US456	n.d.	n.d.
VZ1	n.d.	n.d.
VZ2	n.d.	n.d.
VZ3	n.d.	n.d.
VZ5	n.d.	n.d.
VZ17	n.d.	n.d.
VZ21	n.d.	n.d.
VZ435	n.d.	n.d.
VZ503	n.d.	n.d.
HK2559	n.d.	n.d.
HK2560	n.d.	n.d.
HK2561	n.d.	n.d.
CH95-10	n.d.	n.d.
CH95-12	n.d.	n.d.
JP96-9	n.d.	n.d.
JP98-8	n.d.	n.d.
JP98-10	n.d.	n.d.
JP98-25	n.d.	n.d.
JP98-716	n.d.	n.d.
IN97-645	n.d.	n.d.
IN97-650	n.d.	n.d.
IN97-762	n.d.	n.d.

Note:

n.d. : souches non analysées par ribotypage

0 : souches qui ne peuvent être digérées par *Hae*III

Annexe 4d : Données RAPD obtenues avec les 12 amorces pour les 87 souches de *Helicobacter pylori* et les 4 souches "outgroup" de l'étude.

S.L	A11	A13	A17	B1	B5	B15	F7	N4	N5	N9	R10	U12
B30	5-7-8	2-6-12-15-16	1-2	8-11-13	9	1-4-7	4-8	6-9-11-12-15	10	17-18	11	2-4-8
B33	2-5	2-5-6-12-16	3	13	9-10	1-4-12	1-11	4-8-9-13-15	10-14	12-17	11	2
B46	2-5	3-5-6-8-9-14-18	3-5-11	13	8-9-11	17	4-9	4-5-15	9-10	1-4-12	4-11	3
B53	5	3-6-9	3-7	13	11	4-7	8	11-13-15	5-10	16	4	2-9
B81	2	3-6-9-10-16-17	3-14	13	4-11	4	8	4-11-13-15	5-10	4-12	5	2-4
B101	5-7-10	2-5-6-9-16	3-5-12	13	3-5-6	4-8	8	3-4-10-15	1-5-10-14-15	8-12	11	2
B102	2-5-8	3-6-12-13	3-7-10-12	13	11	1-4	8-11	3-11-13-15	1-6-10	4-12	11	2-4
B104	2	2-3-6-9-12-15-16	7	13	9	4-11	4-8	4-10-13-15	5-6-10	12-17	11-12	2
B109	3-5	4-7-10-15	12	3-5-8	5-7	4-12	2-8	4-9-11-15	10	12-17	11	2
B110	2	7-13-16	7	13	9	4	8	4-8-13-15	5-10	12	5-11	4
B123	1-7	5-6-7-17	7	13	1-2-8-9-11	4-6	4-8-13	4-5-6-11-13-15-16	10-14	12-17	5	4
B129	5-8	9-10-13	3	13	11	4-17	4-8	6-8-9-11-13-15	10-12	11-17	4-11	2
B133	5	2-6-17-18	7	13	11-14	4-9	8	8-9-11-13-14-15	10	11-17	1-5-6	2
B136	2	2-3-5-6-13	3-7	13	2-10-11	4-7	3-7-8-13	7-8-13-15	5-10-16	4-11	4-11	6-9
B139	1-3-5-7	2-3-6-9-16	3-6	13	5-8	1-4	1-8-13	5-6-8-9-12-13-15	5-10	2-4-5	11	2
B147	2-5	1-3-5-6-13	3	13	3-7	4-10	8-13	15-16	3-6-10-14	12	11	2
B148	5	1-7-13	3-6-10	13	8-11	1-4-7	8	12-16	3-5-10	16-17	11	2
B166	5	1-2-4-7	3-5-10	13	11	1-4	8	12-13	10	1-12-16	11	2-4
B171	3	5-6-16	1-3	8-13	8-11	12	8	4-9-12-15	3-5-16	12-17	4-11	2
B174	5-8	3-5-6-10-16	3	3-5	11	4	8	4-9-11-13-14-15	10-11	17	11	2-4-9
B189	1-5	2-5-6-12-16-17	3	13	1-5-8-9	4-7-12	3-6-8	4-11-13-15	5-6-10	1-4-12	11	2
B207	3	2-5-6-10-16	3	13	7-8	4	8-11	4-8-9-11-13-15	5-10-15	1-3-12	11	2
B213	3-8	1-6-10-12	3-9	5-8-11	9-11	4	3-6	4-7-11-13-15	10-14	12	11	2-4
B214	5	5-6-12-13	3-6	2-3-10-11	8	3	7-8-9-10	4-6-11-15	3-5	4-8-12	11	2-4
B225	2-5-7	3-5-7-9-13	3-7	13	8-9	4	8	4-6-7-9-12-15	5-10	4-5-7-12	4-11	2-4-5-8
B229	5	2-3-5-6-10-13-15	7	13	9-10	3	8	8-13-15	5-9-10	6-12	4-11	2-4
B252	2	9-13	7	13	11	4	8	6-9-11-13-15	4-10-15	12-16	11	4
P1	5	7-13	3-10	13	11	4	13	4-11-13-15	10-16	12	4-5	2
P5	1-2-5-10	3-5-6-7-13-15-16-18	1-8-13	3-14	2	4	8-13	8-11-13-15	3-7-10	2-9-11	5-6-13	4
P6avtt	3-7	5-6-7-10-13	3-7	13	4-6-9	4-7	8	4-5-7-13-14-15	10	1-17	5-10-11	2-4
P6aptt	3-7	5-6-7-13-16	3-7	13	4-6-9	1-4-7	8	4-5-7-13-14-15	10	1-17	2-3-4-11	2-4
P7	5	3-5-7-10-17	1-3	13	1-9	4-15-17	8-13	4-6-9-11-13-15	10-14	17	4-11	2-4
P14	5	6-10-13-16	6	5-13	7-11	3-4	2-3-4-9-10	4-5-9-13-14-15	8-10-14	2-16	4-9-11	2-4
P15	2	2-5-6-13-16	7	3-13	13	4-14	1-5	3-8-16	1-3-10	2	3-4-11	2-4
P17	5	2-4-6-7-10-16	3-7	13	11	4-16	1-4-8	4-6-8-11-13-15	5-10-14	12	4	2-4
P19	2	3-6-14	7	13	9	5-12	8	6-8-11-15	10-14	11-18	4-11	2-4
P20	3-5	10-12-13	3-6	13	9	4-11	8	8-16	6-10	17	11	3-4-6
P24	3-5-8	3-7-16	7	13	4-11-13	4-9-11-17	8	5-9-12-13-15	10-14-16	16	7-11	2
P25	5	2-5-6-16	7	5-13	9-11	4	8	4-9-11-13-15	6-10	2-11-16	4-11	2-4
P26	2	3-6-13-15-17	3-9	5-14	4-8-11	4	2-3-7-9-10	3-4-5-6-15	10-12	4-5	4-11	2
P34	5	1-3	1-3-12	3-13	3-11	1-4	8	4-5-8-9-13-15	10	11	4-9	4
P41	5	4-7-10-13-15-17	3-6	13	8-9	6-11-14	3-4-7	3-4-8-9-13-15	5-6-10	7-11-17	4-6-11	2
P45	5	2-3-4-6-10-18	1-3-5	3-5	1-2-3-6-8	4-5-6	8	4-6-8-10-15	10	2-11-12	2-3	2-4-8
P48	2	1-2-3-5-6	1-3-10	3-5-8	1-3	4-6-7-11	8-13	15-16	10	1-12-18	4-11	2
P54	2	3-4-7-16	3-7	10-13	9-11	4	8	4-9-13-15	5-10	5-11-12-16	4-11	2-4

S.L	A11	A13	A17	B1	B5	B15	F7	N4	N5	N9	R10	U12
P55	2-3	3-4-6-16	3-7	5-8	1-3-12	4-17	8-13	5-11-13-15	10-14	3-12	5	2-4
P91	2	3-6-9-16	6	8-13	11-12	1-4-5	8	4-12-13-15	10-16	2-17	11	3-4-5
P98	5	1-3-5-6-10-15-16	3-8	3-5	3	2-3-4	8	4-5-8-11-15	10-14	11	4	4
P122	2	3-6-13-16	3-5-13	13	3-9	4-13	8	9-11-13-15	10	17	11	2
P123	2	3-6-7	7	13	11	2-4-5-8	8	4-6-9-11-15	10	3-11	4-11	2
P124	5-7-8	3-6-12-16	3-9	3-11	8-10-11	4-7	8-14	4-6-8-9-15	5-8-10	12-17	4-11	4-6
P127	3-5	3-6-7-12-13-16	7	13	6-8-11	3-7	3-8-11	4-6-7-9-11-13-15	10	17	4-11	2
P130	2-5	6-12-15-16	1-3	13	11	4-17	8	4-6-13-15	10-15	11-17	4-11	4
P133	3	6-10-12-16-18	1-3-9-13	13	8-9	4-7	8	4-6-8-9-13-15	9-10	17	5	4-5
P136	5	3-5-6-9-12-16	3-7	13	8-11	4	13	11-13-15	3-8-10-13	12-17	4-11	2
P141	1-2	2-5-6-14-18	1-3-9	3-13	6-11	4	8	7-11-13-15	10	1-4-6-11	3-4-11	2-4
P145	2	1-2-3-7-16	6-7	3-4-13	8	4	7-8	3-4-9-13-15	1-6-10	4-6-11	4-6-11	2-4
CIP	5	3-4-5-10-14-16	6-12	13	1-9	4	8	4-15-16	5-10	11-17	4-11	2-4
SYDN	2-5	2-3-5-6-9	3-9-13	2-13	11	4	8	9-11-13-15	6-10-14-15	6-12-16	5-11	2-4
ATCC	2-8	6-10-12-18	1-3-12	13	1-2-9	4-12	8	4-8-13-15	3-10	11	4-11	2-4
26695	5-8	2-3-5-6-12	7-12	10-11	10	4	9-14	7-8-13-15	10	17	4	2-3
J99	5	3-10-16	1	3-8	12	4-11	3-7-8	4-15	5-14	3-11	4	4
Tx30	5-8	3-6-9	7	3-5-8-11	11	4	3-4	8-9-12-13	10	4-12	11	2-4
84-183	5	1-4-6-16	1-9	3-4-8-11-14	3-5-9	4	8	4-8-11-15	3-10	1-11	4	2-4
86338	2	1-4-9-18	7	5-13	5-13	4	8	7-12-14	10	12-18	4-5-11	2
US456	2-7	2-3-10-12	6-7-13	5-13	8	4-7	6-8	9-13-15	2-6-10	12	4-11	2-4
VZ1	5	3-4-6-11-16	1-3	13	4-6	4	8-9	1-6-7-9-11-13-15	7-8-10	4-11	4	2-4
VZ2	2-5	4-6-10	1-3	1-3	8-13	4	8	9-13-15	10-12	1-11	4-11	9
VZ3	5	3-6-16	6	13	8-9-11	4-12	6-8	4-5-9-11-13-15	1-3-10	12	4-11	4
VZ5	7-8-10	3-4-7-12-16	7	3-13	8-10	4	7-8	7-15	2-7-10	4-16	4-5-12	2
VZ17	1-5	3-6-10-15-16	1-3	13	4-8	4-12	4-9	7-13-15	1-6-8-10	4-5	3-4-11	4
VZ21	5	3-4-6-11-16	1-3	13	5-6-11	4	8-9	1-6-7-9-11-13-15	7-8-10	1-2-4-12	4	2-4
VZ435	2	4-6-12-15-16	1	3-13	1-9	4	8	1-3-6-8-11-15	6-7-8-10	2-12-17	12	4
VZ503	2-5	6-10-16-17	3-7	13	4-11-12	4-8	1-3-8	4-9-11-15	6-8-10	2-4-16	4-11	4-6
HK2559	2	3-7-12-17	3	13	9-10	4	3-7-8	6-9-13	8-10-12	12-16-17	8	2-4
HK2560	2-5	12-17	1-3-9	8-13	3	1-4-7-8	3-8	6-9-13-15	5-10	16-17	11	2-4
HK2561	1-2-3	4-5-6-12-16	1-3	8-13	9-11	4-7-8	3-4-7	2-8-13-15	10-14	16-17	4-11	4
CH95-10	1	8-10	3-8-11	3-8-13	9	1-4-17	3-11	1-8-12-13-15	10	1-12	4	2
CH95-12	1-5	10	1-3-8-11	2-3-5-8-13	3-9-13	6-7-8-17	3-11	1-7-13-15	3-10-14	1-12-16	5-11	2-4
JP96-9	1-2	2-3-5-6-10-16	1-3	3-5-13	3-9-11	3	7-8-9	8-13-15	3-6-10	4-12-17	3-4-11	2-4
JP98-8	5	3-7-10-17	1-3-11	3-8-13	3-9	4-6	2-8	2-8-9-15	3-10	3-12-16-17	3-4-11	2-6
JP98-10	2	6-10-17	1-3	13	8	2-7	3	9-13-15	3-10-12	1-5-12-16-17	3-4-11	2-6
JP98-25	1-5	4-5-6-8	1-3-12	2-3-13	9	4-7	3-8	2-8-13-15	10	1-8-12-17	4	2-6
JP98-716	2-3-10	3-10	3-6-13	1-2-13	8-10	2	3	1-9-15-16	3-5-14	5-8-11	11	2-4-5
IN97-645	1-2-5	4-6-10	3-12	13	3-6	4	1-8	4-5-8-12-13-15	2-5-12	4-12-17	4-11	2-4
IN97-650	2-5	4-6-10	3-13	13	4-5-8	3-4-7-15	1-4-8	1-4-6-12-13-15	1-2-5-10	2-12	4-5	2-4-6
IN97-762	2	2-10-16	3-10	3-5-13	5-11	2-4-7-12	8	1-3-4-12-15	1-3-4-5-6	2-12	4-11	2-4
<i>Hmustelae</i>	9-13	4-7-13-15	4-6-8	3-7-15	1-8	10	12	8-10-14-15-18	3	5-7-10	8-12-13	5
<i>Hhepaticus</i>	5-14	5-7-11-13	1-4-6	2-5-8-10	7	12	4-8	15-16	4-10	17	7	1-4-6
<i>Cjejuni</i>	6-12	3-6-15	9-12	6-9-11	10	14	3	3-4	1-4-7-9	11-13-15	6	7
<i>Ccoli</i>	1-4-10	1-2-3	3-13	11-12	3	4-6-8-14	8	6-9-11-15-17	3-15	6-8-10-14	6-7-9	5

Annexe 4e : Données MLEE obtenues avec les 10 systèmes enzymatiques (dont 5 estérases) pour les 87 souches de *Helicobacter pylori* et les 4 souches "outgroup".

S.L.	est αNA	est αNB	est βNA	est βNB	est AI	GDH	IDH	G6PDH	ADK	NP	GOT	SOD	PEP1+2	DIA
B30	6	6	6	6	1-2-6	5	2	3	4	2	5	5	2	3-4
B33	5-6	5-6	6	6	1-2-6	3	2	3	6	2	5	4	2	3-4-6
B46	4-6	4-6	6	6	1-2-6	4	2	6	6	3	5	2	1	3-5
B53	5-6	5-6	6	6	1-2-6	3	2	5	7	1	8	4	2	3-5
B81	5-6	5-6	6	6	1-2-6	3	1	0	0	2	7	4	2	3
B101	6	6	6	6	1-2-6	4	2	5	6	4	0	5	2	3
B102	4-6	4-6	6	6	1-2-6	1	2	1	4	2	3	2	2	3
B104	4-6	4-6	6	6	1-2-6	3	2	5	8	1	6	2	2	3
B109	5-6	5-6	6	6	1-2-6	3	2	8	7	2	3	4	2	3-5
B110	5-6	5-6	6	6	1-2-6	3	1	0	4	2	4	4	2	3
B123	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	5	4	6	1	0	2	2	3
B129	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	4	6	7	2	8	4	2	3-4-6
B133	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	3	8	4	1	2	2	3-5
B136	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5	4	2	8	4	5	2	2	3-5
B139	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	1	2	2	6	2	1	3-4-5
B147	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	2	2	3	2	8	2	2	3-5
B148	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	3	4	3	4	4	2	5
B166	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	4	7	3	2	6	2	2	3
B171	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	3	7	3	5	4	2	5
B174	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	6	3	2	7	2	1	3-4-5
B189	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	3	6	4	4	4	2	3-5
B207	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	3	6	6	2	2	2	3-4
B213	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	5	5	2	7	2	2	3-5
B214	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	2	7	8	2	3	4	2	3-5
B225	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	3	2	4	2	4	2	2	3-5
B229	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	4	6	3	2	7	4	2	3-5
B252	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	2	3	6	4	2	2	2	2-4
P1	4-6	4-6	6	6	1-2-6	3	0	4	3	2	8	2	2	3-5
P5	4-6	4-6	6	6	1-2-6	2	2	3	4	6	7	2	2	3-5
P6avtt	5-6	5-6	6	6	1-2-6	3	3	4	3	2	5	4	2	3-5
P6aptt	5-6	5-6	6	6	1-2-6	3	3	5	3	2	5	4	2	5
P7	5-6	5-6	6	6	1-2-6	3	3	3	3	2	7	4	2	4
P14	5-6	5-6	6	6	1-2-6	4	5	3	4	2	5	4	2	3-5
P15	4	4	6	6	1-2-6	4	3	6	1	4	4	2	2	3-5-6
P17	4-6	4-6	6	6	1-2-6	4	2	5	4	2	2	2	2	4
P19	4-6	4-6	6	6	1-2-6	3	2	6	7	2	7	2	2	3
P20	5-6	5-6	6	6	1-2-6	6	2	1	7	2	7	4	2	6
P24	5-6	5-6	6	6	1-2-6	3	2	3	4	1	2	4	2	3-5
P25	5-6	5-6	6	6	1-2-6	4	2	5	2	2	2	4	2	5
P26	6	6	6	6	1-2-6	4	4	7	8	2	5	5	2	2
P34	5-6	5-6	6	6	1-2-6	5	3	4	4	2	3	4	2	6
P41	4	4	6	6	1-2-6	4	2	5	7	2	4	2	2	3-5
P45	4-6	4-6	6	6	1-2-6	4	2	6	5	2	6	2	2	3-5
P48	4-6	4-6	6	6	1-2-6	3	3	2	2	2	3	1	2	2-5
P54	4-6	4-6	6	6	1-2-6	2	3	4	9	2	3	2	2	3-5-6

S.L.	est α NA	est α NB	est β NA	est β NB	est AI	GDH	IDH	G6PDH	ADK	NP	GOT	SOD	PEP1+2	DIA
P55	5-6	5-6	6	6	1-2-6	4	2	2	4	1	3	4	2	3-5
P91	5-6	5-6	6	6	1-2-6	1	2	1	5	4	9	4	2	4-5
P98	4-6	4-6	6	6	1-2-6	5	2	3	6	4	4	2	2	4-5
P122	4-6	4-6	6	6	1-2-6	4	2	2	8	2	5	2	2	4
P123	5-6	5-6	6	6	1-2-6	3	3	2	7	2	4	4	2	3-5
P124	5-6	5-6	6	6	1-2-6	1	2	3	2	4	4	4	1	3-4
P127	5-6	5-6	6	6	1-2-6	3	3	2	8	2	7	4	2	3-5
P130	5-6	5-6	6	6	1-2-6	3	1	3	6	4	9	4	2	3-4-5
P133	5-6	5-6	6	6	1-2-6	3	2	4	9	2	6	5	2	5
P136	4-6	4-6	6	6	1-2-6	2	2	1	6	4	3	2	2	3-5
P141	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	3	7	8	4	4	2	2	3-5
P145	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	1	2	9	2	2	2	2	3-5
CIP	6	6	6	6	1-2-6	5	2	3	6	2	3	4	2	3-5
SYDN	3-6	3-6	6	6	1-2-6	4	2	4	6	2	4	1	2	3-5
ATCC	6	6	6	6	1-2-6	3	3	5	6	2	3	4	2	3-5
26695	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5	2	2	8	1	5	6	2	3-4
J99	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5	2	8	6	3	5	4	2	3-4-5
Tx30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	3	9	2	4	4	2	3
84-183	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5	2	3	1	5	8	2	1	3-5
86338	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	1	2	8	4	7	2	3	3-5
US456	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	4	3	99	2	3	2	2	4
VZ1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	3	5	6	2	8	2	2	4-5
VZ2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	5	3	2	4	2	2	3-5
VZ3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	6	3	2	5	4	2	4-5
VZ5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	6	3	2	6	2	2	5
VZ17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	2	4	2	5	4	2	4-5
VZ21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	0	5	4	2	7	2	2	3-5
VZ435	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	5	4	5	5	2	2	3-5
VZ503	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	2	5	7	2	4	2	2	3-5
HK2559	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	3	3	6	2	5	2	2	3-5
HK2560	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	3	3	2	4	2	2	2	3-4-6
HK2561	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	3	4	4	2	2	2	2	3-4-6
CH95-10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	3	3	3	2	3	2	2	3-4-5
CH95-12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	3	2	7	1	2	2	2	3-5
JP96-9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	3	3	7	2	2	2	1	3-6
JP98-8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	3	3	3	4	2	1	2	3-5-6
JP98-10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	3	4	3	2	1	2	2	3-4
JP98-25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	3	2	8	4	2	2	2	3-4
JP98-716	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	3	0	4	2	1	2	2	3-4
IN97-645	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	1	2	7	2	7	4	1	5
IN97-650	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	1	1	2	6	2	2	5
IN97-762	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	3	1	3	2	7	4	2	4-5
<i>Hmustelae</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7	6	3	8	0	7	3	2	4-5
<i>Hhepaticus</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	6	0	1	0	0	3	0	3-5
<i>Cjejuni</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	7	0	10	0	0	0	0	7
<i>Ccoli</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	7	0	8	0	0	0	0	1

Annexe 5 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour les 87 souches de *Helicobacter pylori* avec les différents marqueurs mis en œuvre dans l'étude.

