

