Marqueurs moléculaires		Nombre de souches analysées	Nombre de souches typables	Nombre de bandes électrophorétiques différentes	Nombre de profils électrophorétiques différents	Diversité génétique (H)	Nombre de génotypes multilocus	Diversité génotypique	Distance génétique de Jaccard	Indice d'association entre les locus (I _A)
PCR-RFLP <i>ureA-ureB</i>	<i>Hae</i> III	87	87	17	51	0.968				
	<i>Nde</i> II	87	87	12	24	0.799				
						0.895	73	0.998	0,477±0,146	-0,078±0,033
PCR-RFLP <i>flaA</i>	<i>Hae</i> III	87	87	9	7	0.458				
	<i>Nde</i> II	87	87	13	29	0.924				
						0.691	42	0.962	0,473±0,249	0,023±0,014
Génotypage de <i>vacA</i>	type s	87	87	3	3	0.358				
	type m	87	83	2	2	0.484				
						0.421	5	0.421		
Détection de <i>cagA</i>		87	87			0.470	2	0.470		
Détection de IS605		87	87			0.504	2	0.504		
Ribotypage	<i>Hin</i> dIII	41	41	20	25	0.939				
	<i>Hae</i> III	41	29	33	29	0.918				
						0.929	40	0.975	0,771±0,182	0,251±0,118
RAPD	12 amorces	87	87	157	500	0.893	87	1	0,667±0,090	0,039±0,024
MLEE	10 enzymes	41	41			0.599	41	1	0,557±0,122	
	9 enzymes	87	87	62	70	0.662	87	1	0,631±0,139	-1,9e-05±0,021

Annexe 6: Représentation des différents génotypes *vacA*, *cagA* et IS605 en fonction de l'origine géographique des souches de *Helicobacter pylori*

	Echantillon total		Echantillon non-Asie		Echantillon Asie	
	nombre	pourcentage	nombre	pourcentage	nombre	pourcentage
<i>vacA</i> s1a	43	49.4	30	40.5	13	100.0
<i>vacA</i> s1b	18	20.7	18	24.3	0	0.0
<i>vacA</i> s1?	6	6.9	6	8.1	0	0.0
<i>vacA</i> s2	20	23.0	20	27.0	0	0.0
	87	100.0	74	100.0	13	100.0
<i>vacA</i> s1	67	77.0	54	73.0	13	100.0
<i>vacA</i> s2	20	23.0	20	27.0	0	0.0
	87	100.0	74	100.0	13	100.0
<i>vacA</i> m1	33	37.9	33	44.6	0	0.0
<i>vacA</i> m2	50	57.5	38	51.4	12	92.3
<i>vacA</i> m?	4	4.6	3	4.1	1	7.7
	87	100.0	74	100.0	13	100.0
<i>cagA</i> +	55	63.2	44	59.5	11	84.6
<i>cagA</i> -	32	36.8	30	40.5	2	15.4
	87	100.0	74	100.0	13	100.0
IS605+	41	47.1	30	40.5	11	84.6
IS605-	46	52.9	44	59.5	2	15.4
	87	100.0	74	100.0	13	100.0
	Echantillon Brest+Poitiers		Echantillon Brest		Echantillon Poitiers	
	nombre	pourcentage	nombre	pourcentage	nombre	pourcentage
<i>vacA</i> s1a	25	43.9	18	66.7	7	23.3
<i>vacA</i> s1b	15	26.3	2	7.4	13	43.3
<i>vacA</i> s1?	3	5.3	1	3.7	2	6.7
<i>vacA</i> s2	14	24.6	6	22.2	8	26.7
	57	100.0	27	100.0	30	100.0
<i>vacA</i> s1	43	75.4	21	77.8	22	73.3
<i>vacA</i> s2	14	24.6	6	22.2	8	26.7
	57	100.0	27	100.0	30	100.0
<i>vacA</i> m1	24	42.1	9	33.3	15	50.0
<i>vacA</i> m2	30	52.6	16	59.3	14	46.7
<i>vacA</i> m?	3	5.3	2	7.4	1	3.3
	57	100.0	27	100.0	30	100.0
<i>cagA</i> +	31	54.4	11	40.7	20	66.7
<i>cagA</i> -	26	45.6	16	59.3	10	33.3
	57	100.0	27	100.0	30	100.0
IS605+	22	38.6	9	33.3	13	43.3
IS605-	35	61.4	18	66.7	17	56.7
	57	100.0	27	100.0	30	100.0

ARTICLES

Panmictic structure of *Helicobacter pylori* demonstrated by the comparative study of six genetic markers

Laurence Salaün ^a, Céline Audibert ^b, Geneviève Le Lay ^a, Christophe Burucoa ^b,
Jean-Louis Fauchère ^b, Bertrand Picard ^{a,*}

^a Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine, 22 avenue Camille Desmoulins, 29200 Brest, France

^b Laboratoire de Microbiologie A, CHU La Milétrie, 86021 Poitiers, France

Received 15 January 1998; accepted 5 February 1998

Abstract

We compared the classifications of strains obtained by analysis of several genetic markers to demonstrate the panmictic structure of *Helicobacter pylori*, previously suggested by the study of multilocus enzyme electrophoresis. A series of 39 strains, including 37 clinical isolates from patients with gastritis or ulcers from two regions of France, reference strain CIP 101260 and the Sydney strain (strain SS1), were used. They were studied by restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal DNA (ribotyping) using *Hind*III and *Hae*III, by polymorphism analysis of the *ureA-ureB* and *flaA* genes by PCR-RFLP using *Hae*III and *Mbo*I, by *vacA* genotyping and by the presence or absence of the *cagA* gene and of the insertion sequence IS605 detected by PCR. There was a high level of genetic polymorphism over the studied strains, with 38 ribotypes, 38 restriction profiles for the *ureA-ureB* gene, 19 restriction profiles for the *flaA* gene and five combinations of the signal and mid-region sequences of the *vacA* gene. Factorial analysis of correspondence and hierarchical clustering performed using each marker revealed that the different classifications of the strains were not correlated. This suggests there is much genetic recombination between strains and supports the hypothesis of a panmictic structure for the *H. pylori* species. © 1998 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V.

Keywords: *Helicobacter pylori*; Population structure; Genetic diversity

1. Introduction

Helicobacter pylori is a pro-inflammatory gastrointestinal pathogen involved in the pathogenesis of chronic gastritis leading to peptic ulcer disease, gastric carcinoma or lymphoma [1–3]. Many efforts

have been made to determine the molecular mechanisms of host/parasite interaction which may explain how *H. pylori* successfully colonizes gastric mucosa and escapes the host immune response. All the analyses of the genome of *H. pylori* have demonstrated a high level of genetic diversity in natural isolates of this pathogen [4–9]. However, relatively little is known about the population genetics of isolates classified as *H. pylori*, an area essential for understanding how the pathogen adapts to its particular niche.

* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 22 33 08; Fax: +33 2 98 01 64 74; E-mail: Bertrand.Picard@univ-Brest.fr

Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) analysis [10] has suggested there has been much recombination in the *H. pylori* population. However, MLEE data should be interpreted with caution [11,12] and

drawing conclusions on the genetic structure of a bacterial population based on the study of a single marker is unwise [13]. The structure of a population can be assessed with more relevance by studying sev-

Table 1
Origins and characteristics of the 39 *H. pylori* strains studied

No.	Strain ^a	Associated disease ^{b,c}	RFLP rDNA		PCR-RFLP <i>ureA-ureB</i>		PCR-RFLP <i>flaA</i>		<i>vacA</i> type		<i>cagA</i> detection	IS605 detection
			<i>Hind</i> III	<i>Hae</i> III ^b	<i>Hae</i> III	<i>Mbo</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Mbo</i> I	Mid-region type ^b	Signal sequence type		
1	REF1	G	RI ₁	RA ₁	UH ₁	UM ₁	FH ₁	FM ₁	m1	s1b	+	–
2	B30	G	RI ₂	n.d.	UH ₂	UM ₂	FH ₂	FM ₂	n.d.	s1a	+	–
3	B33	U	RI ₃	RA ₂	UH ₃	UM ₃	FH ₂	FM ₃	m1	s1	–	+
4	B46	G	RI ₄	RA ₃	UH ₄	UM ₃	FH ₂	FM ₄	m1	s1a	+	+
5	B53	U	RI ₅	RA ₄	UH ₃	UM ₄	FH ₂	FM ₅	m2	s1a	–	+
6	B81	U	RI ₆	n.d.	UH ₅	UM ₅	FH ₂	FM ₆	m2	s1a	–	+
7	B101	U	RI ₄	RA ₅	UH ₆	UM ₆	FH ₂	FM ₇	m1	s1a	+	–
8	B102	U	RI ₇	RA ₆	UH ₇	UM ₃	FH ₂	FM ₈	n.d.	s1a	+	–
9	B104	U	RI ₈	RA ₇	UH ₂	UM ₃	FH ₂	FM ₉	m2	s2	–	–
10	B109	U	RI ₉	RA ₈	UH ₈	UM ₇	FH ₂	FM ₁	m1	s1a	+	–
11	B110	U	RI ₁₀	RA ₉	UH ₉	UM ₃	FH ₂	FM ₁₀	m1	s1b	+	–
12	P1	G	RI ₈	RA ₁₀	UH ₁₀	UM ₈	FH ₃	FM ₁	m1	s1b	+	+
13	P5	G	RI ₁	RA ₁₁	UH ₁₁	UM ₉	FH ₂	FM ₁₁	m1	s1b	+	–
14	P6	G	RI ₈	RA ₁₂	UH ₁₂	UM ₁₀	FH ₂	FM ₁	m2	s2	+	–
15	P7	G	RI ₈	RA ₁₃	UH ₁₃	UM ₁₁	FH ₂	FM ₂	m1	s1a	–	–
16	P14	U	RI ₈	RA ₁₄	UH ₁₄	UM ₁₂	FH ₂	FM ₁₂	m1	s1b	+	–
17	P15	G	RI ₈	RA ₁₅	UH ₇	UM ₄	FH ₂	FM ₆	m1	s1a	+	+
18	P17	G	RI ₁	RA ₁₆	UH ₁₅	UM ₁₃	FH ₂	FM ₁₃	m2	s2	–	+
19	P19	G	RI ₁₁	RA ₁₇	UH ₁₆	UM ₄	FH ₂	FM ₂	m2	s2	–	–
20	P20	G	RI ₁₂	RA ₁₈	UH ₆	UM ₄	FH ₂	FM ₁₃	m1	s1a	+	+
21	P24	U	RI ₁₃	RA ₁₉	UH ₁₇	UM ₁₄	FH ₂	FM ₃	m1	s1b	+	–
22	P25	G	RI ₄	RA ₂₀	UH ₁₈	UM ₁	FH ₂	FM ₁	m2	s2	–	–
23	P26	G	RI ₁₄	n.d.	UH ₁₉	UM ₁	FH ₂	FM ₁	n.d.	s1b	+	+
24	P34	G	RI ₁₅	n.d.	UH ₃	UM ₃	FH ₂	FM ₂	m1	s1	+	–
25	P41	G	RI ₁₆	RA ₂₁	UH ₂₀	UM ₁₅	FH ₂	FM ₂	m2	s2	–	–
26	P45	G	RI ₁₇	RA ₂₂	UH ₁	UM ₃	FH ₂	FM ₆	m1	s1b	+	–
27	P48	G	RI ₁₈	RA ₂₃	UH ₇	UM ₁₆	FH ₂	FM ₁	m2	s1b	+	–
28	P54	U	RI ₁₃	n.d.	UH ₂₁	UM ₃	FH ₂	FM ₁	m1	s1b	+	+
29	P55	G	RI ₁₉	RA ₂₄	UH ₂₂	UM ₃	FH ₂	FM ₁	m2	s1a	+	+
30	P91	G	RI ₈	n.d.	UH ₂₃	UM ₁₇	FH ₃	FM ₁₃	m2	s1a	–	+
31	P98	G	RI ₂₀	RA ₂₅	UH ₁₁	UM ₄	FH ₂	FM ₁	m1	s1b	+	–
32	P122	G	RI ₄	RA ₂₆	UH ₂	UM ₄	FH ₂	FM ₁	m2	s1	+	–
33	P123	U	RI ₂₁	RA ₂₇	UH ₂₄	UM ₁₈	FH ₂	FM ₁₄	m2	s2	–	+
34	P124	U	RI ₂₂	RA ₂₈	UH ₂₃	UM ₁₉	FH ₄	FM ₁₅	m2	s1b	–	–
35	P127	U	RI ₂₃	n.d.	UH ₅	UM ₃	FH ₂	FM ₈	m1	s1b	+	+
36	P130	n.d.	RI ₁	n.d.	UH ₂₃	UM ₃	FH ₂	FM ₈	m2	s1b	+	–
37	P133	U	RI ₈	n.d.	UH ₃	UM ₂	FH ₂	FM ₁₆	m1	s1a	+	–
38	P136	G	RI ₂₄	n.d.	UH ₂₅	UM ₄	FH ₂	FM ₁₃	m1	s1b	+	+
39	SYDN	U	RI ₂₅	n.d.	UH ₂₆	UM ₂₀	FH ₂	FM ₁	m2	s2	+	–

^aREF1 is the *H. pylori* reference strain CIP 101260 [14]; SYDN is the Sydney strain SSI [15]; the geographic origin of the *H. pylori* strains is indicated as follows: B = Bretagne, P = Poitou.

^bn.d.: not determined.

^cG: gastritis; U: ulcer.

eral DNA markers distributed over the entire genome and comparing the different classifications obtained; this method has already been used successfully for *Escherichia coli* population structure studies [13].

The present work is a comparison of the classifications of 39 strains by using six genetic markers. We studied ribosomal DNA polymorphism by the ribotyping method, and restriction polymorphism of the *ureA-ureB* and *flaA* genes by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). We determined the genotype of *vacA* and investigated whether the *cagA* gene and IS605 sequence were present. We also determined whether there was a correlation between the type of pathology and the place of the strains in the different classifications obtained.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Thirty-seven strains of *H. pylori* from gastric biopsy samples of patients with gastritis or ulcers were collected from 1992 to 1997, in two geographic areas of France (Bretagne and Poitou). *H. pylori* CIP 101260 [14] (Institut Pasteur, Paris) and the Sydney strain SS1 [15] were included for reference purposes (Table 1). All strains were grown on Pylori agar (BioMérieux, Lyon, France). Cultures were incubated between 48 h and 10 days at 37°C under microaerobic conditions (Campypak Plus, Becton Dickinson, Cockeysville, MD). Cultures were stored in 10% v/v glycerol in trypticase soy broth (AES Laboratoire, Combourg, France) at –70°C.

2.2. RFLP analysis of rDNA (ribotyping)

Bacterial DNA was isolated as previously described [6]. DNA (3 µg) was digested with *Hind*III and *Hae*III (Boehringer Mannheim, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions, transferred to Hybond N⁺ nylon membrane (Amersham, Les Ulis, France) by Southern blotting and probed with a chemiluminescent ribosomal probe, as previously described [16].

2.3. *ureA-ureB* RFLP patterns and *flaA* RFLP patterns

The oligonucleotides used for the PCR amplification of specific segments were: 5'-AGGAGAATG-AGATGA-3' and 5'-ACTTTATTGGCTGGT-3' for *ureA-ureB* [8]; and 5'-ATGGCTTTTCAGGT-CAATAC-3' and 5'-GCTTAAGATATTTTGTGTT-GAACG-3' for *flaA* [17]. 10 ng of phenol-extracted DNA was added to 100 µl of reaction mixture containing PCR buffer (Eurobio, Les Ulis, France), 3 mM MgCl₂, 0.25 mM of each deoxynucleotide and 20 pmol of each primer. *Taq* polymerase (2.5 U; Eurobio, Les Ulis, France) was added, and the reaction mixture was overlaid with 60 µl of mineral oil. PCR was performed with a Techne PHC-3 thermal cycler. The amplification cycle consisted of an initial denaturation at 95°C for 5 min followed by denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 50°C (*ureA-ureB*) or 55°C (*flaA*) for 1 min, and extension at 72°C for 2 min. The final cycle included extension for 5 min at 72°C. Samples were amplified through 30 consecutive cycles [18]. Aliquots (10 µl) of amplification products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel (w/v), stained with ethidium bromide and viewed with a UV transilluminator. DNA (90 µl) was precipitated by adding 1/10 volume of 3 M sodium acetate and 2 volumes of ethanol 99.9% (v/v). The samples were incubated at –20°C for 2 h and centrifuged at 12000 × *g* for 30 min. The pellet was dried and dissolved in 25 µl of 6 mM Tris-HCl, pH 7.5/6 mM NaCl/0.1 mM EDTA. 10 µl of the concentrated DNA solution (1–5 µg) was incubated with 10 U of *Hae*III or *Mbo*I restriction enzyme (Boehringer Mannheim, Meylan, France) for 16 h, and subjected to electrophoresis in a 2% agarose gel (w/v) as described above.

2.4. *vacA* genotyping

The *vacA* signal sequence type and mid-region nucleotide sequence type of each isolate were determined by PCR with extracted genomic DNA using the primers described previously [7]. PCR was performed as described for PCR-RFLP with annealing at 52°C to amplify the mid-region and at 55°C to amplify the signal sequence of *vacA*. Amplification

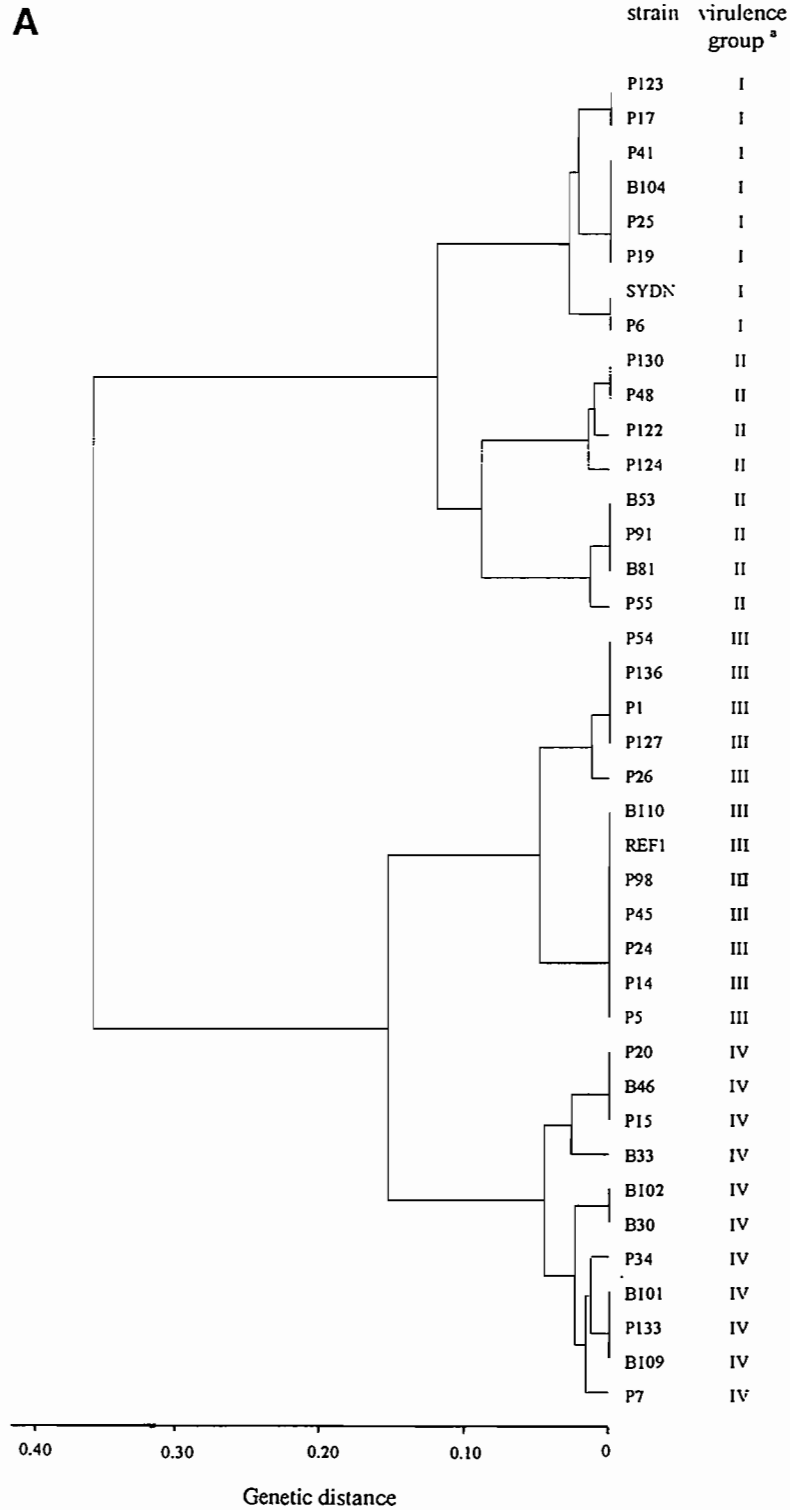
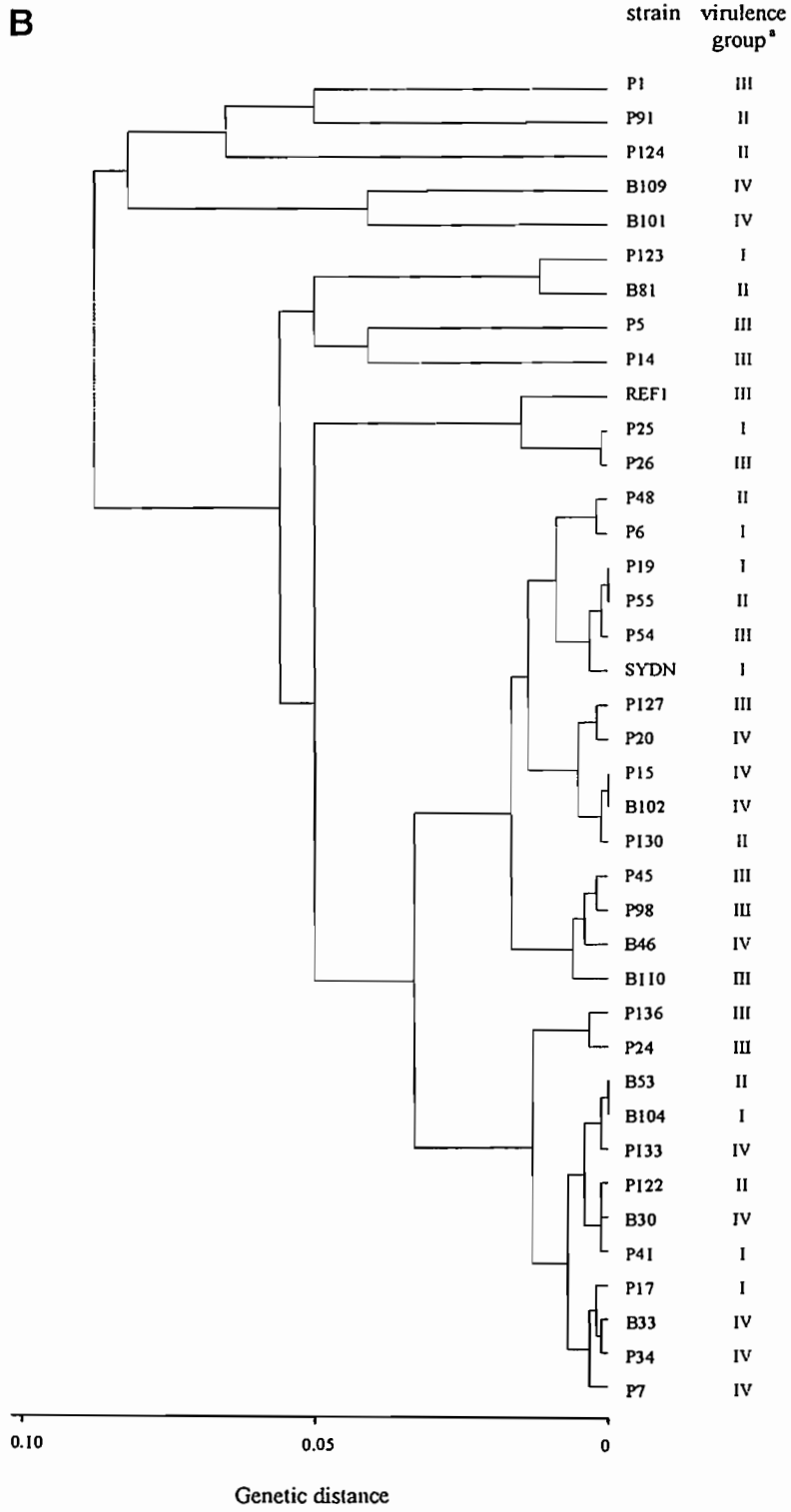


Fig. 1. Dendrograms based on the FAC using (A) *vacA* genotyping, *cagA* and IS605 detection and (B) *ureA-ureB* and *flaA* PCR-RFLP data. ^aThe four groups (I, II, III and IV) delineated by the dendrogram of the virulence factors in A (see Section 3) are indicated on the dendrogram in B.



products were digested, subjected to electrophoresis and detected as described for PCR-RFLP.

2.5. Detection of *cagA* gene and of IS605

PCR amplification of *cagA* and of IS605 was performed using the previously described primers 5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG-3' and 5'-CTGCAAAAGATTGTTTGCAGAGA-3' for *cagA* [19], and 5'-CGCCTTGATCGTTTCAGGATTA-GC-3' and 5'-CAACCAACCGAAGCAAGCATA-ATC-3' for IS605 (C. Burucoa, personal communication). PCR was carried out as described for *vacA* genotyping with annealing at 57°C. Amplification products were detected as described above.

2.6. Statistical analysis

The typing data were summarized as six two-way tables: (i) ribotyping with *HindIII*, (ii) *ureA-ureB* polymorphism with *HaeIII*, (iii) *ureA-ureB* polymorphism with *MboI*, (iv) *flaA* polymorphism with *HaeIII*, (v) *flaA* polymorphism with *MboI* and (vi) *vacA* genotyping and detection of *cagA* and IS605. Each table had 39 rows, one for each strain, and a column for each rDNA fragment (for ribotyping) or DNA fragment (for *ureA-ureB* and *flaA* RFLP patterns), *vacA* genotype and detection of the *cagA* gene and IS605. The presence or absence of each character was binarily coded, present = 2 or absent = 1. Factorial analysis of correspondence (FAC) [20–22] and hierarchical clustering [23] were performed from each table and the results compared. The analysis was performed with SPAD.N software (CISIA, Saint-Mandé, France) on a PC.

3. Results

3.1. Ribotyping

The restriction endonucleases *HindIII* and *HaeIII* were used to digest *H. pylori* chromosomal DNA. *HindIII* digestion resulted in 25 pattern types (RI₁–RI₂₅) (Table 1). The RI₈ pattern was shared by eight strains (20.5%). The RFLP patterns consisted of 2–5 bands from 1400 bp to 9500 bp in size, except for strains P41 and P98 which had 13 and 9 bands re-

spectively. The DNA samples of 11 strains (28%) were not cleaved by *HaeIII* and there were 28 pattern types among the remaining 28 strains (RA₁–RA₂₈). These patterns consisted of 4–10 bands from 890 bp to 9500 bp in size. A total of 38 ribotypes, resulting from the combination of *HindIII* and *HaeIII* RFLP patterns, were identified among the strains (Table 1).

3.2. *ureA-ureB* and *flaA* RFLP patterns

The 2.4-kb *ureA-ureB* segment was successfully amplified from the 39 *H. pylori* strains. *HaeIII* restriction analysis of the PCR product obtained for each strain yielded profiles of 3–6 fragments of 140–2180 bp in size. A total of 24 fragments were detected from the strains. There were 26 distinct pattern types (UH₁–UH₂₆) in the 39 strains (Table 1). *MboI* restriction analysis of the PCR product yielded patterns of 4–8 fragments between 110 bp and 890 bp in size. Sixteen fragments of various sizes were detected and there were 20 distinct pattern types (UM₁–UM₂₀) among the 39 strains (Table 1). A total of 38 pattern types, resulting from the combination of *HaeIII* and *MboI* RFLP patterns, were identified among the strains (Table 1).

The 1.5-kb *flaA* segment was amplified from all 39 *H. pylori* strains. *HaeIII* restriction analysis of the PCR product yielded patterns of two or three fragments with sizes between 400 bp and 890 bp. Six different size fragments were detected and four distinct pattern types (FH₁–FH₄) were identified among the strains (Table 1). *MboI* restriction analysis of the PCR product yielded patterns of 2–5 fragments with sizes between 200 bp and 890 bp. Eleven fragments were detected and 16 pattern types (FM₁–FM₁₆) were identified (Table 1). Twelve isolates (30.5%) had the FM₁ pattern whereas 10 isolates (25.5%) had a unique pattern. A total of 19 pattern types, resulting from the combination of *HaeIII* and *MboI* RFLP patterns, were identified among the strains (Table 1).

3.3. *vacA* genotyping

The distribution of *vacA* m1 and m2 alleles in the 39 *H. pylori* isolates was determined (Table 1). Twenty (51.5%) of the 36 strains (92.5%) with

DNA amplified by one of the two primer sets were of subtype m1 and 16 (41%) were of subtype m2. There was no amplification for the remaining three strains (7.5%).

We differentiated between type s1 and s2 *vacA* signal sequences. Thirty-one (79.5%) strains had s1 and eight (20.5%) strains s2 sequences (Table 1). The s1a and s1b subtypes were differentiated and the presence of the type s2 sequence was demonstrated for the nine strains. Thirteen type s1 strains (33.5%) were classified as subtype s1a and 15 (38.5%) as subtype s1b. The subtypes s1a or s1b were not determined for three strains (7.5%).

Five combinations of the *vacA* regions were identified among the 39 strains, the most common being m1s1b, in 11 strains (28%).

3.4. Detection of the *cagA* gene and of IS605

cagA was detected in 27 of the 39 *H. pylori* isolates (69%) by PCR (Table 1).

IS605 was detected in 15 of the *H. pylori* isolates (38.5%) (Table 1). PCR amplified similar DNA fragments of the expected size in strains containing IS605.

3.5. Statistical analysis

FAC and hierarchical clustering analysis were performed for each table and for each genetic marker. The classifications of the strains derived from these analysis were compared. No correlation was identified from these comparisons. The dendrogram based on the FAC for virulence factors typing data (Fig. 1A), at a genetic distance of 0.10, contains four virulence groups (I-IV). When these data are transferred to the dendrograms for *ureA-ureB* and *flaA* PCR-RFLP data (Fig. 1B) and *HindIII* RFLP rDNA data (data not shown), the virulence groups are randomly distributed on the two dendrograms. There were no correlations when the groupings from the dendrogram derived from the ribotyping data were compared with those obtained from *ureA-ureB* or *flaA* data (data not shown). There was also no correlation between pathology and either marker when epidemiological data were compared to the classifications of strains on the dendrograms.

4. Discussion

Many studies have reported a high level of diversity in the *H. pylori* species, but only two works have studied the genetic structure of this pathogen, both by MLEE [10,24]. A panmictic structure for the *H. pylori* population was suggested by Go et al. [10]. However, drawing conclusions about the structure of a population based on the study of a single marker can be misleading. Moreover, the MLEE method underestimates polymorphism because the net charge calculated does not always correlate well with electrophoretic mobility [25] and most enzyme polymorphisms are selectively neutral, or nearly so. Therefore, we analyzed several genes and compared the classifications obtained to assess the genetic structure of *H. pylori*. This method has already been used to assess the structure of *E. coli* populations [13] and the high level of correlation between the classifications obtained with this species demonstrated its clonal structure as previously demonstrated by Selander et al. [26] on the basis of MLEE. Conversely, in *Pseudomonas aeruginosa* species, the lack of correlation between the classifications obtained has demonstrated a high rate of recombination [27].

We studied the polymorphism of total DNA using the ribotyping method. Ribotyping seems to be a highly sensitive method for *H. pylori* strain identification [28,29] even if only two copies of the rDNA operon are present [30]. We identified 38 ribotypes among the 39 strains. This high degree of diversity in rRNA gene patterns and the lack of a significant association between ribotype and clinical symptoms are consistent with data published before [9,29].

The classifications obtained by PCR-RFLP analysis of the *ureA-ureB* and *flaA* genes did not correlate between each other, nor with ribotype or with *vacA*, *cagA* or IS605 markers.

The polymorphism of the pathogenicity determinant genes also supports the existence of an extensive recombination structure in the *H. pylori* species, because the classification of strains based on the polymorphism of the virulence genes was not correlated with ribotype and *ureA-ureB* or *flaA* gene classifications (Fig. 1). However, we found a strong association between the presence of *cagA* and *vacA* signal sequence type s1 ($\chi^2 = 9.22$, $P < 0.01$), as previously

noted by Atherton et al. [7]. Nevertheless, neither a particular *vacA* genotype nor the presence of *cagA* was correlated with one of the clinical traits studied (gastritis or ulcer). Only 62.5% of the strains isolated from ulcers were *cagA*⁺. The *cagA* gene is part of a 40-kb pathogenicity island (PAI) (the *cag* region) which can also contain the insertion sequence IS605. This sequence can cause large chromosome rearrangements that split the *cag* region in half [31]. The presence of IS elements may also cause rearrangements leading to partial or total deletions of the PAI [32]. Therefore, the presence of IS605 does not necessarily imply the presence of the *cagA* gene. This was demonstrated in our study because *cagA* and IS605 detections were not significantly associated. These particular genetic elements were previously demonstrated to be able to spread among the bacterial populations of other distantly related species by horizontal transfer [33]. IS605 is similar to an IS element found in the PAIs of *Dichelobacter nodosus* [33] and five of the 30 open reading frames within the *cagA* region have sequences similar to those of the *plt* gene of *Bordetella pertussis* and the *vir* gene of *Agrobacterium tumefaciens* [32,34]. Moreover, the observations that many *H. pylori* isolates contain plasmids [4,5], that some have phages [35] and that genomic rearrangements may occur [36] support the hypothesis of extensive recombination within this species. The mosaic structure of *vacA* is also consistent with this hypothesis. Several bacterial genes with similar mosaic structures have been described, including IgA proteases from *Neisseria gonorrhoeae* and penicillin binding proteins from *N. meningitidis* [7]. Such structures arise by horizontal transfer of DNA in species known to be naturally competent, a property shared with *H. pylori* [37]. These genetic transfers may occur when individuals are simultaneously infected with multiple *H. pylori* strains, as suggested by Atherton et al. [7]. However, even if transient multiple infection is more common than previously recognized, even in developed countries [38], *H. pylori* strains grow at many discrete foci in the gastric mucosa, with relatively little mixing [39], and so the opportunity for DNA transfer between different strains of *H. pylori* may be limited. Heterogeneity of the *H. pylori* species could give a selective advantage to this pathogen, allowing it to escape the defences of the host.

Acknowledgments

This study was financially supported by the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, by the Université de Poitiers and by the Conseil Général du Poitou-Charentes.

References

- [1] Marshall, B.J. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 983, 1273–1275.
- [2] Marshall, B.J. and Warren, J.R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 8390, 1311–1314.
- [3] Nomura, A., Stemmermann, G.N., Chyou, P.H., Kato, J., Perez-Perez, G.I., Zhao, X., Atherton, J.C. and Blaser, M.J. (1991) *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *New Engl. J. Med.* 325, 1132–1136.
- [4] Oudbier, J.H., Langenberg, W., Rauws, E.A.J. and Bruin-Mosch, C. (1990) Genotypical variation of *Campylobacter pylori* from gastric mucosa. *J. Clin. Microbiol.* 28, 559–565.
- [5] Simor, A.E., Shames, B., Drumm, B., Sherman, P., Low, D.E. and Penner, J.L. (1990) Typing of *Campylobacter pylori* by bacterial DNA restriction endonuclease analysis and determination of plasmid profile. *J. Clin. Microbiol.* 28, 83–86.
- [6] Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U. and Berg, D.E. (1992) PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.* 20, 6221–6225.
- [7] Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M., Tummuru, M.K.R., Blaser, M.J. and Cover, T.L. (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 270, 17771–17777.
- [8] Foxall, P.A., Hu, L.T. and Mobley, H.L.T. (1992) Use of the polymerase chain reaction-amplified *Helicobacter pylori* urease structural genes for differentiation of isolates. *J. Clin. Microbiol.* 30, 739–741.
- [9] Tee, W., Lambert, J., Smallwood, R., Schembri, M., Ross, B.C. and Dwyer, B. (1992) Ribotyping of *Helicobacter pylori* from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1562–1567.
- [10] Go, M.F., Kapur, V., Graham, D.Y. and Musser, J.M. (1996) Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multi-locus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J. Bacteriol.* 178, 3934–3938.
- [11] Maynard-Smith, J., Smith, N.H., O'Rourke, M. and Spratt, B.G. (1993) How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4384–4388.
- [12] Lenski, R.E. (1993) Assessing the genetic structure of microbial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4334–4388.
- [13] Desjardins, P., Picard, B., Kaltenböck, B., Elion, J. and Denamur, E. (1995) Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the

- clonal structure of the population: evidence from random amplified polymorphic DNA and restriction-fragment length polymorphism. *J. Mol. Evol.* 41, 440–448.
- [14] Mégraud, F., Bonnet, F., Garnier M. and Lamouliatte, H. (1985) Characterization of *Campylobacter pyloridis* by culture, enzymatic profile, and protein content. *J. Clin. Microbiol.* 22, 1007–1010.
- [15] Lee, A., O'Rourke, J., Deungria, M.C., Robertson, B., Daskalopoulos, G. and Dixon, M.F. (1997) A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 112, 1386–1397.
- [16] Bingen, E.H., Denamur, E. and Elion, J. (1994) Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 311–327.
- [17] Leying, H., Suerbaum, S., Geis, G. and Haas, R. (1992) Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol. Microbiol.* 6, 2863–2874.
- [18] Romero Lopez, C., Owen, R.J. and Desai, M. (1993) Differentiation between isolates of *Helicobacter pylori* by PCR-RFLP analysis of urease A and B genes and comparison with ribosomal RNA gene patterns. *FEMS Microbiol. Lett.* 110, 37–44.
- [19] Peek, R.M., Miller, G.G., Tham, K.T., Perez-Perez, G.I., Cover, T.L., Atherton, J.C., Dunn, G.D. and Blaser, M.J. (1995) Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *J. Clin. Microbiol.* 33, 28–32.
- [20] Greenacre, M.J. (1984) In: *Theory and Applications of Correspondences*, p. 364. Academic Press, London.
- [21] Lebart, L., Morineau, A. and Warwick, K.M. (1984) In: *Multivariate Descriptive Analysis and Related Techniques for Large Matrices*. Wiley Interscience, New York.
- [22] Tenenhaus, M. and Young, F.W. (1985) An analysis and synthesis of multiple correspondence analysis, optimal scaling, dual scaling, homogeneity analysis, and other methods for quantifying categorical multivariate data. *Psychometrika* 50, 91–119.
- [23] Clifford, H.T. and Stephenson, W. (1975) In: *An Introduction to Numerical Classification*, p. 229. Academic Press, New York.
- [24] Hazell, S.T., Andrews, R.H., Mitchell, H.M. and Daskalopoulos, G. (1997) Genetic relationship among isolates of *Helicobacter pylori*: evidence for the existence of a *Helicobacter pylori* species-complex. *FEMS Microbiol. Lett.* 150, 27–32.
- [25] Bisercic, M., Feutruer, J.Y. and Reeves, P.R. (1991) Nucleotide sequences of the *gnd* genes from nine natural isolates of *Escherichia coli*: evidence of intragenic recombination as a contributing factor in the evolution of the polymorphic *gnd* locus. *J. Bacteriol.* 173, 3894–3900.
- [26] Selander, R.K., Caugant, D.A. and Whittam, T.S. (1987) Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology (Ingraham, J.L. et al., Eds.), pp. 1625–1648. American Society of Microbiology, Washington, DC.
- [27] Denamur, E., Picard, B., Decoux, G., Denis, J.B. and Elion, J. (1993) The absence of correlation between allozyme and *rrn* analysis indicates a high gene flow rate within human clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 110, 275–280.
- [28] Owen, R.J., Bickley, J., Lastovica, A., Dunn, J.P., Borman, P. and Hunton, C. (1992) Ribosomal RNA gene patterns of *Helicobacter pylori* from surgical patients with healed and recurrent peptic ulcers. *Epidemiol. Infect.* 108, 39–59.
- [29] Desai, M., Linton, D., Owen, R.J., Cameron, H. and Stanley, J. (1993) Genetic diversity of *Helicobacter pylori* indexed with respect to clinical symptomatology, using a 16S rRNA and a species-specific DNA probe. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 574–582.
- [30] Linton, D., Moreno, M., Owen, R.J. and Stanley, J. (1992) 16S *rrn* gene copy number in *Helicobacter pylori* and its application to molecular typing. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 501–506.
- [31] Akopyanz, N., Kersulyte, D. and Berg, D.E. (1996) DNA rearrangements in the 40 kb *cag* (virulence) region in the *Helicobacter pylori* genome. *Gut* 39 (suppl. 2), A67.
- [32] Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. and Covacci, A. (1996) *cagA*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14648–14653.
- [33] Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühlendorfer, I. and Tschäpe, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 23, 1089–1097.
- [34] Tummuru, M.K.R., Sharma, S.A. and Blaser, M.J. (1995) *Helicobacter pylori* picB, a homologue of *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 18, 867–876.
- [35] Schmid, E.N., Von Recklinghausen, G. and Ansorg, R. (1990) Bacteriophages in *Helicobacter (Campylobacter) pylori*. *J. Med. Microbiol.* 32, 101–104.
- [36] Jiang, Q., Hiratsuka, K. and Taylor, D.E. (1996) Variability in gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol. Microbiol.* 20, 833–842.
- [37] Nedenskov-Sorensen, P., Bukholm, G. and Bovre, K. (1990) Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J. Infect. Dis.* 161, 365–366.
- [38] Logan, R.P.H. and Berg, D.E. (1996) Genetic diversity of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 348, 1462–1463.
- [39] Akopyanz, N., Eaton, K.A. and Berg, D. (1995) Adaptive mutation and cocolonization during *Helicobacter pylori* infection of gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* 63, 116–121.

Correlation between IL-8 induction, *cagA* status and *vacA* genotypes in 153 French *Helicobacter pylori* isolates

Céline Audibert^{a*}, Blandine Janvier^a, Bernadette Grignon^a, Laurence Salaün^a,
Christophe Burucoa^a, Jean-Claude Lecron^b, Jean-Louis Fauchère^a

^a Laboratoire de microbiologie A, IFR-FR59 (CNRS), CHU La Milétrie, 86021 Poitiers cedex, France

^b ESA CNRS 6031, IBMIG, 40, avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France

(Submitted 14 June 1999; accepted 29 November 1999)

Abstract — The polymorphism of clinical presentations associated with *Helicobacter pylori* infection is potentially due to differences in the virulence of individual strains. *H. pylori* virulence has been associated with the ability to induce secretion of interleukin-8 (IL-8), the *vacA* genotypes, and the *cagA* status. The aim of this study was to determine the virulence profiles of 153 French *H. pylori* isolates on the basis of *vacA* genotypes, *cagA* status, and IL-8 induction ability. A total of 153 *H. pylori* isolates from patients with chronic gastritis ($n = 74$) or gastro-duodenal ulcers ($n = 79$) was examined for *vacA* genotypes and *cagA* status by polymerase chain reaction (PCR) and dot blot, and for their ability to induce IL-8 secretion by HEp-2 cells. The prevalence of *vacA* genotypes was: s1/m1 44.3%, s1/m2 24.9%, and s2/m2 23.5%. The *cagA* gene was present in 64% of the strains. IL-8 secretion was induced by 58.7% of the isolates. The presence of the *cagA* gene was significantly correlated with the s1/m1 *vacA* genotype and with the induction of IL-8. Thirty-four strains were atypical (*cagA*-positive/IL-8 noninducer or *cagA*-negative/IL-8 inducer). *vacA* genotypes, *cagA* status, and IL-8 induction ability are not correlated with the presence or absence of ulcer. The *cagA* status is not sufficient to predict the proinflammatory ability of *H. pylori*. © 2000 Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS

Helicobacter pylori / virulence marker / IL-8 induction / *cagA* status / *vacA* genotypes

1. Introduction

Helicobacter pylori is a spiral-shaped Gram-negative bacterium. It colonizes the gastric mucosa of humans and persists over decades if not treated. It causes chronic infection leading to gastritis. The infection is mostly asymptomatic, but a few individuals will develop severe

diseases such as peptic ulcer disease (PUD), gastric adenocarcinoma, and mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma [4, 33]. *H. pylori* is the first bacterium associated with cancer [19, 21]. The polymorphism of the clinical manifestations associated with *H. pylori* infection is potentially due to differences in the virulence of individual *Helicobacter* strains. One of the characteristics of *H. pylori* is a high level of genomic diversity, as shown by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP), and PCR-based fingerprinting [7, 22, 25, 31, 39]. The genomic differences between the strains may affect virulence factors. Thus, this genomic diversity may be linked to the diversity of the clinical outcomes.

The two major virulence markers usually associated with the pathogenicity of *H. pylori*

* Correspondence and reprints

Tel.: + 33 (0)5 49 44 38 89; fax: + 33 (0)5 49 44 38 88;

celine_audibert@hotmail.com

Abbreviations: *cag* PAI, *cag* pathogenicity island; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue; MEM, minimum essential medium; MLEE, multilocus enzyme electrophoresis; PCR, polymerase chain reaction; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PUD, peptic ulcer disease; RAPD, random amplified polymorphic DNA; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SSC, salt sodium citrate buffer; TE, Tris-EDTA (buffer).

are the cytotoxin VacA and the presence of the CagA protein [10, 45]. The cytotoxin VacA is produced by 50–60% of the strains [11]. This toxin is highly immunoreactive and induces vacuolization of HeLa or primary gastric epithelial cells in vitro [12, 20, 28]. Several studies have shown that the presence of VacA is associated with PUD [37, 44]. The toxin is encoded by the *vacA* gene which is characterized by a mosaic structure: different types of signal sequences (s1 and s2) and midregions (m1 and m2) have been identified [3, 13]. The *vacA* signal sequence type s1, but not type s2, has been closely associated with in vitro cytotoxin activity and with in vivo peptic ulcer disease [3, 38].

The function of the CagA protein is currently unknown. CagA is encoded by the *cagA* gene reported to be present in 60–70% of European isolates [10, 45]. The presence of *cagA* has been statistically associated with duodenal ulceration, gastric mucosal atrophy, and gastric cancer [5, 10, 49], although recent studies denied this association [8, 24, 30]. The *cagA* gene is one of the 31 genes of a pathogenicity island called the *cag* pathogenicity island (*cag* PAI) [9]. The presence of *cagA* has been considered as a marker of the *cag* PAI and has been associated with the more virulent *H. pylori* strains [9]. Several studies conducted in different countries have shown that *vacA* s1/m1 and *cagA*-positive *H. pylori* strains were the most virulent strains and were associated with the ulcer disease [3, 5, 10, 37, 38, 44].

Another characteristic of *H. pylori* infection is the severe infiltration of polymorphonuclear neutrophils and mononuclear cells within the infected gastric mucosa [18, 50]. Accumulation and activation of these cells have been involved in the pathophysiology of the severe diseases associated with *H. pylori* infection. The recruitment and activation of these inflammatory cells have been suggested to be induced by the local production of cytokines and chemokines [6, 32]. Several studies based on a few strains demonstrated that *cagA*-positive *H. pylori* isolates, but not *cagA*-negative isolates, were able to induce IL-8 secretion in vitro and in vivo [14, 15, 23, 29, 36, 40]. Therefore, the ability to induce IL-8

secretion is recognized as one of the major virulence factors of *H. pylori* and seems to be important in the establishment of PUD [36]. Furthermore, mutagenesis of some of the genes of the *cag* PAI suppresses the IL-8 induction ability of *H. pylori* [1, 9, 46]. Thus, the genes of the *cag* PAI have been associated with the IL-8 induction capacity of *H. pylori* [46]. Strains inducing IL-8 secretion have been associated with the presence of the *cagA* gene and with severe diseases [16, 36].

The aim of this study was to look for a relationship between IL-8 induction ability, considered as a major virulence factor of *H. pylori*, and the genotypic virulence profile of the strains based on *vacA* genotypes and *cagA* status.

2. Materials and methods

2.1. Patients

Biopsy specimens were taken from 153 consecutive *H. pylori*-infected adults from a group of patients who had undergone upper gastrointestinal endoscopy in the Gastroenterology Department of Poitiers University Hospital because of dyspeptic complaints. None of the patients was receiving antisecretory or non-steroidal anti-inflammatory drugs. The patient population consisted of 107 males (aged 17–95 years, mean age 48.2 years), and 46 females (aged 22–86 years, mean age 57.6 years). The presence of an ulcer was based on endoscopic examination of the stomach and duodenum. The patient's history was investigated for an earlier diagnosis of peptic ulcer. If the patient's documented history or endoscopic examination showed peptic ulcer disease, the patient was considered to have an ulcer. In the other cases he was considered to have dyspepsia or gastritis only. Under these conditions, the patients were distributed into four groups: duodenal ulcer ($n = 46$), gastric ulcer ($n = 23$); both duodenal and gastric ulcers ($n = 10$) and nonulcer dyspepsia or chronic gastritis ($n = 74$).

2.2. *H. pylori* strains and culture conditions

Gastroduodenal biopsy specimens were sent to the laboratory in 1 mL of transport medium. The specimens were ground, spread on Colombia III agar plates containing 5% horse blood (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) and incubated under microaerobic conditions at 37 °C for 2–5 days. Bacteria were identified as *H. pylori* by standard criteria and the strains were stored at –80 °C in 10% glycerol broth. These were referred to as stock culture. Three reference strains were used as control: strains 84-183 (ATCC 53726) which is *vacA* s1b/m1, *cagA*-positive; 88-23 (CCUG 17874) which is *vacA* s1a/m1, *cagA*-positive and Tx30a (*vacA* s2/m2, *cagA*-negative).

2.3. DNA isolation

DNA was isolated from the cultured bacteria by harvesting cells from a plate and resuspending them in 500 µL of TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Bacteria were lysed by addition of 50 µL of a 10% sodium dodecyl sulfate solution and 1.25 µL of a 20 mg/mL proteinase K solution (Merck, Darmstadt, Germany). The mixture was incubated for 1 h at 37 °C. Proteins were precipitated by 500 µL of phenol-chloroform-isoamylalcohol (Eurobio, Les Ullis, France). After centrifugation, supernatant was removed and DNA was precipitated twice with absolute ethanol at –20 °C and washed with 75% ethanol at –20 °C (Merck). After centrifugation, the pellet was dried and resuspended in 200 µL of deionized water containing 50 µg/mL of RNase (Merck). The mixture was incubated 1 h at 60 °C and the DNA extracts were stored at –20 °C.

2.4. PCR-based typing

PCR reactions were performed in a volume of 100 µL using the polymerase rTaq (Pharmacia Biotech, Orsay, France). Conditions used were those recommended by the manufacturer. *vacA* genotyping was performed using primers and PCR conditions described by Atherton [2]. For detection of *cagA*, the previously described F1

and B1 primers were used [45]. PCR amplification was performed under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 7 min followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 56 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min, and final extension at 72 °C for 7 min. PCR products were visualized by electrophoresis on 1.8% agarose gels (Eurobio) after 20–30 min of migration at 150 V.

2.5. Analysis of *cagA* status by dot blot hybridization

To test the sensitivity and the specificity of PCR with *cagA*-specific primers, the 153 strains were analyzed by dot blotting. Genomic DNA was diluted 1/5 in 6 × salt sodium citrate buffer (SSC), denatured by 10-min heating at 100 °C and cooled on ice. One hundred microliters of denatured DNA were filtered through a 0.45-µ nitrocellulose membrane (BioRad, Ivry-sur Seine, France) using a dot blot 96-well apparatus filtration system. Membranes were air-dried and baked for 2 h at 80 °C. The *cagA* probe was generated by PCR from chromosomal DNA of *H. pylori* ATCC 26695 using F1 and B1 primers [45]. The PCR product was purified using the Prep-A-Gene purification kit (BioRad) according to the manufacturer's instructions. The DNA was labelled by random priming using the random primers DNA labelling system and α^{32} -dCTP (Gibco). The membranes were prehybridized in Rapid-hyb buffer (Amersham) at 65 °C for 15 min. The prehybridization mixture was replaced by the same fresh solution to which 50 µL of the labelled probe were added. After 3 h of incubation at 65 °C under rotative agitation, membranes were washed once in 1 × SSC containing 0.1% SDS at 65 °C for 30 min. Membranes were wrapped in plastic film and autoradiography was performed with X-ray film (Kodak) for 1 h at room temperature.

2.6. IL-8 induction by *H. pylori* strains

The strains were cultured on Colombia III agar plates containing 5% horse blood (BioMerieux) for 3 days at 37 °C under

microaerobic conditions. Bacteria were harvested and resuspended in *Brucella* broth containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Eurobio) and incubated 72 h at 37 °C under microaerobic conditions. The bacteria concentration was estimated by nephelometry and the suspension was centrifugated 15 min at 1 500 g. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in MEM (Eurobio) containing 10% FBS in order to obtain 5×10^8 bacteria/mL. This suspension was used to infect the cell culture.

HEp-2 cells (epidermoid carcinoma, ATCC CCL 23) were cultured in MEM (Eurobio) medium supplemented with 10% FBS (Eurobio), 1% gentamicin (Panpharma, Fougères, France) and 1% L-glutamine (BioMérieux). They were grown for 3 days at 37 °C, under 10% CO₂. The cells were trypsinized (BioMérieux), microscopically enumerated, and distributed in a 24-well microtiter plate at a final concentration of 1×10^5 cells/mL (1 mL/well). The microtiter plate was incubated 24 h at 37 °C prior to infection by 1 mL of the *H. pylori* suspension. A negative control (MEM alone) and a positive control (MEM + 100 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma, Saint Quentin, France) + 200 nM ionomycin (Sigma) were included in each experiment. All samples were tested in duplicate. Infected HEp-2 cells were incubated for 24 h at 37 °C. The medium was removed and centrifugated at 16 300 g for 20 min in order to remove the bacteria and the cell fragments. The supernatant was frozen prior to IL-8 measurement by ELISA. IL-8 measurement was performed using the specific ELISA kit provided by Diaclone (Besançon, France) according to the manufacturer's instructions.

2.7. Statistical method

Analysis of data was performed by using the χ^2 test with Yates' correction. Probability levels (*P*) of < 0.05% were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Distribution of *vacA* alleles

Among the 153 studied patients, we were able to isolate only a single strain of *H. pylori* from each of 149 carriers (see below). Table I shows the distribution of the 149 strains according to their *vacA* type. Within the s1 group, 60/112 (53.6%) isolates were s1a, 36/112 (32.1%) were s1b, and 16/112 (14.3%) were only typeable as s1. Therefore, we studied the genotypes using s1 and s2 types without referring to the s1a or s1b subgroups. Under these conditions, three of the four possible combinations of signal sequence and middle-region types were identified. The s1/m1 type was found in 66/149 (44.3%) of isolates, the s1/m2 type in 37/149 (24.9%) of isolates, the s2/m2 type in 35/149 (23.5%) of isolates, the s1/mx, s2/mx and sx/m2 in 9/149, 1/149 and 1/149 (6, 0.7 and 0.7%) isolates, respectively. *vacA* types (s1/m1, s1/m2 or s2/m2) did not correlate with the presence of ulcer (whether duodenal or gastric).

For one patient, *vacA* genotyping provided positive results with both s1a- and s1b-specific primers. For three other patients, m-specific primers amplified DNA from both m1 and m2 *vacA* types. PCR was carried out on total genomic DNA from several colonies, and not from single isolated colonies from a biopsy specimen. Therefore, we hypothesized that those patients had two distinct populations of strains. These four patients were not included in the *vacA* results analysis.

3.2. *cagA* status and relationship with *vacA* genotype

The *cagA* status of the 153 strains was determined by PCR and dot blot hybridization. Strains were designated *cagA*-negative if they were negative for both of these investigations. All the others were designated as *cagA*-positive strains. The correlation between results obtained for *cagA* by PCR and dot blot hybridization was 100%. Under these conditions, 98/153 strains (64%) were *cagA*-positive (table I). No correlation was found between the *cagA*

Table I. Relationship between *vacA* genotypes, *cagA* status, IL-8 induction, and virulence genotypes of *H. pylori* strains and associated clinical manifestations.

Virulence marker	NUD	Duodenal ulcer	Gastric ulcer	Both DU & GU	Total	χ^2
<i>vacA</i> s1	54	34	15	9	112	NS
<i>vacA</i> s2	18	10	8	0	36	
<i>vacA</i> sx	1	0	0	0	1	
<i>vacA</i> m1	35	18	8	5	66	NS
<i>vacA</i> m2	32	26	12	3	73	
<i>vacA</i> mx	6	0	3	1	10	
<i>cagA</i> -positive	49	29	13	7	98	NS
<i>cagA</i> -negative	25	17	10	3	55	
IL-8 inducer	46	22	8	5	81	NS
IL-8 noninducer	22	18	13	4	57	
Combination of markers						
<i>cagA</i> +/ <i>vacA</i> s1/m1	34	18	7	3	62	NS
<i>cagA</i> -/ <i>vacA</i> s2/m2	17	10	6	0	33	
All other combinations	22	16	10	6	54	

The *vacA* genotypes were determined by PCR, *cagA* status was determined by PCR and dot blot hybridization. NS, not significant; NUD, nonulcer dyspepsia; sx, mx, strains not typeable as either s1 and s2, or m1 and m2.

status and the presence or absence of ulcer. The presence of the marker *cagA* was highly correlated with the *vacA* signal sequence type s1 and the midregion type m1 ($P < 0.0001$) (table II).

3.3. IL-8 induction and correlation with *cagA* status and *vacA* genotypes

The ability of *H. pylori* to induce IL-8 secretion was investigated using 138 of the 153 isolates. To distinguish the IL-8 inducer from the IL-8 noninducer strains, a cut-off value was determined using the *cagA*-negative reference strain Tx30a which is known to induce low IL-8 secretion. HEP-2 cells infected by Tx30a regularly produced 25 pg/mL of IL-8 (SD = 22.9) under the experimental conditions used. Strains inducing IL-8 production above the mean 25 pg/mL + 2 SD (corresponding to a threshold value of 71 pg/mL) were considered as IL-8 inducers, whereas strains inducing production

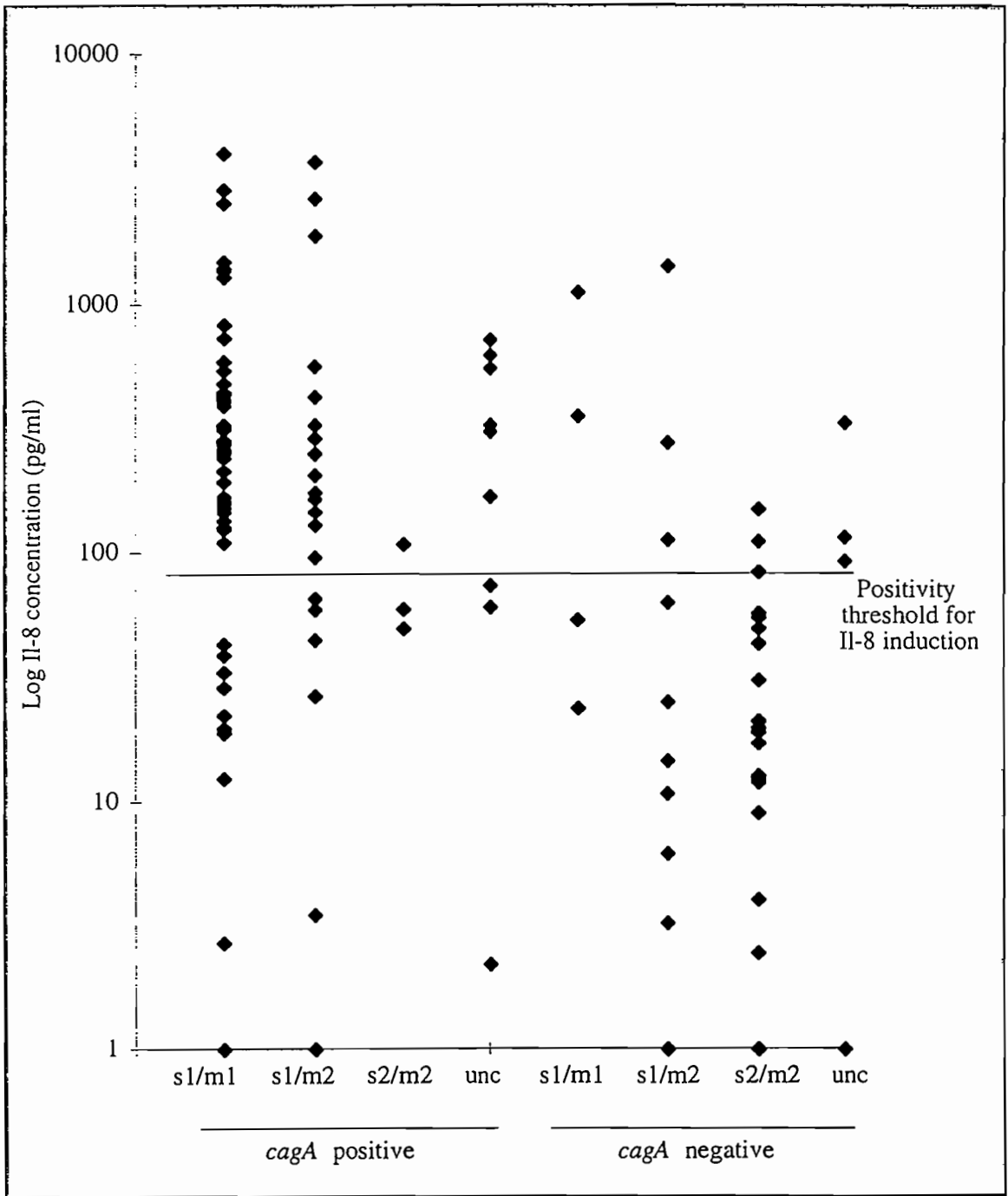
of IL-8 below 71 pg/mL were considered as IL-8 noninducers. Among the 138 tested strains, 81 (58.7%) induced IL-8 secretion (from 71 to 4 071 pg/mL) by the HEP-2 cells and 57 (41.3%) induced low IL-8 secretion (from 0 to 71 pg/mL). The ability of a given strain to induce IL-8 secretion did not correlate with the presence of a duodenal ulcer, gastric ulcer, or nonulcer dyspepsia (NUD) (table I).

Of the 81 IL-8 inducers, 70 (86.4%) were *cagA*-positive, while of the 57 IL-8 noninducers, 23 (40.4%) were *cagA*-positive. This difference is highly significant ($P = 0.0001$). Thus, *cagA*-positive strains were significantly associated with the induction of IL-8 secretion. However, 23/93 (24.7%) of the *cagA*-positive strains did not induce IL-8 secretion and 11/45 (24.4%) of the *cagA*-negative strains induced IL-8 secretion (from 84 to 1 421 pg/mL). Those 34 strains were referred to as atypical in terms of their ability to induce IL-8 secretion.

Table II. Relationship between *vacA* genotypes and *cagA* status.

<i>vacA</i> genotype	<i>cagA</i> -positive	<i>cagA</i> -negative	P
s1	92	20	0.0001
s2 sx	30	33	
m1	62	4	0.0001
m2	26	47	
mx	7	3	

Figure 1 shows the distribution of *H. pylori* strains according to their *vacA* genotypes, *cagA* status, and ability to induce IL-8 secretion. IL-8 inducers were more frequently *vacA* s1/m1 and *cagA* positive, and IL-8 noninducers were more frequently *vacA* s2/m2 and *cagA*-negative ($P = 0.0001$). Figure 1 shows the position of the



unc = unclassified (s1/mx, s2/mx, sx/m2 and double population).

Figure 1. Distribution of 138 *H. pylori* strains typed for IL-8 induction in terms of their *vacA* genotypes and *cagA* status. unc = unclassified (s1/mx, s2/mx, sx/m2 and double population).

atypical strains (IL-8 noninducer/*cagA*-positive and IL-8 inducer/*cagA*-negative).

4. Discussion

H. pylori infections can cause serious illnesses, including gastric and duodenal ulcers, atrophic gastritis, and gastric cancer. The genetic diversity of *H. pylori* surely has importance in this clinical polymorphism [4, 33]. It is now recognized that inflammation is crucial for the evolutive pathway leading from *H. pylori* infection to severe diseases, and strains with high inflammatory power are associated with severe evolution. IL-8 induction is one of the recognized markers of the inflammatory power of a given strain [2, 15]. In this work, we demonstrated that *vacA* genotypes and *cagA* status are not sufficient to predict the IL-8 induction ability and the inflammatory power of a strain.

We employed *vacA* genotyping to characterize 153 individual *H. pylori* isolates [3]. Seventy-five percent of the strains contained the signal sequence type s1. The predominant type was s1/m1, which was also the case in most of the European and North American studies [3, 27, 49]. As previously observed, the s2/m1 type was not found [3, 27, 38]. The distribution of the different genotypes in our *H. pylori* population was close to that described in several studies [3, 27, 48].

For four of the 153 patients, PCR results revealed multiple genotypes suggesting the presence of multiple strains in clinical samples. These findings had already been reported using different techniques such as RAPD, oligofingerprinting, and PCR-RFLP of the *ureC* gene [34, 42, 43]. Those studies carried out in European and North American countries revealed that colonization by more than one strain was rare but did exist. Van Doorn et al. [47] found that 8% of Dutch biopsy specimens had multiple *vacA* genotypes, whereas 29% of Portuguese samples had multiple *vacA* genotypes. In our study, we presumed that 4/153 (2.6%) of the samples harbored multiple strains.

The PCR primers and the probe for dot blot hybridization used for the detection of the *cagA*

gene were directed to the parts of the gene that appeared to be the most highly conserved [10, 45]. Sixty-four percent of all isolates were *cagA*-positive by PCR and dot blot, which was in agreement with the results of other studies [3, 48, 49]. We confirmed that the *vacA* m1 and s1 types were strongly associated with the presence of the *cag* PAI marker *cagA*, whereas the m2 and s2 types lacked the *cagA* gene [3, 27, 48, 49].

In our study, none of the signal sequence types (s1 or s2) or midregion types (m1 or m2) correlated with the clinical manifestations of the infection. Nor did *cagA* status correlate with clinical manifestations. No correlations were found when considering duodenal and gastric ulcers separately: 63% of strains isolated from patients with duodenal ulcer and 56.5% of strains isolated from patients suffering from gastric ulcer were *cagA*-positive. These findings are in contradiction with numerous studies associating s1 and *cagA*-positive status with PUD [3, 27, 38, 48]. However, other studies did not find any correlation between the *cagA* status and the clinical manifestations of the infection [8, 24, 30]. We believe that this discrepancy is due in part to the fact that the clinical and histopathological presentation of the illness reported at the time of the endoscopic examination do not account for the intrinsic pathogenicity of the infecting strain. Patients belonging to the gastritis group may have suffered from ulcers before or might suffer from ulcers in the future. Moreover, host factors may influence the clinical outcome. Such host factors are not yet known, but may involve the immune response as well as alimentary habits, smoking, alcoholism, or age. Furthermore, the bacterial markers studied may not be sufficient to evaluate the virulence of *H. pylori* strains, and clinically relevant virulence markers may not be expressed under in vitro conditions. A study by Gunn et al. [26] revealed that, in some cases, in vitro strains were not representative of in vivo strains. These findings stress the need for reliable PCR techniques carried out directly on biopsy samples in order to identify the genotypic markers of virulence of *H. pylori*. The

multiple strain population must be taken into account as well: an s2/m2 type strain can be detected in an ulcerogenic patient, but such a patient could possess an s1/m1 strain which has not been detected.

To further investigate the pathogenicity of *H. pylori* strains, and because the *vacA* and *cagA* criteria did not seem to be the best markers for assessing the virulence of the strains, we evaluated the ability of the bacteria to induce IL-8 secretion in vitro. Chemokines belonging to the CXC intercrine family of cytokines, such as IL-8, play a major role in mobilizing cellular defense mechanisms to eliminate pathogens by recruiting and activating neutrophils and T cells [35]. Recent studies indicate that IL-8 secreted by epithelial cells may be the initial signal for the acute inflammatory response following bacterial invasion of mucosal surfaces [41]. In *H. pylori* infection, there is an increased mucosal production of IL-8 which may be an important mediator of the inflammatory response that contributes to mucosal injury. Numerous studies showed that *cagA*-positive *H. pylori* strains induced IL-8 secretion, whereas *cagA*-negative isolates did not [16, 29, 40, 50]. However, those in vitro studies were carried out using only a few *H. pylori* isolates (5–15), not enough to generalize the conclusion that *cagA* is associated with IL-8 secretion. We confirmed the previous finding that *cagA*-positive *H. pylori* strains induce significantly higher levels of IL-8 secretion than *cagA*-negative strains [14, 15, 36]. However, our study revealed several unexpected results: 11 strains were *cagA*-positive but IL-8 noninducers, whereas 23 *cagA*-negative strains induced IL-8 secretion.

It is recognized that the *cagA* gene is the marker for the *cag* PAI. Several studies showed that most of the 30 genes of the *cag* PAI are required for induction of IL-8 secretion [1, 9, 46], although the *cagA* gene is not required for IL-8 secretion [17, 40]. The *cagA*-negative strains inducing IL-8 may possess the *cag* PAI without the *cagA* gene. However, for five of the eleven *cagA*-negative/IL-8 inducer strains, the amount of IL-8 produced was low (between 84 and 114 pg/mL). It can be hypothesized that those

five strains were not IL-8 inducers, suggesting that the threshold used (71 pg/mL) was too low. Nevertheless, the six remaining *cagA*-negative strains were true IL-8 inducers, as the amount of IL-8 induced by those strains was high (between 151 and 1 422 pg/mL). On the other hand, the *cagA*-positive strains not inducing IL-8 secretion may possess the *cagA* gene but may lack some crucial genes of the *cag* PAI, explaining why those strains were not inducing IL-8 production. Jenks et al. [30] showed that only 84% of the *cagA*-positive strains had an entire *cag* PAI, suggesting that *cagA* may not be the best marker of the presence of the *cag* PAI. Further studies of the entire *cag* PAI are in progress in our laboratory. These studies should reveal the structure of the *cag* PAI and may help to understand the discrepancy between *cagA* status and IL-8 induction.

Bacterial markers able to predict the severity of the disease associated with *H. pylori* infection remain to be discovered. IL-8 induction power is generally recognized as a marker of *H. pylori* proinflammatory power. However, *cagA* status is not sufficient to predict IL-8 induction ability and does not appear to be a suitable marker of the inflammatory power of *H. pylori* strains.

Résumé — Corrélation entre l'induction d'IL-8, le statut *cagA* et les géotypes *vacA* dans 153 isolats français de *Helicobacter pylori*. Le polymorphisme des manifestations cliniques associées à l'infection à *Helicobacter pylori* est probablement dû en partie à des différences de virulence des souches. La virulence de *H. pylori* a été associée à la capacité d'induire la sécrétion d'IL-8, les géotypes *vacA* et le statut *cagA*. Le but de cette étude était de déterminer les profils de virulence de 153 isolats français de *H. pylori* sur la base du géotype *vacA*, du statut *cagA* et de la capacité d'induire la sécrétion d'IL-8. Les 153 souches de *H. pylori* provenaient de patients présentant une gastrite chronique ($n = 74$) ou un ulcère gastro-duodéal ($n = 79$). Le géotype *vacA* et le statut *cagA* ont été déterminés par PCR et *dot blot*, et la capacité d'induire la sécrétion d'IL-8 par co-culture des souches avec la lignée cellulaire HEp-2. La prévalence des géotypes *vacA* est de : s1/m1 44,3 %, s1/m2 24,9 % et s2/m2 23,5 %; *cagA* est présent chez 64 % des souches. Cinquante-huit

pour cent des souches induisent la sécrétion d'IL-8. La présence de *cagA* est significativement corrélée avec le type s1/m1 et avec la sécrétion d'IL-8. Trente-quatre souches sont atypiques (*cagA* positive/IL-8 noninductrice ou *cagA*-négative/IL-8 inductrice). Les génotypes *vacA*, le statut *cagA* ou l'aptitude à induire la sécrétion d'IL-8 ne sont pas corrélés avec les manifestations cliniques de l'infection. Le statut *cagA* seul n'est pas suffisant pour prédire le pouvoir pro-inflammatoire de *H. pylori*. © 2000 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

Helicobacter pylori / marqueur de virulence / induction d'IL-8 / statut *cagA* / génotypes *vacA*

Acknowledgments

We thank the University of Poitiers and the Fondation pour la Recherche Médicale for their financial support.

References

- [1] Akopyants N., Clifton S., Kersulyte D., Crabtree J.E., Youree B.E., Reece C.A., Bukanov N.O., Drazek E.S., Roe B.A., Berg D.E., Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, *Mol. Microbiol.* 28 (1998) 37–53.
- [2] Atherton J.C., *Helicobacter pylori* virulence factors, *Br. Med. Bull.* 54 (1998) 105–120.
- [3] Atherton J.C., Cao P., Peek Jr R.M., Tummuru M.K., Blaser M.J., Cover T.L., Mosaicism in vacuolation cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 17771–17777.
- [4] Blaser M.J., Ecology of *Helicobacter pylori* in the human stomach, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 759–762.
- [5] Blaser M.J., Perez-Perez G.I., Kleanthous H., Cover T.L., Peek M., Chyou P., Stemmermann G.N., Normura A., Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach, *Cancer Res.* 55 (1995) 2111–2115.
- [6] Bodger K., Crabtree J.E., *Helicobacter pylori* and gastric inflammation, *Br. Med. Bull.* 54 (1998) 139–150.
- [7] Bukanov N., Berg D., Ordered cosmid library and high-resolution physical-genetic map of *H. pylori* strains NCTC 11638, *Mol. Microbiol.* 11 (1994) 509–523.
- [8] Busolo F., Bertollo G., Bordignon G., Madia D., Camposampiero D., Detection and characterisation of *Helicobacter pylori* from patients with gastroduodenal diseases, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 31 (1998) 531–536.
- [9] Censini S., Lange C., Xiang Z., Crabtree J., Ghiara P., Borodovsky M., Rappuoli R., Covacci A., *cag*, a pathogenicity island of *H. pylori*, encodes type-I specific and disease-associated virulence factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 14648–14653.
- [10] Covacci A.S., Censini S., Bugnoli M., Petracca R., Burrioni D., Machia G., Massone A., Papini E., Xiang Z., Figura N., Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 5791–5795.
- [11] Cover T., Cao P., Lind C., Tham K.T., Blaser M., Correlation between vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates in vitro and in vivo, *Infect. Immun.* 61 (1993) 5008–5012.
- [12] Cover T., Dooley C.P., Blaser M.J., Characterization of an human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity, *Infect. Immun.* 58 (1990) 603.
- [13] Cover T., Tummuru M.K., Cao P., Thompson S.A., Blaser M.J., Divergence of genetic sequences in the vacuolating cytotoxin among *H. pylori* strains, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 10566–10573.
- [14] Crabtree J., Covacci A., Farmery S., Xiang Z., Tompkins D., Perry S., Lindley I., Rappuoli R., *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype, *J. Clin. Pathol.* 48 (1995) 41–45.
- [15] Crabtree J., Farmery S., Lindley I., Figura N., Peichl P., Tompkins D., CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines, *J. Clin. Pathol.* 47 (1995) 945–950.
- [16] Crabtree J., Wyatt J., Trejdosiewicz L., Peichl P., Nichols P., Ramsay N., Primrose J., Lindley I., IL-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa, *J. Clin. Pathol.* 47 (1994) 61–66.
- [17] Crabtree J.E., Xiang I.J.D., Tompkins D.S., Rappuoli R., Covacci A., Induction of IL-8 secretion from gastric epithelial cells by *cagA*-negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*, *J. Clin. Pathol.* 48 (1995) 967–969.
- [18] Dixon M.F., *Helicobacter pylori* and peptic ulceration: histopathological aspects, *J. Gastroenterol. Hepato.* 6 (1991) 126–130.
- [19] Eurogast study group, An international association between *H. pylori* and gastric cancer, *Lancet* 341 (1993) 359–62.
- [20] Figura N., Gugliemetti P., Rossolini A., Cytotoxin production by *H. pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only, *J. Clin. Microbiol.* 27 (1989) 225–226.
- [21] Fischbach W., Tacke W., Greiner A., Konrad H., Müller-Hermelink, Regression of immunoproliferative small intestine disease after eradication of *Helicobacter pylori*, *Lancet* 349 (1997) 31–32.
- [22] Fujimoto S., Marshall B., Blaser M., PCR-based Restriction Fragment Length Polymorphism typing of *H. pylori*, *J. Clin. Microbiol.* 32 (1994) 331–334.
- [23] Gionchetti P., Vaira D., Campieri M., Holton J., Menegatti M., Belluzzi A., Bertinelli E., Ferretti M., Brignola C., Miglioli M., Barbara L., Enhanced mucosal IL-6 and -8 in *Helicobacter pylori*-positive dyspeptic patients, *Am. J. Gastroenterol.* 89 (1994) 883–887.
- [24] Go M.F., Graham D.Y., Presence of the *cagA* gene in the majority of *Helicobacter pylori* strains is independent of whether the individual has duodenal ulcer or asymptomatic gastritis, *Helicobacter* (1996) 107–111.
- [25] Go M.F., Kapur V., Graham D.Y., Musser J.M., Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinant population structure, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 3994–3998.
- [26] Gunn M.C., Stephens J.C., Stewart J.D., Rathbone B.J., Detection and typing of the virulence determinants *cagA* and *vacA* of *Helicobacter pylori* directly from biopsy DNA: are in vitro strains representative of in vivo strains?, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 10 (1998) 683–687.
- [27] Han S.R., Schreiber H.J., Bhakdi S., Loos M., Maeurer M., *vacA* genotypes and genetic diversity in clinical isolates of *Helicobacter pylori*, *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 5 (1998) 139–145.
- [28] Harris P.R., Cover T.L., Crowe D.R., Orenstein J.M., Graham M.F., Blaser M., Smith P.D., *Helicobacter pylori* cytotoxin induces vacuolation of primary human mucosal epithelial cells, *Infect. Immun.* 64 (1996) 4967–4971.
- [29] Huang J., O'Toole P., Doig P., Trust T., Stimulation of interleukin-8 production in epithelial cell lines by *Helicobacter pylori*, *Infect. Immun.* 63 (1995) 1732–1738.
- [30] Jenks P.J., Megraud F., Labigne A., Clinical outcome after infection with *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the *cag* pathogenicity island, *Gut* 43 (1998) 752–758.

- [31] Jiang Q., Hiratsaka K., Taylor D., Variability of gene order in different *H. pylori* strains contributes to genome diversity, *Mol. Microbiol.* 20 (1996) 833–42.
- [32] Katagiri M., Asaka M., Kobayashi M., Kudo M., Kato M., Takeda H., Increased cytokine production by gastric mucosa in patients with *Helicobacter pylori* infection, *J. Clin. Gastroenterol.* 25 S (1997) 211–4.
- [33] Marshall B.J., Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet* 983 (1983) 1273–1275.
- [34] Marshall D.G., Coleman D.C., Sullivan D.J., Xia H., O'Morain C.A., Smyth C.J., Genomic fingerprinting of clinical isolates of *Helicobacter pylori* using oligonucleotide probes containing repetitive sequences, *J. Appl. Bacteriol.* 81 (1996) 509–517.
- [35] Oppenheim J.J., Zachariae C.O.C., Mukaiada N., Matsushima K., Properties of the novel proinflammatory supergene intercrine cytokine family, *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 617–648.
- [36] Peek R.M., Miller G., Tham K., Perez-Perez G., Zhao X., Atherton J.C., Blaser M.J., Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA+* *H. pylori* strains, *Lab. Investigation* 71 (1995) 760–770.
- [37] Phadnis S.H., IJver D., Janzon L., Normark S., Westblom T.U., Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*, *Infect. Immun.* 62 (1994) 1557–1565.
- [38] Rudi J., Kolb C., Kuck D., Sieg A., Galle P., 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.* 36 (1998) 944–948.
- [39] Salaun L., Audibert C., LeLay G., Burucoa C., Fauchère J.L., Picard B., Panmictic structure of *Helicobacter pylori* demonstrated by the comparative study of six genetic markers, *FEMS Microbiol. Lett.* 161 (1998) 231–239.
- [40] Sharma S., Tummuru M., Miller G., Blaser M., Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation *in vitro*, *Infect. Immun.* 63 (1995) 1681–1687.
- [41] Shimoyama T., Crabtree J.E., Mucosal chemokines in *Helicobacter pylori* infection, *J. Physiol. Pharmacol.* 48 (1997) 315–323.
- [42] Shortridge V.D., Stone G.G., Flamm R.K., Beyer J., Versalovic J., Graham D.W., Tanaka S.K., Molecular typing of *Helicobacter pylori* isolates from a multicenter US clinical trial by *ureC* restriction fragment length polymorphism, *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 471–473.
- [43] Taylor N.S., Fox J.G., Akopyants N.S., Berg D.E., Thompson N., Shames B., Yan L., Fontham E., Janney F., Hunter F.M., Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting, *J. Clin. Microbiol.* 33 (1995) 918–923.
- [44] Telford J.L., Ghiara P., Dell'orco M., Comanducci M., Burrioni D., Bugnoli M., Tecce M.F., Censini S., Covacci A., Xiang Z., Paini E., Montecucco C., Parent L., Rappuoli R., Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease, *J. Exp. Med.* 179 (1994) 1653–1658.
- [45] Tummuru M., Cover T.L., Blaser M.J., Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence on linkage to cytotoxin production, *Infect. Immun.* 61 (1993) 1799–1809.
- [46] Tummuru M., Sharma S., Blaser M., *Helicobacter pylori picB*, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells, *Mol. Microbiol.* 18 (1995) 867–876.
- [47] van Doorn L.J., Figueiredo C., Rossau R., Jannues G., vanAsbroeck M., Sousa J.C., Carneiro F., Quint W.G., Typing of *Helicobacter pylori vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridization, *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998) 1271–1276.
- [48] van Doorn L.J., Figueiredo C., Sanna R., Plaisier A., Schneeberger P., deBoer W., Quint W., Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* status of *Helicobacter pylori*, *Gastroenterology* 115 (1998) 58–66.
- [49] Warburton V.J., Everett S., Mapstone N.P., Axon A.T., Hawkey P., Dixon M.F., Clinical and histological association of *cagA* and *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis, *J. Clin. Pathol.* 51 (1998) 55–61.
- [50] Yamaoka Y., Kita M., Kodama T., Sawai N., Kashima K., Imanishi J., Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains, *Gut* 41 (1997) 442–451.

Publication en préparation

Random Amplified DNA and Multilocus Enzyme Electrophoresis typing show far more genetic exchange in *Helicobacter pylori* than in *Escherichia coli* and some other microorganisms.

Running title: MLEE and RAPD study of *H. pylori*

LAURENCE SALAÜN,^{1,2} BERTRAND PICARD,² JEAN-LOUIS FAUCHÈRE,³ BRUNO OURY,¹ MICHEL TIBAYRENC,¹ AND CHRISTIAN BARNABÉ¹ *

Centre d'Etude sur le Polymorphisme des Microorganismes (CEPM), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier ¹; Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine, Brest ²; and Laboratoire de Microbiologie A, CHU La Milétrie, Poitiers ³. France.

* Corresponding author. Mailing address: Centre d'Etude sur le Polymorphisme des Microorganismes (CEPM), UMR CNRS/IRD no 9926, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France. Phone: +33 4 67 41 62 72. Fax: +33 4 67 41 62 99. E-mail: Christian.Barnabe@cepm.mpl.ird.fr.

ABSTRACT

We have conducted an evolutionary genetic analysis of *Helicobacter pylori* based on 9 multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) loci and 12 random primed amplified polymorphic DNA (RAPD) primers. Eighty seven stocks of *H. pylori*, including 57 clinical stocks from France and 21 clinical stocks from Asia and South America were analysed. The data were subjected to a linkage disequilibrium analysis in order to evaluate the respective impact of genetic exchange and clonal propagation on *H. pylori* population structure. The phylogenetic relationships among the genotypes recorded were depicted by the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) and the neighbor joining methods. No repeated genotypes were observed for either MLEE or RAPD analyses. All enzyme systems and RAPD primers proved to be polymorphic. Linkage disequilibrium tests were almost constantly negative. These results support the still debated hypothesis that *H. pylori* is a highly recombinant species. Comparison with other studies from our group indicate that the impact of gene exchange in *H. pylori* is much higher than in *Escherichia coli*, and even more, than in American trypanosomes. Our data show that *H. pylori* genetic variability is associated neither with geographic localities nor with pathological traits.

INTRODUCTION

Helicobacter pylori, the etiologic agent of several human gastroduodenal diseases, exhibits a wide genetic diversity. Differences among stocks consist, at a macrodiversity level, in genome size heterogeneity (60), chromosomal rearrangements (31), presence or not of plasmids (45, 55) and, at a microdiversity level, with gene size heterogeneity (15), presence of insertion sequences (13, 32), strain-specific genes (3), mosaic genes (5), point mutations especially in 23S rRNA genes which can lead to antibiotic resistance (61). However, the genomic sequence comparison of two *H. pylori* stocks has revealed that these two stocks were highly similar, with a limited number of discrete regions differently organized (3).

The population structure of *H. pylori* species is still under debate. A currently proposed working hypothesis is a potentially panmictic structure (1, 22, 51, 59). However, more recently, it has been suggested (25) that *H. pylori* is clonal, like many other bacterial (44) and parasitic species (63).

Population structure has strong implications on the relevant biomedical properties of pathogens (63). If the species under study is clonal, its multilocus genotypes propagate themselves unchanged like “genetic photocopies”, which makes them convenient markers for epidemiological surveys. Moreover, in a species that undergoes clonal evolution, the clones tend to accumulate divergent mutations, including for those genes that govern medical properties such as pathogenicity or resistance to drugs. One therefore expects a correlation between genetic divergence and differences in medical properties. Lastly, when a mutation that drives a relevant property such as drug resistance appears, it does not spread in the whole species and remains confined in its own clone. If the species is sexual, the opposite picture is expected.

Except for the study published by Go *et al.* (22), no studies rely on direct comparisons between *H. pylori* and other microorganisms species, which makes it difficult to have a precise idea on the actual level of genetic diversity and of recombination in this species. In order to fill this gap, we have used two markers that can be used for any kind of organism, and therefore allow interspecies comparisons (“generalist markers”) (62). The first marker is multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), which has been used in the first works dealing with population structure of *H. pylori* (22, 26). The second marker is Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (73, 75). RAPD, usually designed for epidemiologic studies in several species, and especially in the case of *H. pylori* (9, 14, 36, 39, 68), has been used for population genetics purposes in some bacterial (16) or parasites species (64).

The present study deals with 87 *H. pylori* stocks sampled in different geographic areas, and characterized by MLEE and RAPD using specific evolutionary genetic analyses. Direct comparisons are made with other pathogens studied by our team with the same techniques and the same statistics.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial stocks. *H. pylori* stocks were recovered from gastric biopsy samples of 78 patients with gastritis, ulcers or cancers, collected from 1992 to 1998, in several geographic areas, mainly in France (Brest and Poitiers). Nine reference *H. pylori* stocks were included (Table 1). *H. mustelae* ATCC 43772, *H. hepaticus* ATCC 51448, *Campylobacter jejuni* 855 and *C. coli* 85Y (17) were included as outgroups for phylogenetic analysis. All stocks were grown on Pylori agar (but the outgroups) and trypticase soy agar with 5% Horse blood (BioMérieux, Lyon, France).

Cultures were incubated between 3 and 6 days at 37°C under microaerophilic conditions (CampyPak Plus, Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA). Cultures were stored in 10% v/v glycerol in trypticase soy broth (BioMérieux, Lyon, France) at -80°C. Bacterial DNA was isolated as previously described (2). For each *H. pylori* stock, *cagA* status was determined by PCR according to ref (48).

Multilocus enzyme electrophoresis. Cells were washed in PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 10mM, NaCl 150 mM, pH 7.2), then lysed in an enzyme stabilizer (NADP 0.01% (w/v), β-mercaptoethanol 0.1% (v/v), Triton X100 0.1% (v/v)) (49), on ice for 20 min. After centrifugation (12000g, 10 min, 4°C), the soluble fraction was stored at -70°C until used in MLEE analysis. MLEE was performed on cellulose acetate plates (Helena Laboratories, Beaumont, Texas, USA). Out of the 28 enzyme systems assayed, 9 were kept for their low frequency of null alleles occurrence. The following 9 enzyme systems were used: adenylate kinase (AK, EC 2.7.4.3), aspartate aminotransferase (GOT, EC 2.6.1.1), diaphorase (DIA-NADH, EC 1.6.99.2), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49), glutamate dehydrogenase NADP⁺ (GDH-NADP⁺, EC 1.4.1.4), isocitrate dehydrogenase (IDH, EC 1.1.1.42), nucleoside phosphorylase (NP, EC 2.4.2.1), peptidase 1 (substrate: L-leucyl-leucine-leucine) (PEP1, EC 3.4.22.3) and superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1). A TBE (Tris 1 M, Borate 1.3 M, EDTA 0.03 M, pH 8) buffer system was used for electrophoresis, with different gel and tray buffer concentrations depending on the enzyme system studied (Table 2). Detection of enzyme activity was according to the methods of Ben Abderrazak *et al.* (7), Richardson *et al.* (49) and Selander *et al.* (54).

Random amplified polymorphic DNA and hybridizations. Eighty three different decameric primers were screened on a reference panel of *H. pylori* stocks. The primers corresponded to the A, B, F, N, R and U kits from Operon Technologies (Inc., Alameda, USA). The amplification reactions were performed in a final volume of 60 µl containing 0.9 units of *Taq* polymerase (Boehringer Mannheim), 100 µM each dNTP, 200 nM primer, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, and 20 ng template DNA. The amplification cycle consisted of an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 45 cycles (denaturation: 1 min at 94°C; annealing: 1 min at 36°C; elongation: 2 min at 72°C) and by a final elongation step of 7 min at 72°C. Amplification were performed in a PTC-100 thermocycler (MJ Research). Random amplified polymorphic DNA products were analysed by electrophoresis in 1.6% agarose gels in TAE buffer (Tris-acetate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.2) stained with ethidium bromide (0.5

$\mu\text{g/ml}$) and visualized under ultra-violet light. The 12 primers that gave the more reproducible profiles were selected: A-11 5'-CAATCGCCGT-3', A-13 5'-CAGCACCCAC-3', A-17 5'-GACCGCTTGT-3', B-01 5'-GTTTCGCTCC-3', B-05 5'-TGCGCCCTTC-3', B-15 5'-GGAGGGTGT-3', F-07 5'-CCGATATCCC-3', N-04 5'-GACCGACCCA-3', N-05 5'-ACTGAACGCC-3', N-09 5'-TGCCGGCTTG-3', R-10 5'-CCATTCCCCA-3' and U-12 5'-TCACCAGCCA-3'. The population genetic approach used in this study relies on the analysis of independent genes. In order to verify that different RAPD primers amplify independent genomic regions, molecular hybridization experiments (Southern-blot and Dot-blot) were performed according to ref (46) with slight modifications. Dot-blot experiments consisted of 48 spots corresponding to the RAPD products (10 ng) of 8 stocks amplified with 6 primers. RAPD products of the 8 stocks amplified with the same primer were pooled, then purified and labelled with [α - ^{32}P]dCTP using a Random Priming Kit (Boehringer Mannheim), in order to obtain 6 DNA probes. Membranes were washed at intermediate stringency (0.1X SSPE, 0.1% SDS at 65°C for 30 minutes to 1 hour) before autoradiography using Agfa (Curix Blue, HC-S plus) films.

Data analysis. MLEE and RAPD data were computed with the GENETICS software, designed in our laboratory and operated on SUN stations. Genetic diversity at a locus (h) and mean genetic diversity (H), which is the arithmetic average of h values for all loci, were used as genetic variability estimators (54). The unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) (58) and the Neighbor Joining method (50) were used to cluster the genotypes together according to their Jaccard' genetic distances (30), using the NEIGHBOR program of the PHYLIP package, version 3.5c (20). The robustness of the nodes was evaluated by bootstrap analysis (19) using a parsimony method (71). Trees were drawn with the TREEVIEW program, version 1.4 (47). In order to explore the rate of recombination and population structure, the index of association between loci (I_A) was calculated as previously described (40). The I_A value provides a measure of multilocus linkage disequilibrium and has an expected value of zero when the population structure is panmictic. Population structure of the samples was also explored by f , f' and g tests of linkage disequilibrium (63). The levels of non random association between loci were computed under the null hypothesis of random recombination (panmixia). f is the probability of observing a linkage disequilibrium in the population as high or higher than observed in the sample; f' is the probability of observing a linkage disequilibrium between MLEE loci or two given RAPD loci as high or higher than observed in the sample. The g test consists in evaluating the correlation between two independent sets of genetic markers. Such a

correlation constitutes a telling case of linkage disequilibrium. The correlation is evaluated with a non parametric Mantel test (38). Mean genetic diversities were compared by Student *t* tests.

RESULTS

Multilocus enzyme electrophoresis. Each of the 87 *H. pylori* stocks and the 4 outgroups in this study were analysed by MLEE. Although 79 *H. pylori* stocks had activity for all the nine enzymes retained for MLEE experiments, 7 stocks presented one null allele and one stock presented two null alleles. This lack of detectable activity is a true absence of the enzyme as cell extracts prepared from new cultures also did not yield detectable activity for this enzyme. Furthermore, migrations performed with the cell extracts from different cultures for a given stock yielded the same electrophoretic types (ET). All the nine loci studied were highly polymorphic (Table 3) and each stock yielded its own ET. The number of alleles per locus ranged from 3, for PEP1, to 10, for ADK and GOT. The electrophoretic patterns obtained for a locus consisted of a single band except for DIA for which 1, 2 or 3 bands were obtained. Since the term « diaphorase » refers to any enzyme that can catalyse the oxidation of NADH or NADPH in the presence of an electron acceptor (49), it is conceivable that the diaphorase function results from the activity of more than one genetic locus, and therefore, the detection of more than one band for DIA is expectable. According to the Student *t* test, the mean genetic diversities obtained are not significantly different from those obtained in the previous MLEE study of Go *et al.* (22). *H. pylori* shared some common allozymes with the other species of the genus *Helicobacter* but none with the *Campylobacter*. Moreover, the non gastric *Helicobacter* (*H. hepaticus*) and the *Campylobacter* yielded a high frequency of null alleles. Since the sequences of the genes encoding the enzymes under study are known (<http://www.tigr.org>), we can estimate that the genome regions surveyed by the 9 MLEE markers represent about 0.4% of the whole *H. pylori* genome.

Random Amplified Polymorphic DNA and Hybridization. The 12 RAPD primers retained for this study generated from 1 to 3 bands per profile for the less variable marker U-12,⁶⁴ and from 1 to 8 bands per profile for the more variable one A-13. All the primers generated highly polymorphic electrophoretic patterns (Table 3) and each stock yielded its own RAPD electrophoretic type (the combined results of amplification patterns with the 12 different

primers). The number of patterns per primer for *H. pylori* stocks ranged from 18 for U-12 to 83 for A-13. More than 80% of the RAPD patterns of the outgroup stocks were different from those obtained for *H. pylori* stocks. When individual bands rather than overall profiles were considered, the RAPD patterns of the outgroup stocks exhibited 20% of specific bands. The other bands were shared by *H. pylori*.

In order to ascertain that different primers are associated with independent genomic regions, which is a prerequisite for linkage disequilibrium analysis, hybridization experiments were performed. These tests dealt with six out of the 12 primers (A-17, B-01, N-05, N-09, R-10 and U-12), 6 *H. pylori* stocks and the outgroup stock *H. mustelae*. Only one cross-hybridization occurred for the reference stock 26695 (65) amplified by the RAPD primers B1 and U12. This cross-hybridization event represents 0.7% of the whole results. It occurred between the 2000 bp band of the U12 RAPD pattern and the 500 bp band of the B1 RAPD pattern, according to Southern-blot results. All other results showed that the RAPD primers are independent. The fact that RAPD markers used are independent allows to estimate, from the size of the RAPD products, that the genome size studied by the 12 RAPD primers is about 2% of the whole *H. pylori* genome.

Detection of *cagA*. Among the 87 *H. pylori* studied, 55 were *cagA*⁺ (63.2%), with 59.4% of *cagA*⁺ stocks in the non-Asian sample and 84.6% of *cagA*⁺ stocks in the Asian sample.

Population genetics parameters. Genetic variability indices and the level of linkage disequilibrium were evaluated on the whole *H. pylori* sample and on geographic subgroups (Table 3). Whatever the geographic area studied, the two genetic variability estimators (H: mean genetic diversity, calculated as the arithmetic average of genetic diversity h for all the loci and MD: mean genetic distance, calculated as the arithmetic average of genetic distances between each pair of stocks) was higher for RAPD than for MLEE analysis. The results dealing with the index of association between loci (I_A) did not differ significantly from zero. No significant values were obtained using the f and f' tests of linkage disequilibrium (Threshold 0.01). The correlation between MLEE and RAPD genetic distances was significant, as revealed by the Mantel test, for the whole sample ($r=0.108$; $p=0.008$), for the non-Asian subgroup ($r=0.115$; $p=0.010$) and for the Poitiers sample ($r=0.204$; $p=0.003$). However, a correlation between these two genetic markers was not recorded in the other geographic subgroups. Student's t test was performed on 55 French and references stocks for which pathological origin was known (Table 1). No relationship was found between the mean genetic diversity (h) per MLEE or RAPD locus and disease category

(gastritis or ulcer). Lastly, a non significant value was obtained for the f' test performed on a matrix grouping MLEE, RAPD and *cagA* status, indicating that all these markers were not linked.

Phylogenetic analysis. Neighbor joining trees obtained from MLEE and RAPD data analysis showed no significant structure, with wide branch lengths among *H. pylori* stocks (Fig. 1). The robustness of the nodes was evaluated by bootstrap analysis using a parsimony method. No significant bootstrap values (>90%) were obtained among *H. pylori* stocks either from MLEE data, or from RAPD data. From MLEE data, bootstrap significant values were obtained at the genus level. The non gastric *Helicobacter* outgroup stock, *H. hepaticus*, appeared genetically much more distant of *H. pylori* than the gastric *Helicobacter* outgroup stock *H. mustelae*. Considering both MLEE and RAPD trees, Asian stocks appeared to melt with non-Asian stocks. Nevertheless, the loose cluster that includes Asian stocks never involves Indian stocks. The same phylogenetic analysis carried out on the RAPD and MLEE markers that gave the less variability yielded the same results (data not shown). Lastly, stocks related to a given clinical form were randomly distributed on both trees.

DISCUSSION

Phylogenetic identification at the species level. According to our phylogenetic trees (Fig. 1), the *Helicobacter* genus is well differentiated from the *Campylobacter* genus. On the contrary, as shown by the low bootstrap values, no clear phylogenetic separation was found among the species of the genus *Helicobacter* either from MLEE data or from RAPD data.

Genetic diversity of *H. pylori*: geographical and pathological distributions. The genetic diversity recorded in *H. pylori* in the present study is considerable. For MLEE, the mean genetic diversity in the overall sample was 0.662. This value is not significantly different from those calculated by Go *et al.*, and exceeds the level of diversity recorded within other pathogenic bacterial species, and even within some bacterial genera, studied by MLEE (22). Moreover, the mean genetic diversity calculated from MLEE and RAPD analysis on *H. pylori* can be compared to the results obtained with the same markers for the ECOR collection of *Escherichia coli* (43) and on *Trypanosoma cruzi* (6), a parasitic protozoan responsible for Chagas' disease. Both the *E. coli* and the *T. cruzi* samples were collected from diversified hosts and geographical places. *H.*

pylori genetic diversity is quite similar to those of ECOR stocks studied by MLEE ($H=0.51$ for *E. coli*) (74) and by RAPD ($H=0.89$ for *H. pylori* versus $H=0.94$ for *E. coli*) (23) and it exceeds those of *T. cruzi* for both MLEE and RAPD (11).

For both MLEE and RAPD analysis, each stock yielded a distinct electrophoretic type. Working on the molecular genetic basis of allelic polymorphism in malate dehydrogenase in natural population of *E. coli* and *Salmonella enterica*, Boyd *et al.* have estimated that, on average, the generation of a new allozyme has involved 2.6 amino acid substitutions (10). If an extrapolation from these species to *H. pylori* can be done, and considering only non synonymous substitutions, the number of amino acid substitutions that yields such a variability in the electrophoretic types observed by MLEE is huge. Thus, if frequent alterations of nucleotides in the third position of the triplet codons occur (21), the synonymous substitutions caused by this way could not have been sufficient to explain such a level of genetic variability. Moreover, even if hypermutator strains have been described in *H. pylori* (Burucoa *et al.*, unpublished data), mutations could not be the main driving force in the generation of the genetic diversity in *H. pylori* species. Nevertheless, recombination by itself can not explain sequence polymorphism within genes as revealed by several studies (1) (59). Therefore, it would be interesting to estimate the recombination:mutation ratio in *H. pylori* from Multilocus Sequence Typing (MLST) analysis (37), as it has been performed for *N. meningitidis* (18); indeed, in this species, which exhibit an intermediate type of population structure (“epidemic” structure) in the spectrum of recombination that ranges from panmixia to strict clonal evolution, the recombination:mutation ratio has been estimated to 100:1.

MLEE was previously applied to population genetics studies carried on *H. pylori* stocks from patients living in the same geographic area (22, 26) but no conclusion could be drawn between the ethnic origins of the patients and the harboured strains. On Neighbor joining trees drawn from MLEE and RAPD analysis, South-East Asian stocks seemed to be loosely clustered together, and separated from Indian stocks. This result is consistent with results obtained from the sequence analysis of the very right end of the *cag* pathogenicity island (34). As indicated by the *f'* test, the loci revealed by the two generalist markers used and the *cagA* locus are independant. Thus, this information collected from multiple loci scattered around the chromosome gave the same result as *cagA* marker arisen by horizontal transfer (24). However, as bootstrap values are not significant, this result should be analysed cautiously.

As yet, the different studies that have considered the population genetics of *H. pylori* agree with the existence of an asian clone (1, 41, 67, 69, 70, 76, 77). Some have distinguished differences between stocks from North Europe on one hand and South Europe and South America

on the other hand, leading to the hypothesis that *H. pylori* had been brought to the New World by European conquerors some 500 years ago (34). Our data do not support this hypothesis, since the South American stocks studied here were randomly distributed among the non-Asian stocks. However, this result could be explained by the small size of the South-American sample under study. Another explanation of this result could be that our study includes *cagA*⁺ and *cagA*⁻ stocks, unlike the above-cited study (34), that has considered *cagA*⁺ stocks only.

No associations between given pathologies (either gastritis or ulcer) and given multilocus genotypes were recorded in the present study. However, this does not rule out the possibility that the pathogen's genetic background can play a role in clinical forms of the disease. As a matter of fact, pathogenicity could be driven by a very limited number of genes, which does not appear in an overall evolutionary genetic study such as the present one, based on genetic markers that are not supposed to show any a priori link with pathogenicity.

Population structure of *H. pylori*: comparison with other microorganisms. Our results, based on a broad sample collected in only one country, and on an extensive multilocus typing based on two different kinds of genetic markers (MLEE and RAPD) support the conclusions of previous studies (22, 51, 59) that genetic exchange plays a considerable role in the population structure of *H. pylori*. As a matter of fact, calculation from MLEE data of the index association value between loci, I_A (12), place *H. pylori* at one extreme of the population structure spectrum described by Maynard Smith *et al.*, ranging from the highly sexual bacterium *Neisseria gonorrhoeae* to the almost strictly clonal *Salmonella* (40). I_A value calculated for the *H. pylori* stocks under study approaches the expected value of zero suggesting that the population recombines at random. Moreover, linkage disequilibrium tests f and f' both gave non significant results. It is not a parsimonious hypothesis to put this result on the account of a statistical type II error (lack of power of the test due to insufficient sampling), since the number of stocks and loci surveyed are considerable. The impact of genetic exchange is corroborated by the lack of clear structuring within the *H. pylori* sample, attested by low bootstrap values. These results can be usefully compared to the ones recorded on two other pathogens studied by our team with the same techniques and the same statistics. In *E. coli* (23), no clear phylogenetic structuring was found either, as shown by low bootstrap values. However, linkage disequilibrium tests, including the f and f' tests, gave much more significant results than in *H. pylori*, suggesting that the role of clonal propagation is much more considerable in *E. coli* than in *H. pylori*. *T. cruzi* exhibits both constantly high linkage disequilibrium values and definite indications for clear-cut phylogenetic substructuring, making this species a paradigm of clonal evolution (6, 63, 64). Although our

results support the hypothesis that *H. pylori* undergoes considerable genetic exchange, it can be noted that the *g* test of linkage disequilibrium (correlation between 2 independent sets of genetic markers) proved to be significant in the overall sample, in the non-Asian sample and in the Poitiers sample. This suggests that the genetic loci related to MLEE and RAPD variability do not evolve independently, in other words, their association is not totally disrupted by genetic recombination. Still the fact remains that among the broad range of pathogenic microorganisms studied by our team, *H. pylori* appears to be the more recombinant, together with *Plasmodium falciparum* (8) the parasitic protozoan responsible for the most malignant form of malaria, which is known to undergo obligatory meiosis at each transmission cycle. Mechanisms of genetic recombination have been well documented in *H. pylori*: its ability to transform has been testified by in vitro experiments (29, 42, 66) and, since the complete genome sequence of two *H. pylori* stocks have been published (3, 65), by characterization of loci involved in bacterial transformation (4, 28, 52, 56, 57). It has been shown that a conjugation-like mechanism may contribute to DNA transfer between *H. pylori* cells (35). Moreover, intrachromosomal rearrangements occur (31) by homologue recombination (33). Mutation would be also an origin of the observed wide genetic variability (72).

The consequences of a potentially panmictic structure in pathogenic microorganisms, such as the one recorded in the present study in *H. pylori*, have been exposed (64). Contrary to species that undergo stable clonal propagation, the multilocus genotypes of a recombinant species are unstable and vanish rapidly in the common gene pool of the species. They can be actually equated to the individual genetic variants of a common-place sexual species in higher organisms. They are therefore improper as units of analysis for molecular epidemiology surveys, unless one uses genetic markers that have an extremely fast molecular clock. In this case, individual clones can be followed for short periods of time, even if their lifetime is very short. Moreover, when a mutation that drives a relevant medical property (virulence, antibiotic resistance) appears, it is free to spread in the entire range of the species. The only obstacles to this are physical ones (geographical distance and time). On the contrary, in a clonal species, such mutations remain confined in the clonal line in which they appeared. Since the proposal of the “clonal paradigm” in bacteria thanks to the development of the population genetics approach (44, 53), growing evidence has accumulated, showing that bacterial population structures are considerably more diversified than originally thought. The same obtains in parasitic protozoa, even if many medically relevant parasitic species pertaining to the genera *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Giardia*, *Entamoeba*, etc, show clear indications of clonal evolution (63). It appears therefore that most microbial species have a double evolutionary strategy and exhibit both clonal propagation and

genetic recombination with different contributions of each according to the species, and in certain cases, within a given species, according to the ecological transmission cycle (27). This situation constitutes a fascinating field of research for evolutionists, and a preoccupating challenge for medical research dealing with molecular epidemiology, drug resistance and pathogenicity.

ACKNOWLEDGEMENTS

L. Salaün's scholarship was supported by the French Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

We thank the following for *H. pylori* strains studied in this work: N. Muñoz (strains from Venezuela), F. Mégraud (strains from Hong-Kong) and G. Pérez-Pérez (strains from Japan, China and India).

REFERENCES

1. **Achtman, M., T. Azuma, D. E. Berg, Y. Ito, G. Morelli, Z. J. Pan, S. Suerbaum, S. A. Thompson, A. van der Ende, and L. J. van Doorn.** 1999. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol. Microbiol.* **32**:459-70.
2. **Akopyanz, N., N. O. Bukanov, T. U. Westblom, and D. E. Berg.** 1992. PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.* **20**:6221-5.
3. **Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and T. J. Trust.** 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**:176-80.
4. **Ando, T., D. A. Israel, K. Kusugami, and M. J. Blaser.** 1999. HP0333, a member of the *dprA* family, is involved in natural transformation in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **181**:5572-5580.

5. **Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek, Jr., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover.** 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* **270**:17771-7.
6. **Barnabé, C., S. Brisse, and M. Tibayrenc.** 2000. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology* **120**:513-26.
7. **Ben Abderrazak, S., F. Guerrini, F. Mathieu-Daudé, P. Truc, K. Neubauer, K. Lewicka, C. Barnabé, and M. Tibayrenc.** 1993. Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. *Methods Mol. Biol.* **21**:361-82.
8. **Ben Abderrazak, S. B., B. Oury, A. A. Lal, M. F. Bosseno, P. Force-Barge, J. P. Dujardin, T. Fandeur, J. F. Molez, F. Kjellberg, F. J. Ayala, and M. Tibayrenc.** 1999. *Plasmodium falciparum*: population genetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and other molecular markers. *Exp Parasitol.* **92**:232-8.
9. **Berg, D. E., R. H. Gilman, J. Lelwala-Guruge, K. Srivastava, Y. Valdez, J. Watanabe, J. Miyagi, N. S. Akopyants, A. Ramirez-Ramos, T. H. Yoshiwara, S. Recavarren, and R. Leon-Barua.** 1997. *Helicobacter pylori* populations in Peruvian patients. *Clin. Infect. Dis.* **25**:996-1002.
10. **Boyd, E. F., K. Nelson, F. S. Wang, T. S. Whittam, and R. K. Selander.** 1994. Molecular genetic basis of allelic polymorphism in malate dehydrogenase (*mdh*) in natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:1280-4.
11. **Brisse, S., C. Barnabé, and M. Tibayrenc.** 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.* **30**:35-44.
12. **Brown, A., M. Feldman, and E. Nevo.** 1980. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* **96**:523-536.
13. **Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, and A. Covacci.** 1996. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I- specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:14648-53.
14. **Chalkauskas, H., D. Kersulyte, I. Cepulienė, V. Urbonas, D. Ruzeviciene, A. Barakauskiene, A. Raudonikiene, and D. E. Berg.** 1998. Genotypes of *Helicobacter pylori* in Lithuanian families. *Helicobacter* **3**:296-302.

15. **Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang and N. Figura** 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:5791-5.
16. **Desjardins, P., B. Picard, B. Kaltenbock, J. Elion, and E. Denamur.** 1995. Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population: evidence from random amplified polymorphic DNA and restriction-fragment-length polymorphism. J. Mol. Evol. **41**:440-8.
17. **Fauchère, J. L., A. Rosenau, M. Veron, E. N. Moyen, S. Richard, and A. Pfister.** 1986. Association with HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. Infect. Immun. **54**:283-7.
18. **Feil, E. J., M. C. J. Maiden, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1999. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. Mol. Biol. Evol. **16**:1496-1502.
19. **Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution **39**:783-91.
20. **Felsenstein, J.** 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), 3.5c ed. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
21. **Ge, Z., and D. E. Taylor.** 1999. Contributions of genome sequencing to understanding the biology of *Helicobacter pylori*. Annu. Rev. Microbiol. **53**:353-87.
22. **Go, M. F., V. Kapur, D. Y. Graham, and J. M. Musser.** 1996. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. J. Bacteriol. **178**:3934-8.
23. **Grandhomme, M.** 1999. Etude phylogénétique de *Escherichia coli* par la technique RAPD. Doctorate of Pharmacy thesis dissertation. University of Montpellier, France.
24. **Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol. Microbiol. **23**:1089-97.
25. **Han, S. R., H. C. Zschausch, H. G. Meyer, T. Schneider, M. Loos, S. Bhakdi, and M. J. Maeurer.** 2000. *Helicobacter pylori*: clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. J. Clin. Microbiol. **38**:3646-51.

26. **Hazell, S. L., R. H. Andrews, H. M. Mitchell, and G. Daskalopoulos.** 1997. Genetic relationship among isolates of *Helicobacter pylori*: evidence for the existence of a *Helicobacter pylori* species-complex. *FEMS Microbiol. Lett.* **150**:27-32.
27. **Hide, G., A. Tait, I. Maudlin, and S. Welburn.** 1994. Epidemiological relationships of *Trypanosoma brucei* stocks from South East Uganda: Evidence for different population structures in human infective and non-human infective isolates. *Parasitology* **109**:95-111.
28. **Hofreuter, D., S. Odenbreit, G. Henke, and R. Haas.** 1998. Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: identification and genetic characterization of the *comB* locus. *Mol. Microbiol.* **28**:1027-38.
29. **Israel, D. A., A. S. Lou, and M. J. Blaser.** 2000. Characteristics of *Helicobacter pylori* natural transformation. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**:275-80.
30. **Jaccard, P.** 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* **44**:223-270.
31. **Jiang, Q., K. Hiratsuka, and D. E. Taylor.** 1996. Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol. Microbiol.* **20**:833-42.
32. **Kersulyte, D., N. S. Akopyants, S. W. Clifton, B. A. Roe, and D. E. Berg.** 1998. Novel sequence organization and insertion specificity of IS605 and IS606: chimaeric transposable elements of *Helicobacter pylori*. *Gene* **223**:175-86.
33. **Kersulyte, D., H. Chalkauskas, and D. E. Berg.** 1999. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol. Microbiol.* **31**:31-43.
34. **Kersulyte, D., A. K. Mukhopadhyay, B. Velapatino, W. Su, Z. Pan, C. Garcia, V. Hernandez, Y. Valdez, R. S. Mistry, R. H. Gilman, Y. Yuan, H. Gao, T. Alarcon, M. Lopez-Brea, G. Balakrish Nair, A. Chowdhury, S. Datta, M. Shirai, T. Nakazawa, R. Ally, I. Segal, B. C. Wong, S. K. Lam, F. O. Olfat, T. Boren, and L. Engstrand.** 2000. Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *J. Bacteriol.* **182**:3210-8.
35. **Kuipers, E. J., D. A. Israel, J. G. Kusters, and M. J. Blaser.** 1998. Evidence for a conjugation-like mechanism of DNA transfer in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **180**:2901-5.
36. **Kuipers, E. J., D. A. Israel, J. G. Kusters, M. M. Gerrits, J. Weel, A. van der Ende, R. W. M. van der Hulst, H. P. Wirth, J. Hook-Nikanne, S. A. Thompson, and M. J. Blaser.** 2000. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J. Infect. Dis.* **181**:273-282.

37. **Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:3140-5.
38. **Mantel, N.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* **87**:2414-2418.
39. **Marshall, D. G., A. Chua, P. W. Keeling, D. J. Sullivan, D. C. Coleman, and C. J. Smyth.** 1995. Molecular analysis of *Helicobacter pylori* populations in antral biopsies from individual patients using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **10**:317-23.
40. **Maynard Smith, J., N. H. Smith, M. O'Rourke, and B. G. Spratt.** 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:4384-8.
41. **Mukhopadhyay, A. K., D. Kersulyte, J. Y. Jeong, S. Datta, Y. Ito, A. Chowdhury, S. Chowdhury, A. Santra, S. K. Bhattacharya, T. Azuma, G. B. Nair, and D. E. Berg.** 2000. Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. *J. Bacteriol.* **182**:3219-27.
42. **Nedenskov-Sorensen, P., G. Bukholm, and K. Bovre.** 1990. Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J. Infect. Dis.* **161**:365-6.
43. **Ochman, H., and R. Selander.** 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* **157**:690-693.
44. **Ørskov, F., and I. Ørskov.** 1983. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the Enterobacteriaceae and other Bacteria. *J. Infect. Dis.* **148**:346-357.
45. **Oudbier, J. H., W. Langenberg, E. A. Rauws, and C. Bruin-Mosch.** 1990. Genotypical variation of *Campylobacter pylori* from gastric mucosa. *J. Clin. Microbiol.* **28**:559-65.
46. **Oury, B., N. Dutrait, B. Bastrenta, and M. Tibayrenc.** 1997. *Trypanosoma cruzi*: evaluation of a RAPD synapomorphic fragment as a species-specific DNA probe. *J. Parasitol.* **83**:52-7.
47. **Page, R.** 1996. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**:357-358.
48. **Peek, R. M., Jr., G. G. Miller, K. T. Tham, G. I. Perez-Perez, T. L. Cover, J. C. Atherton, G. D. Dunn, and M. J. Blaser.** 1995. Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *J. Clin. Microbiol.* **33**:28-32.

49. **Richardson, B. J., P. R. Baverstock, and M. Adams.** 1986. Allozyme electrophoresis : a handbook for animal systematics and population studies. Academic Press Australia.
50. **Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
51. **Salaün, L., C. Audibert, G. Le Lay, C. Burucoa, J. L. Fauchère, and B. Picard.** 1998. Panmictic structure of *Helicobacter pylori* demonstrated by the comparative study of six genetic markers. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**:231-9.
52. **Saunders, N. J., J. F. Peden, and E. R. Moxon.** 1999. Absence in *Helicobacter pylori* of an uptake sequence for enhancing uptake of homospecific DNA during transformation. *Microbiology* **145**:3523-3528.
53. **Selander, R., and B. Levin.** 1980. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* **210**:245-247.
54. **Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour, and T. S. Whittam.** 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:873-84.
55. **Simor, A. E., B. Shames, B. Drumm, P. Sherman, D. E. Low, and J. L. Penner.** 1990. Typing of *Campylobacter pylori* by bacterial DNA restriction endonuclease analysis and determination of plasmid profile. *J. Clin. Microbiol.* **28**:83-6.
56. **Smeets, L. C., J. J. Bijlsma, S. Y. Boomkens, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and J. G. Kusters.** 2000. *comH*, a novel gene essential for natural transformation of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **182**:3948-3954.
57. **Smeets, L. C., J. J. Bijlsma, E. J. Kuipers, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and J. G. Kusters.** 2000. The *dprA* gene is required for natural transformation of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**:99-102.
58. **Sneath, P., and R. Sokal.** 1973. The principle and practice of numerical classification. In D. Kennedy and R. Park (ed.), *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.
59. **Suerbaum, S., J. M. Smith, K. Bapumia, G. Morelli, N. H. Smith, E. Kunstmann, I. Dyrek, and M. Achtman.** 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12619-24.
60. **Taylor, D. E., M. Eaton, N. Chang, and S. M. Salama.** 1992. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *J. Bacteriol.* **174**:6800-6.
61. **Taylor, D. E., Z. Ge, D. Purych, T. Lo, and K. Hiratsuka.** 1997. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of

- clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2621-8.
62. **Tibayrenc, M.** 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.* **36**:47-115.
63. **Tibayrenc, M., F. Kjellberg, and F. J. Ayala.** 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:2414-8.
64. **Tibayrenc, M., K. Neubauer, C. Barnabé, F. Guerrini, D. Skarecky, and F. J. Ayala.** 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:1335-9.
65. **Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J. C. Venter** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539-47.
66. **Tsuda, M., M. Karita, and T. Nakazawa.** 1993. Genetic transformation in *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol.* **37**:85-9.
67. **van der Ende, A., Z. J. Pan, A. Bart, R. W. van der Hulst, M. Feller, S. D. Xiao, G. N. Tytgat, and J. Dankert.** 1998. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* populations in China and The Netherlands are distinct. *Infect. Immun.* **66**:1822-6.
68. **van der Ende, A., E. A. Rauws, M. Feller, C. J. Mulder, G. N. Tytgat, and J. Dankert.** 1996. Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from members of a family with a history of peptic ulcer disease. *Gastroenterology* **111**:638-47.
69. **Van Doorn, L. J., C. Figueiredo, F. Megraud, S. Pena, P. Midolo, D. M. Queiroz, F. Carneiro, B. Vanderborght, M. D. Pegado, R. Sanna, W. De Boer, P. M. Schneeberger, P. Correa, E. K. Ng, J. Atherton, M. J. Blaser, and W. G. Quint.** 1999. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **116**:823-30.

70. **van Doorn, L. J., C. Figueiredo, R. Sanna, M. J. Blaser, and W. G. Quint.** 1999. Distinct variants of *Helicobacter pylori cagA* are associated with *vacA* subtypes. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2306-11.
71. **Wagner, W.** 1961. Problems in the classification of ferns, p. 841-844. *In* Recent Advances in Botany. University Toronto Press, Montreal.
72. **Wang, G., M. Z. Humayun, and D. E. Taylor.** 1999. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol.* **7**:488-93.
73. **Welsh, J., and M. McClelland.** 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**:7213-8.
74. **Whittam, T., H. Ochman, and R. Selander.** 1983. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:1751-1755.
75. **Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**:6531-5.
76. **Yamaoka, Y., H. M. Malaty, M. S. Osato, and D. Y. Graham.** 2000. Conservation of *Helicobacter pylori* genotypes in different ethnic groups in Houston, Texas. *J. Infect. Dis.* **181**:2083-2086.
77. **Yamaoka, Y., M. S. Osato, A. R. Sepulveda, O. Gutierrez, N. Figura, J. G. Kim, T. Kodama, K. Kashima, and D. Y. Graham.** 2000. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori*: separation of *H. pylori* from East Asian and non-Asian countries. *Epidemiol. Infect.* **124**:91-96.

TABLE 1. Geographical and pathological distribution of the *Helicobacter pylori* strains studied.

Geographical origins			Pathological origins			Total
	Country	City	Gastritis	Ulcer	n.d. ^b	
non-Asian countries						
	Reference strains ^a		2	2	5	9
Europe	France	Brest	14	8	5	27
		Poitiers	20	9	1	30
South America	Venezuela		-	-	8	8
Asian countries						
South-East Asia	Hong-Kong		-	-	3	3
	China		-	-	2	2
	Japan		-	-	5	5
South Asia	India		-	-	3	3
Total			36	19	32	87

^a Reference strains used in this study are: CIP 101260, ATCC 43579, 84-183, 85-456, 86-338, Tx30a, Sydney strain SS1 , 26695 and J99.

^b n.d.: not determined.

TABLE 2. Buffer systems and electrophoretic conditions for multilocus enzyme electrophoresis of *Helicobacter pylori* enzymes.

Enzyme	Gel buffer (dilution factor) ^a	Tray buffer (dilution factor) ^a	Voltage (V)	Time (min)
Adenylate kinase	0.25	0.50	200	30
Aspartate amino-transferase	0.25	0.50	160	30
Diaphorase (NADH)	0.50	0.70	200	30
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	0.25	0.50	160	30
Glutamate dehydrogenase (NADP+)	0.35	0.50	200	30
Isocitrate dehydrogenase	0.25	0.40	200	30
Nucleoside Phosphorylase	0.25	0.50	200	20
Peptidase L-leu-leu-leu	0.70	0.70	200	30
Superoxide dismutase	0.25	0.50	200	20

^a A TBE (Tris 1 M, Borate 1.3 M, EDTA 0.03 M, pH 8) buffer system was used for electrophoresis for all the enzyme system studied.

TABLE 3. Genetic variability indices and linkage disequilibrium tests performed from the overall *Helicobacter pylori* studied, from two wide geographic areas, and from two French localities.

Geographic area	Total	MLEE				RAPD				MLEE/RAPD
		H ^a	MD±SD ^b	I _A ^c	f ^d	H ^a	MD±SD ^b	I _A ^c	f ^d	g ^e
Overall	87	0.662	0.631±0.139	-1.934e-05±0.021	NS	0.893	0.667±0.090	0.039±0.024	NS	r=0.108; p=0.0081
non-Asian countries	74	0.653	0.627±0.137	-0.025±0.025	NS	0.878	0.655±0.091	-0.003±0.028	NS	r=0.115; p=0.0103
Asian countries	13	0.587	0.550±0.171	0.178±0.143	NS	0.942	0.668±0.083	-0.541±0.169	NS	NS
Brest	27	0.664	0.631±0.134	-0.099±0.069	NS	0.850	0.628±0.088	-0.187±0.075	NS	NS
Poitiers	30	0.669	0.645±0.134	-0.009±0.063	NS	0.880	0.653±0.097	-0.070±0.068	NS	r=0.204; p=0.0027

^a H is the mean genetic diversity calculated as the arithmetic average of h values for all the loci (54).

^b MD±SD is the mean distance±standard deviation calculated as the arithmetic average of genetic distances, that quantify the levels of dissimilarity between different genotypes (30).

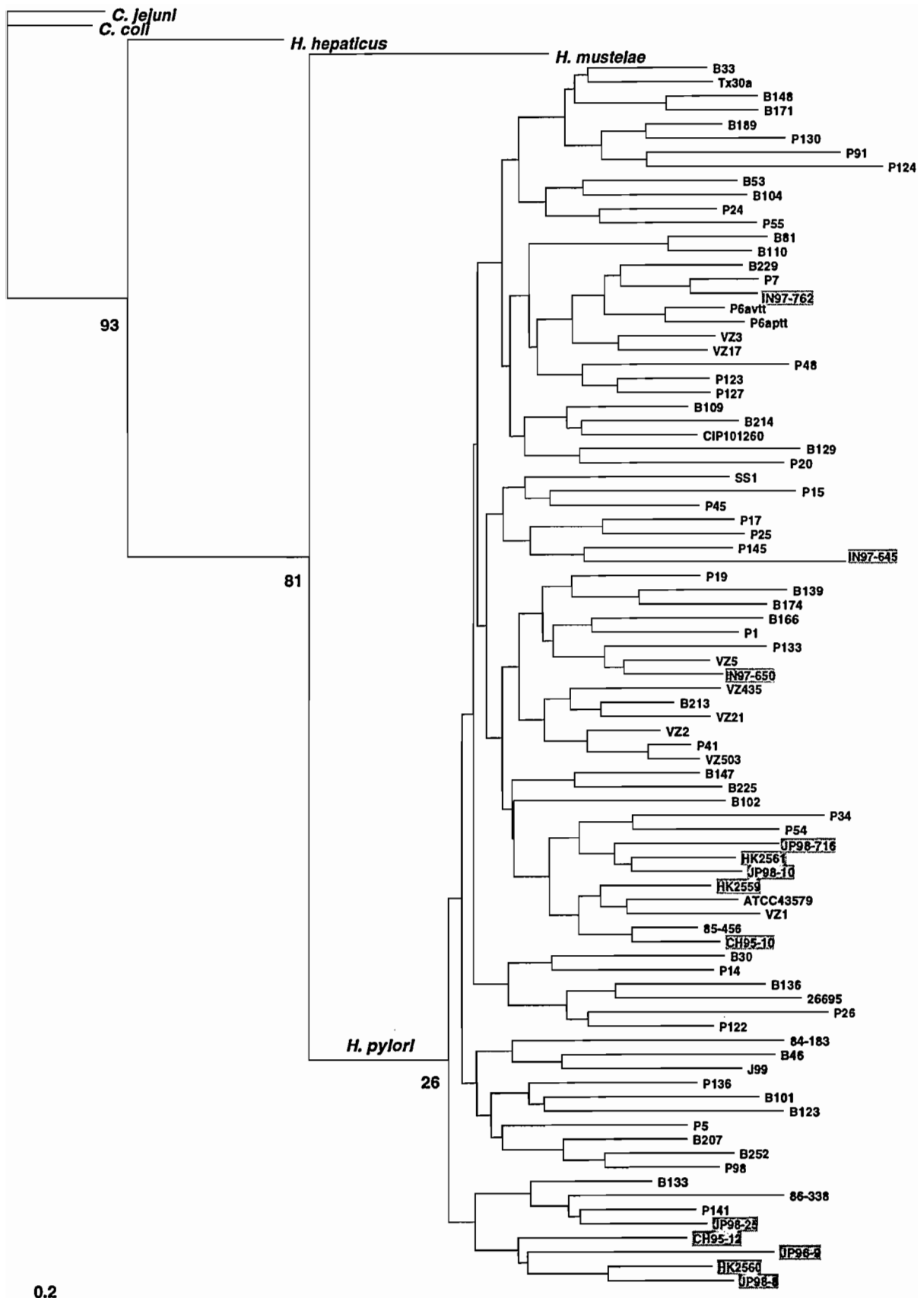
^c I_A is the index of association between loci calculated on the basis of the distribution of allelic mismatches between pairs of isolates over all the loci examined (12) (40). Standard errors are indicated.

^d f is the probability of observing a linkage disequilibrium in the population as high or higher than observed in the sample (Threshold 0.01) (63).

^e g is a linkage disequilibrium test that measure correlation between independent sets of genetics markers (38). (r) indicate the Pearson coefficient and (p) indicate the observed probability (Threshold 0.05).

NS: not significant.

FIG. 1. Neighbor Joining trees derived from Jaccard's genetic distances between the 87 *Helicobacter pylori* strains and the 4 outgroups (*H. mustelae*, *H. hepaticus*, *Campylobacter jejuni* and *C. coli*) studied by MLEE. The scale indicates the Jaccard distances along the branches. The robustness of the nodes was evaluated by bootstrap analysis (19) using a parsimony method (71). Bootstrap values were carried over the Neighbor Joining trees. Bootstrap significant values (>90%) were obtained at the genus level. Trees were drawn with TreeView Program, version 1.4 (47). The geographic origin of *H. pylori* clinical isolates are indicated as follows: B=Brest (France), P=Poitiers (France), VZ=Venezuela, HK= Hong-Kong, CH=China, JP= Japan, IN= India. Asian strains are indicated in grey.



Publication soumise à *Journal of Clinical Microbiology*

Modifications of *Helicobacter pylori* Strains During a One Year Murine Infection

S. Ayraud*, B. Janvier, L. Salaün and J.L. Fauchère

Laboratoire de Microbiologie A, CHU La Milétrie and UFR de Médecine et Pharmacie - Université
de Poitiers - Poitiers - France

Key words: *H. pylori*, mouse infection, adaptation, phenotypic and genotypic variations.

* Corresponding author: S. AYRAUD

Adress: Laboratoire de Microbiologie A - CHU La milétrie - BP577 - 86021 Poitiers Cedex - France

Tel: 33 5 46 44 43 53

Fax: 33 5 49 44 38 88

Abstract

The bacterial pathogen *Helicobacter pylori* is highly adapted to the human stomach and a high diversity is found among clinical isolates of the bacteria. This phenomenon could be the consequence of adaptive changes of the strains passing from one host to another. To study the early and late events of *H. pylori* infection in a mouse model, C57BL/6 mice were infected with 3 *H. pylori* strains : the Sydney strain which is known to be well adapted to the mouse and 2 strains freshly isolated from infected patients. Mice were orally inoculated with the infecting strains (IS) and were sacrificed 3, 8, 15, 21, 45, 90, 120, 150, 240 and 360 days later. In order to detect phenotypic and genotypic variations during mouse colonization, emerging strains (ES) that were isolated from the mouse stomachs at each sacrifice were compared to the IS by SDS-PAGE, MLEE, RAPD and determination of the *cagA* and *vacA* status by PCR. During the 360 days of the murine infection, *H. pylori* strains didn't undergo significant phenotypic variation or genotypic modifications. So, we can hypothesize that the diversity among the strains could result from genetic exchange between strains co-colonizing a same host.

Introduction

H. pylori is a gastro-intestinal pathogen involved in chronic gastritis, peptic ulceration and gastric carcinoma [16,19,23]. Although this species is highly adapted to human, some strains are able to infect other animals as mouse [11,15]. *H. pylori* species is also known to show a high genetic diversity [1]. This particular character could be a consequence of adaptive changes during chronic colonization of the human stomach [18,22]. Thus, we hypothesized that a strain passing from a human to an animal host undergoes more important and consequently more easily detectable adaptive changes. We also hypothesized that variations will be less perceptible with a strain already adapted to the murine stomach than with clinical strains freshly isolated from human patients.

In order to verify those assumptions, we orally inoculated mice with two *H. pylori* human strains previously selected as able to colonize mouse's stomach and with the Sydney strain, SS1, well known to be adapted to the mouse environment [11,14]. We followed phenotypic and genotypic modifications occurring in those three strains between 3 days and 12 months of the experimental infections. Phenotypic changes were analyzed by determining protein profiles and enzyme profiles

while the genetic changes were analyzed by RAPD. The genes encoding for the virulence factors, *vacA* and *cagA*, were also studied by PCR.

Material and Methods

***H. pylori* strains and growth conditions**

The study was conducted using 3 *H. pylori* strains. The Sydney strain (SS1) was provided by A. Lee [14]. The 2 other strains were freshly isolated from human patients hospitalized in Poitiers, France : Hp141 was isolated from a 32 years old woman with a gastritis and Hp145 from a 36 years old woman with a prepyloric ulcer.

In order to prepare the infecting inoculum, the SS1 strain was subcultivated several times onto blood agar and finally once in Brucella broth for 2 days. The 2 other strain were isolated from human stomach biopsies onto Skirrow medium and subcultivated once in Brucella broth for 2 days in order to prepare the Hp141 and Hp145 infecting inocula. Cultures were incubated at 37°C under microaerobic atmosphere. Each strain was confirmed to belong to the *H. pylori* species, by Gram staining, oxidase, catalase and urease tests.

Experimental infection

Experimental infection was conducted as previously described using 6 weeks old female C57BL/6 inbred mice free of gastric spiral bacteria [11]. At day 0, animals (thirty mice per *H. pylori* strain) were inoculated twice intra-gastrically with 0,5 ml of the *H. pylori* suspensions adjusted to 10⁸ Colony Forming Units (CFU) per ml. Control mice were given Brucella broth alone in order to check for the absence of contamination by human strains during the experiment. The animals were sacrificed at days 3, 8, 15, 21, 45, 90, 120, 150, 240 and 360 post-inoculation (p.i.). Their stomachs were entirely removed and ground in one ml of Brucella broth. The resulting suspension was serially diluted and the number of viable *H. pylori* cells per stomach was determined on Skirrow medium.

The strains recovered were called emerging strains (ES). Each ES identified as *H. pylori* was subcultured once onto Columbia blood agar in order to prepare bacterial extracts (see below). Stomachs of the control mice were similarly analyzed.

Bacterial extracts

Bacterial extracts were prepared by harvesting bacteria in NaCl 0.15M from a 48h culture. The suspensions were gently vortexed and centrifugated at 4,000 x *g* for 15 min [10]. The supernatants (bacterial extracts) were removed, filtered on a 0.45 µm membrane and dialysed against distilled water for 24 h. Protein concentration of the bacterial extracts was determined using BCA Protein Assay Reagent kit (Pierce Chemical, Rockford, USA)

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Murine humoral response to *H. pylori* was analyzed by ELISA in which saline extract from each infecting strains was used as antigen. Briefly, 96-well microtiter plates were coated with 1 µg of antigen per well ; mice sera were tested in duplicate at the dilution 1:100 ; peroxidase-labelled goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) was used at the dilution 1:1000 (Dako, Denmark) ; colored reactions obtained with ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) / H₂O₂ were read in a plate reader at 414 nm [3].

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was performed using a mini slab gel apparatus (Bio-Rad, USA) under reducing conditions by the standard procedure of Laemmli [13]. Bacterial extracts were stacked in a 4% acrylamide gel and resolved in a 8 and a 14% acrylamide gel. Proteins were visualized by the modified silver staining described by Oakley *et al* [17].

Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)

Cells were washed in phosphate buffer pH 7.2 and lysed in an enzyme stabilizer (NADP 0.01% (w/v), β-mercaptoethanol 0.1% (v/v), Triton X100 0.1% (v/v)) on ice for 20 min [20]. Lysates were centrifuged at 12000 x *g* for 10 minutes at 4°C. MLEE was performed on cellulose acetate plates (Helena laboratories, USA). The following 9 enzyme systems were used : adenylate kinase, glucose-6-phosphate deshydrogenase, diaphorase, aspartate aminotransferase, glutamate dehydrogenase, nucleoside phosphorylase, peptidases 1 and 2, and superoxide dismutase. These 9 enzyme systems corresponded to 10 different *loci* since diaphorase exhibit the activity of two distinct *loci*. A TBE (Tris 1 M, Borate 1.3 M, EDTA 0.03 M, pH8) buffer system was used for electrophoresis, with different gel and tray buffer concentrations depending on the enzyme system studied. Detection of enzyme activity was performed according to the methods of Richardson *et al* [20] and Ben Abderrazak *et al* [4].

Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) analysis

Genomic DNA of the IS and ES was extracted using purification columns "QIAmp DNA Mini Kit" (Quiagen, France) according to the protocol described by the manufacturer. Twelve primers were chosen in A, B, F, N, R and U kits from Operon Technologies (USA). The name and the sequence of each primer was: A-11 5'-CAATCGCCGT-3', A-13 5'-CAGCACCCAC-3', A-17 5'-GACCGCTTGT-3', B-01 5'-GTTTCGCTCC-3', B-05 5'-TGCGCCCTTC-3', B-15 5'-GGAGGGTGTT-3', F-07 5'-CCGATATCCC-3', N-04 5'-GACCGACCCA-3', N-05 5'-ACTGAACGCC-3', N-09 5'-TGCCGGCTTG-3', R-10 5'-CCATTCCCCA-3' and U-12 5'-TCACCAGCCA-3'. The amplification reactions were performed in a final volume of 60 µl containing 0.9 units *Taq* polymerase (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN, USA), 100 µM each dNTP, 200 nM primer, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3 and 20 ng template DNA.

The amplification cycle consisted of an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 45 cycles (94°C, 1 min; 36°C, 1 min; 72°C, 2 min) and by a final elongation step of 7 min at 72°C. Amplification was performed in a PTC-100 thermocycler (MJ research). Random amplified polymorphic DNA products were analysed by electrophoresis in 1.6% agarose gels stained with ethidium bromide and then visualized by ultra-violet light (Salaün, L., Picard, B., Fauchere, J.L., Oury, B., Tibayrenc, M. and Barnabe, C., submitted for publication).

PCR amplification of the *vacA* and *cagA* genes

Genomic DNA of the IS and ES was extracted using the same method as for RAPD. For typing of the *vacA* gene, fragments *m1*, *m2*, *s1/s2*, *s1a*, *s1b* and *s2* were PCR amplified using the primers and the PCR conditions recommended by Atherton *et al* [17]. The *cagA* status was determined using the primers and PCR conditions previously described [2].

Results

Emerging strains (ES) were recovered from gastric tissue biopsies at each time p.i. except at days 120 and 240 for Hp141 and at day 240 for Hp145. A difference in the infection rates was found between the SS1 strain and the two clinical strains (Fig 1). Hp141 and Hp145 strains have similar infection rates during the one year follow-up. For these two strains, infection rates increased until day 45 p.i. to reach about 5000 CFU/ stomach and decreased slowly to a steady state of about 2000 CFU/ stomach at day 150 p.i. The infection rate obtained with SS1 was 4 LOG higher than

with the two clinical strains at the first stage of infection but rapidly decrease to reach the values observed with the two other strains at day 150p.i.

A similar kinetic was observed with the anti-*H. pylori* antibody response of mice as measured by ELISA (Fig 2). IgG response of mice infected with SS1 was higher than those obtained with mice infected with Hp141 or Hp145 strain. It increased during the first 45 days to reach a high antibody level which was then maintained during all the period of the experimental infection. IgG directed to Hp141 appear at day 15 p.i. and those directed to Hp145 were detected only at day 90 p.i. Three months after inoculation, the IgG rates of the two clinical strains presented the same evolution. It should be noted that humoral response directed to Hp141 was not detected in sera from infected mice sacrificed at day 120 p.i. when the *H. pylori* strain was not recovered. Inversely, an antibody response was detected against Hp141 and Hp145 strain at day 240 p.i. whereas the corresponding strains were not recovered by culture.

For each strain, electrophoretic profiles of bacterial extracts prepared from IS and ES were determined in a 8% and in a 14% acrylamide gel in order to study high and low molecular weight proteins. The protein profiles showed minor differences in the expression of certain fractions in ES of each *H. pylori* strains but those variations were not stable. For example, with Hp141, we observed an over-expression of a 260 kDa protein at days 8, 15 and 150 p.i. (Fig 3a). With Hp145, we observed quantitative modifications in the expression of low molecular weight proteins located at approximately 25 kDa (Fig 3b). With ES providing from the SS1, we could observe modifications in the 180 kDa area, appearing at day 120 and 240 p.i. (Fig 3c).

Nine enzyme systems were studied by MLEE. No difference between the enzyme profiles of IS and ES of the three *H. pylori* strains was revealed by this method (Fig 4).

RAPD was performed with twelve different primers. It did not allow to detect any genetic difference between the IS and the ES profiles of each *H. pylori* strain at each infection time (Fig 5).

Infection of the mice with these three *H. pylori* strains was found independently of their *cagA* status and of their *vacA* genotype : SS1 was *cagA*⁺ and of the *m2s2 vacA* genotype, Hp141 strain was *cagA*⁺ and of the *m1s1a vacA* genotype, Hp145 strain was *cagA*⁻ and of the *m2s2 vacA* genotype. The study of *cagA* status and the typing of *vacA* gene by PCR did not show any modification in those genes with none of the 3 *H. pylori* strains during the one year infection follow-up : Hp141

isolates remained *cagA+* / *m1s1a vacA* genotype, Hp145 isolates were all *cagA+* / *m2s2 vacA* genotype and each SS1 emerging strains were *cagA+* / *m2s2 vacA* genotype.

Discussion

In this work, we developed a model of chronic infection of mice with *H. pylori* human strains. This model of murine infection could be quite useful in order to study pathogenic mechanisms of *H. pylori*, adaptation to its environment, new therapeutic compounds screening, vaccine...

The Sydney strain, called SS1, and two clinical strains called Hp141 and Hp145 were able to colonize the mouse's stomachs and were re-isolated all along the one year follow-up, except at day 120 p.i. for Hp141 and at day 240 p.i. for Hp141 and Hp145. The non-isolation of Hp141 in mice sacrificed at day 120 was associated with an absence of antibody response. It should be due to a lack of infection of the 3 animals sacrificed at this time. However, at day 240 p.i., we have detected a significative IgG rate in mice inoculated with Hp141 or Hp145. The non isolation of the *H. pylori* strains from murine stomachs could be due to a technical problem regarding the growth conditions of bacteria. The two clinical strains exhibited nearly the same infection rates in mice but they are lower than rates obtained with the SS1 strain during the first months post-inoculation. This result confirms the adaptation of SS1 to the murine stomach. The IgG response directed to the three *H. pylori* strains correlates with the infection rates: the infection rates obtained with the three strains decreased when the host antibody response became significative. Moreover, SS1 which showed the highest infection rates, showed the highest IgG response in mice. This result suggests the role of the immune response in the control of the infection. The slight differences observed between the IgG rates obtained with strain Hp141 or Hp145 before 90 days p.i. could be the consequence of differences in the antigenicity of those two strains.

Interestingly, the infection of mice seems to be independant from the *cagA* status and the *vacA* genotype of the infecting strains. Those genes encode for proteins usually presented as virulence factors: the CagA antigen and the vacuolizing cytotoxin VacA [6,7,8]. Hp145 strain is *cagA* negative thus does not express the CagA antigen but Hp141 and SS1 strains express the CagA antigen. Hp145 and SS1 are of the *m2s2 vacA* genotype so produce an inactive vacuolizing toxin. Hp141 strain is of the *m1s1a vacA* genotype and produce a large amount of an active vacuolizing toxin. These results suggest that the CagA antigen and an active vacuolizing toxin are not essential for

colonization of the mouse stomach by *H. pylori*. This observation has already been reported by Sheu *et al* during an experimental infection of BALB/c mice [21]. The authors used two *H. pylori* strains, one was CagA negative and one was CagA positive. The less virulent CagA negative strain induced *H. pylori* infection in mice as effectively as the CagA positive strain but eight weeks p.i. the severity of the gastritis was more evident in mice inoculated with the CagA positive strain. Those data does not correlate with the data of authors who showed a facilitated infection with a strain positive for *cagA* [5].

In order to detect adaptative modifications, ES isolated during the one year follow-up of the experimental infection were compared to the IS. Phenotypic analysis was performed by SDS-PAGE. Only minor variations were observed in the protein profiles of the bacterial extracts. Those modifications were only quantitative and not stable over the time. They were found as well in protein profiles of the mouse-adapted strain SS1 as in protein profiles of clinical isolates, Hp141 and Hp145. This result suggest that the minor variations observed are not related to the adaptation of *H. pylori* to the mouse environment.

Using Multi Locus Enzyme Electrophoresis (MLEE), we did not detect any variation in the enzyme electrophoretic profiles of the three *H. pylori* strains. This method is able to detect point mutations in genes encoding for the studied enzyme and is a good approach of the micro-diversity of *H. pylori* strains. The absence of mutation in genes encoding for the enzymatic systems chosen for typing IS and ES suggest that adaptation of the *H. pylori* strains to their new environment does not involve changes in those genes.

Neither the one year follow-up of *cagA* and *vacA* genes, nor the amplification of DNA polymorphism by RAPD using twelve primers, detect any genetic variation between the IS and ES genomes. This data concerned the three *H. pylori* strains. Adaptation to the mouse's stomach does not induce macro-diversity among *H. pylori* genes.

H. pylori species is characterized by a high diversity among its strains. We hypothesized that this polymorphism occurs in stomach which is the only environment known for the bacteria. During the one year experimental infection in mice stomach, the three *H. pylori* strains did not undergo phenotypic or genotypic variations detectable by the used tools. Adaptation to a new host doesn't involve significative modifications in the colonizing *H. pylori* strains and does no explain the diversity of *H. pylori* clinical isolates. Few authors have also reported that no variability was found during a single strain infection [9,12]. We can suppose that the natural heterogeneity of *H. pylori* strains is

due to genetic exchanges between several *H. pylori* strains colonizing a same host during the early time of infection. Facing those observations, we are presently studying interactions between the three *H. pylori* strains co-infecting a same mouse.

Acknowledgments

We are grateful to Leon PEZENNEC for his technical assistance.

References

1. Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S. and Berg, D.E. 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic. Acid. Res.* **20**: 5137-5142.
2. Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M., Tummuru, Jr M.K., Blaser, M.J. and Cover, T.L. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* **270**: 17771-17777.
3. Aucher, P., Petit, M.L., Mannant, P.R., Pezennec, L., Babin, P. and Fauchère, J.L. 1998. Use of immunoblot assay to define serum antibody patterns associated with *Helicobacter pylori* Infection and with *H. pylori*-related ulcers. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 931-936.
4. Ben abderrazak, S., Guerrini, F., Mathieu-Daudé, F., Truc, P., Neubauer, K., Lewicka, K., Barnabé, C. and Tibayrenc, M. 1993. Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. *Methods Mol. Biol.* **21**: 361-382.
5. Björkholm, B., Engstrand, L. and Falk, P. 1998. Infections with *cagA* positive/negative *Helicobacter pylori* isolates in a transgenic mouse model. *In proceedings of 3rd International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infections*, Helsingor, Denmark.

6. **Blaser, M.J., Perez-Perez, G.I., Kleanthous, H., Cover, T.L., Peek, R.M., Chyou, P.H., Stermmernann, G.N. and Nomura, A.** 1995. Infection with strains possessing *cagA* is associated with an increase risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* **55**: 2111-2115.
7. **Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N. and Rappuoli, R.** 1993. Molecular characterization of the 128 kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5791-5795.
8. **Cover, T.L. and Blaser, M.J.** 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **267**: 10570-10575.
9. **Danon, S.J., Luria, B.J., Mankoski, R.E. and Eaton, K.A.** 1998. RFLP and RAPD analysis of in vivo genetic interactions between strains of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **3**: 254-259.
10. **Janvier, B., Constantinidou, C., Aucher, P., Marshall, Z.V., Penn, C.W. and Fauchère, J.L.** 1998. Characterization and gene sequencing of a 19 kDa periplasmic protein of *Campylobacter jejuni/coli*. *Res. Microbiol.* **149**: 95-107.
11. **Janvier, B., Grignon, B., Audibert, C., Pezennec, L. and Fauchere, J.L.** 1999. Phenotypic changes of *Helicobacter pylori* components during an experimental infection in mice. *FEMS Immunol. And Medical Microbiol.* **24**: 27-33.
12. **Kersulyte, D., Chalkauskas, H. and Berg, D.E.** 1999. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol. Microbiol.* **31**: 31-43.
13. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* **227**: 680-685.
14. **Lee, A., O'Rourke, J., Corazon de Ungria, M., Robertson, B., Daskapopoulos, G. and Dixon, M.F.** 1997. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* **112**: 1386-1397.

15. **Marchetti, M., Arico, B., Burroni, D., Figura, N., Rappuoli, R. and Ghiara, P.** 1995. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* **267**: 1655-1658.
16. **Marshall, B.J. and Warren, J.R.** 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**: 1311-1315.
17. **Oakley, B.R., Kirsch, D.R. and Morris, N.R.** 1980. A sensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **105**: 361-363.
18. **Oudbier, J.H., Langenberg, W., Rauws, E.A.J., and Bruin-Mosch, C.** 1990. Genotypical variation of *Campylobacter pylori* from gastric mucosa. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 83-86.
19. **Rautelin, H. and Kosunen, T.U.** 1991. *Helicobacter pylori* and associated gastroduodenal diseases. *APMIS* **99**: 677-695.
20. **Richardson, B.J., Baverstock, P.R. and Adams, M.** 1986. Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematics and population studies. Academic, London and New York.
21. **Sheu, B.S., Yang, H.B., Wu, J.J., Huang, A.H., Lin, X.Z. and Su, I.J.** 1999. Development of *Helicobacter pylori* infection model in BALB/c mice with domestic cagA-positive and -negative strains in Taiwan. *Dig. Dis. Sci.* **44**: 868-875.
22. **Tee, W., Lambert, J., Smallwood, R., Schembri, M., Ross, B.C. and Dwyer, B.** 1992. Ribotyping of *Helicobacter pylori* from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 739-741.
23. **The Eurogast Study Group.** 1993. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet* **341**: 1359-1362.

Legends of table and figures

Figure 1. Infection rates of mice during the one year experimental infection with Hp141, Hp145 and SS1 (medium values obtained from three mice).

Figure 2. IgG response measured by ELISA during the one year experimental infection with Hp141, Hp145 and SS1 (medium values obtained from three mice).

Figure 3. Electrophoretic analysis of bacterial extracts prepared from Hp141 (a), Hp145 (b) and SS1 (c). Proteins of IS (day 0) and ES (day 3 to 360 p.i.) were separated in a 8% acrylamide gel (b), in a 14% acrylamide gel (a,c), and silver stained. Black arrows indicate the main variation observed with each strain.

Figure 4 Comparison of enzyme electrophoretic profiles (MLEE) of the IS (day 0) and ES (day 3 to 360 p.i.) of the strain Hp141. Only results obtained with Aspartate transaminase (a) and Glucose 6 phosphate dehydrogenase (b) are presented.

Figure 5 Results obtained by RAPD with primers A13 (a) and A17(b) with Hp141 during the one year follow-up of the experimental infection.

Fig.1

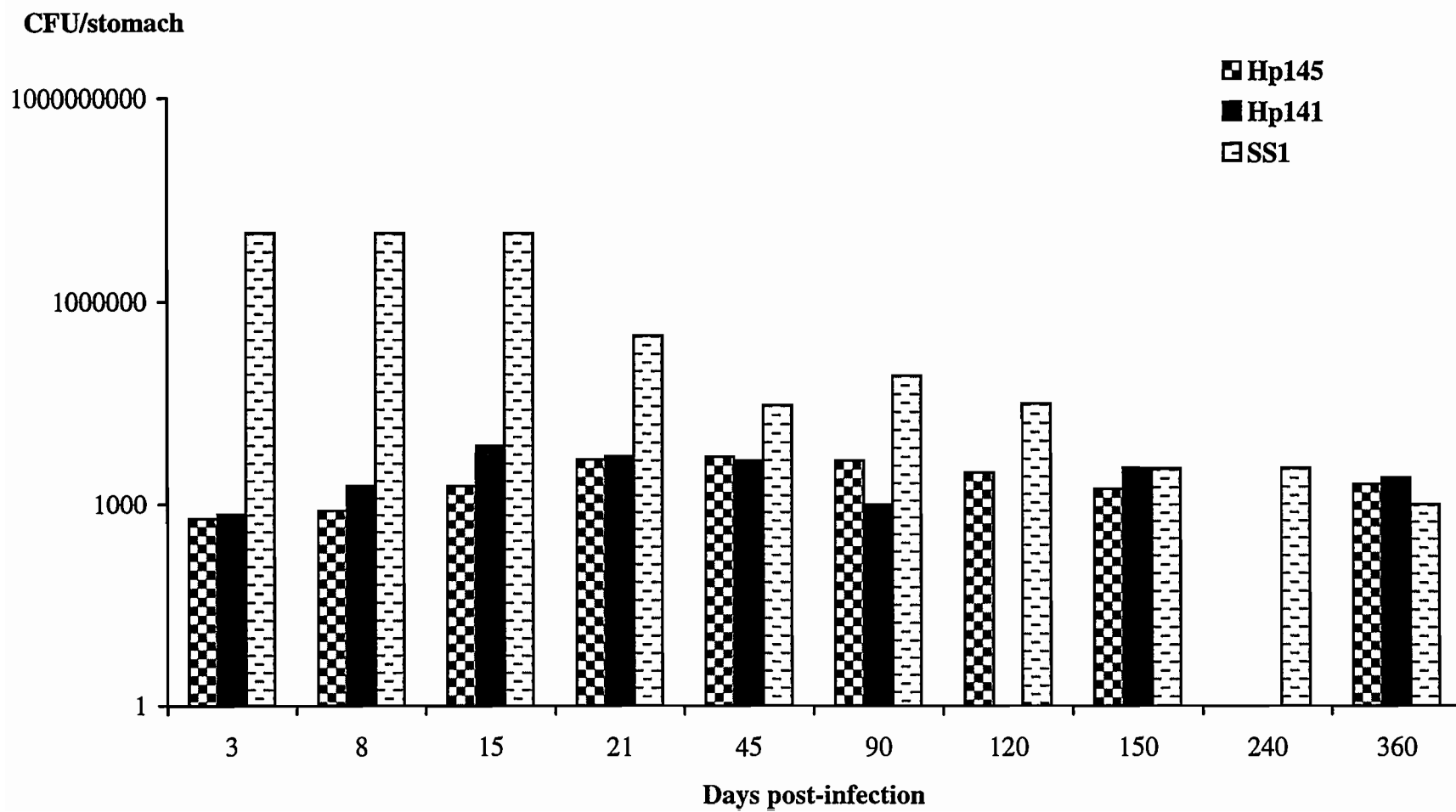
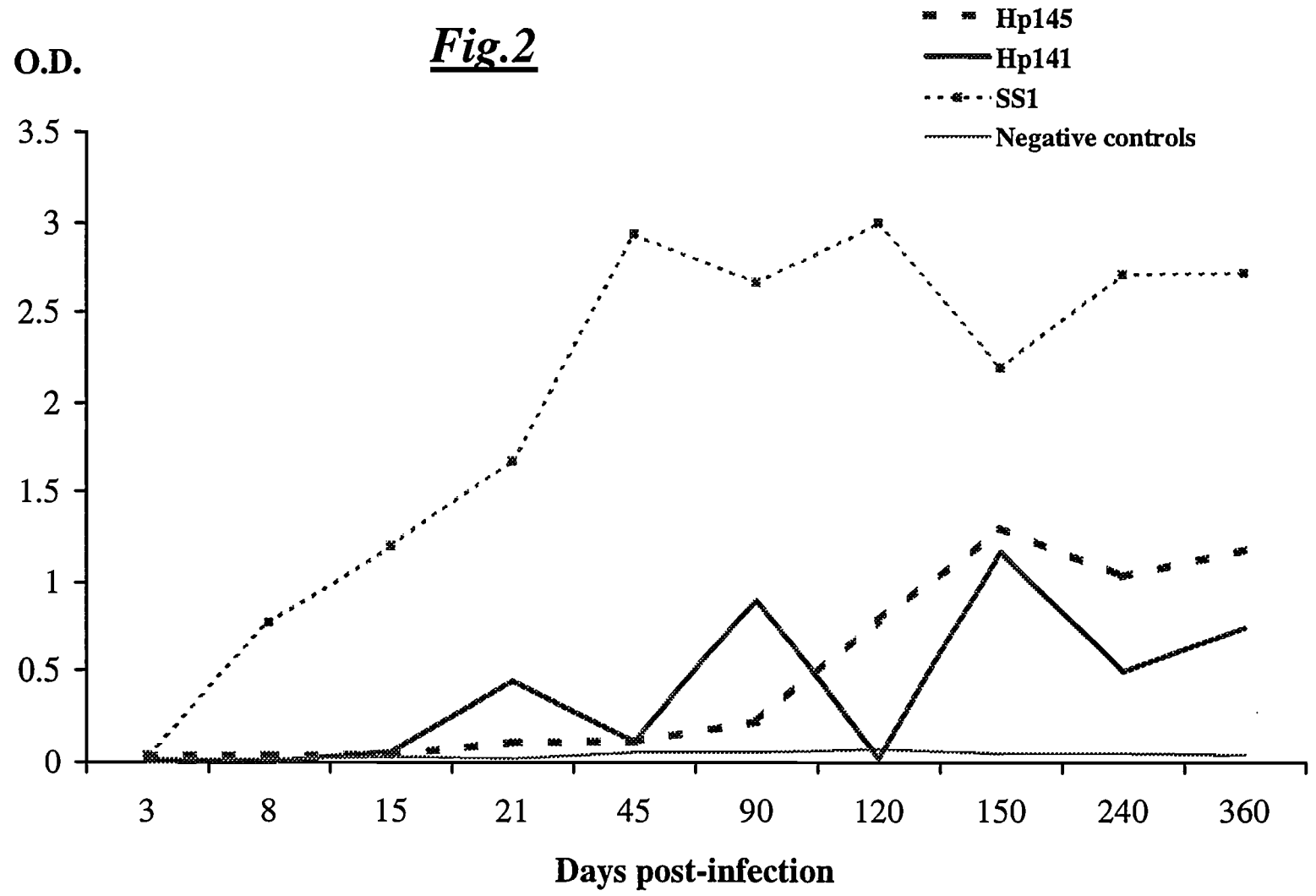
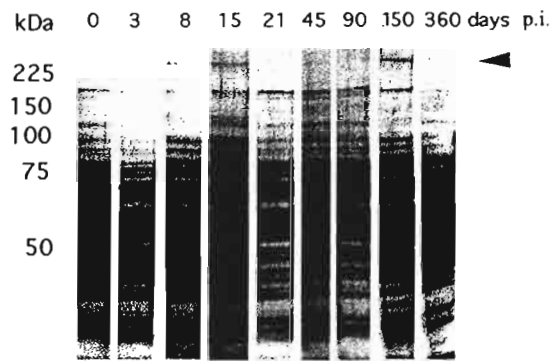
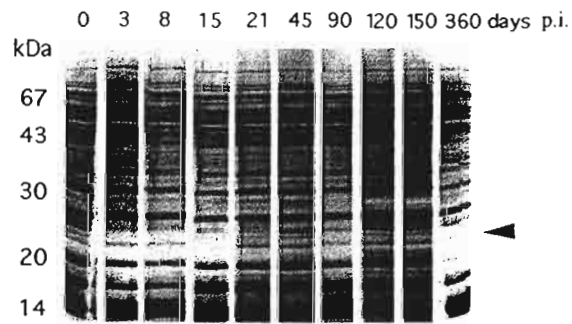
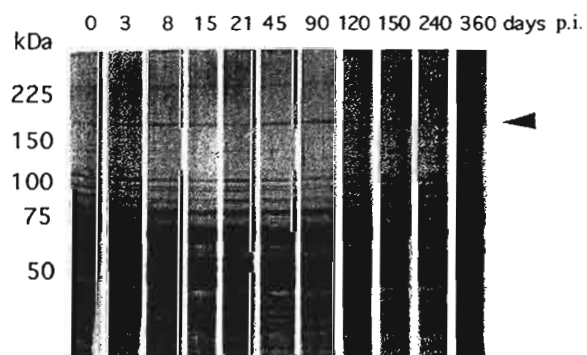


Fig.2



**a****b****c****Figure 3**

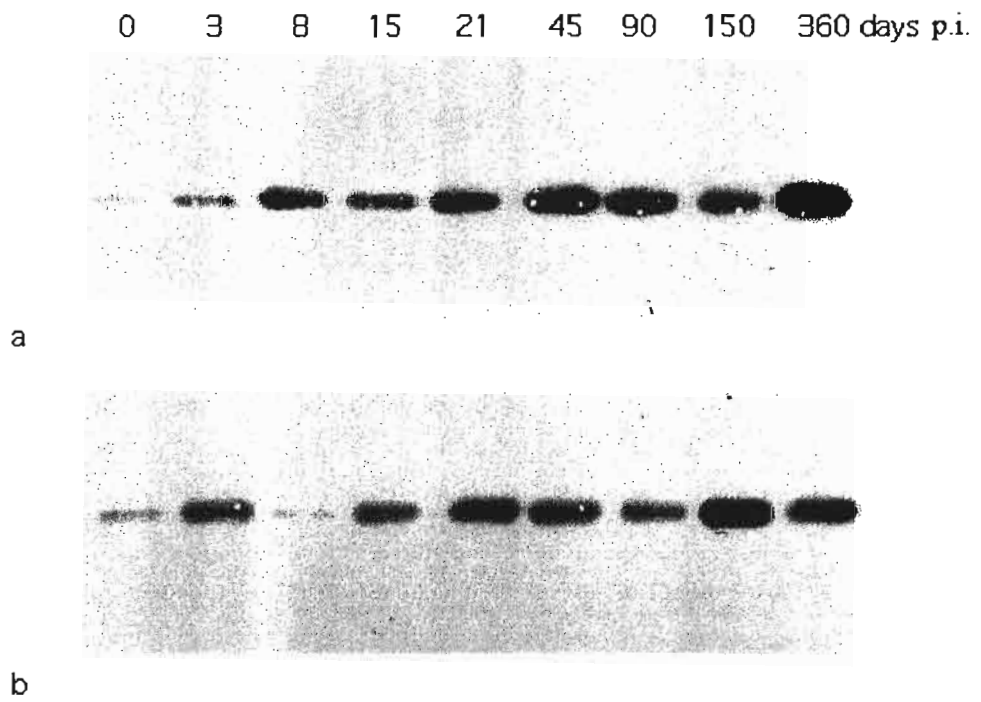
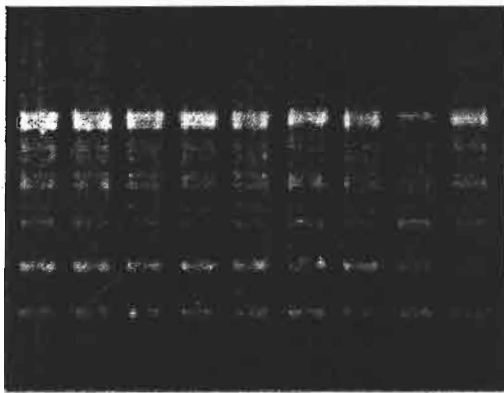


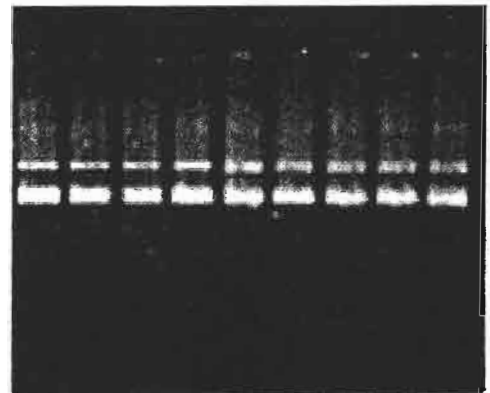
Figure 4

0 3 8 15 21 45 90 150 360 days pi.



a

0 3 8 15 21 45 90 150 360 days pi.



b

Figure 5

ETUDE DE LA STRUCTURE GENETIQUE DE L'ESPECE *HELICOBACTER PYLORI* PAR L'ANALYSE COMPARATIVE DE PLUSIEURS MARQUEURS MOLECULAIRES

Helicobacter pylori infecte plus de la moitié de la population mondiale. Cette bactérie, strictement inféodée à la muqueuse gastrique humaine, conduit à différentes maladies (gastrite chronique, ulcère, cancer gastrique). Cet agent pathogène présente un très grand polymorphisme génétique qui pourrait s'expliquer par une structure recombinante de l'espèce. L'objectif de ce travail est de préciser l'impact des échanges génétiques sur la structure génétique de l'espèce *H. pylori*.

Quatre vingt sept souches de *H. pylori* (57 isolats cliniques de France et 21 d'Asie et d'Amérique du Sud) ont été analysées par différents marqueurs. Cinq marqueurs spécifiquement présents chez *H. pylori* ont été considérés : *ureA-ureB*, *flaA* et *vacA*, dont le polymorphisme a été analysé, et *cagA* et *IS605*, dont la présence a été détectée. Trois marqueurs applicables à l'étude de tout organisme ont été également mis en œuvre : ribotypage, amplification génique aléatoire (RAPD) et analyse du polymorphisme électrophorétique des enzymes (MLEE). Les données obtenues ont été soumises à une étude de génétique des populations. Les relations entre les souches ont été recherchées par des méthodes phénétiques (UPGMA et Neighbor-Joining) et des analyses factorielles de correspondances.

L'ensemble des marqueurs analysés est apparu très polymorphe. Aucune corrélation n'a pu être établie entre les distributions des souches obtenues avec les différents marqueurs, suggérant un très haut degré de recombinaison génétique entre les souches de *H. pylori*. Les génotypes se distribuent indépendamment de l'origine géographique des souches et de la pathologie présentée par le patient. Par ailleurs, la comparaison des résultats obtenus pour *H. pylori* à ceux obtenus pour d'autres espèces, bactériennes ou protozoaires parasites, a montré que les échanges génétiques sont beaucoup plus fréquents dans l'espèce *H. pylori* que dans toutes les autres espèces analysées.

GENETIC STRUCTURE OF *HELICOBACTER PYLORI* SPECIES STUDIED BY A COMPARATIVE ANALYSIS OF SEVERAL MOLECULAR MARKERS

Helicobacter pylori colonizes the stomach of half of the world's human population, causing a wide spectrum of disease ranging from asymptomatic gastritis to ulcer and gastric cancer. *H. pylori* has an unusual pattern of genetic variation which complicates research on this organism. To gain better understanding of the forces behind this phenomenon, the extent to which recombination affects genetic variability in *H. pylori* was quantified and the influence of both geographical origin and clinical background were assessed.

Eighty seven strains of *H. pylori*, including 57 clinical isolates from France and 21 clinical isolates from Asia and South America, were analysed. Five specific markers of *H. pylori* were studied: *ureA-ureB*, *flaA* and *vacA*, by polymorphism analysis, *cagA* and *IS605*, by PCR detection. Three markers which are usable for whatever organism were also analysed: ribotyping, RAPD (random amplified polymorphic DNA) and MLEE (multilocus enzyme electrophoresis). The data were subjected to a linkage disequilibrium analysis to evaluate the respective impact of genetic exchange and clonal propagation on *H. pylori* population structure. The relationships among the genotypes recorded were depicted by phylogenetic approaches (UPGMA and Neighbor-Joining methods) and by factorial analysis of correspondence.

All the markers analysed proved to be highly polymorphic. No correlation could be established between the classifications obtained with the different markers. This suggests a high rate of recombination between strains. No grouping of strains was found with respect to their geographic origin and their clinical background. Comparisons with other microorganisms, bacteria or parasite protozoan, studied with the same techniques and the same statistics showed that the impact of genetic exchange is much higher in *H. pylori* than in all other species studied.

DISCIPLINE : Ecologie Microbienne

MOTS CLES : *Helicobacter pylori* - génétique des populations - polymorphisme génétique - recombinaison génétique - marqueurs génétiques - isoenzymes - amplification aléatoire de l'ADN - virulence

LABORATOIRES D'ACCUEIL

Laboratoire de Bactériologie-Virologie
Faculté de Médecine
22, avenue Camille Desmoulins - BP 815
29285 Brest cedex

Laboratoire de Microbiologie A
CHU La Milétrie
BP 577
86021 Poitiers cedex

Centre d'Etude sur le Polymorphisme des Microorganismes
Institut de Recherche pour le Développement
911, avenue Agropolis - BP 5045
34032 Montpellier cedex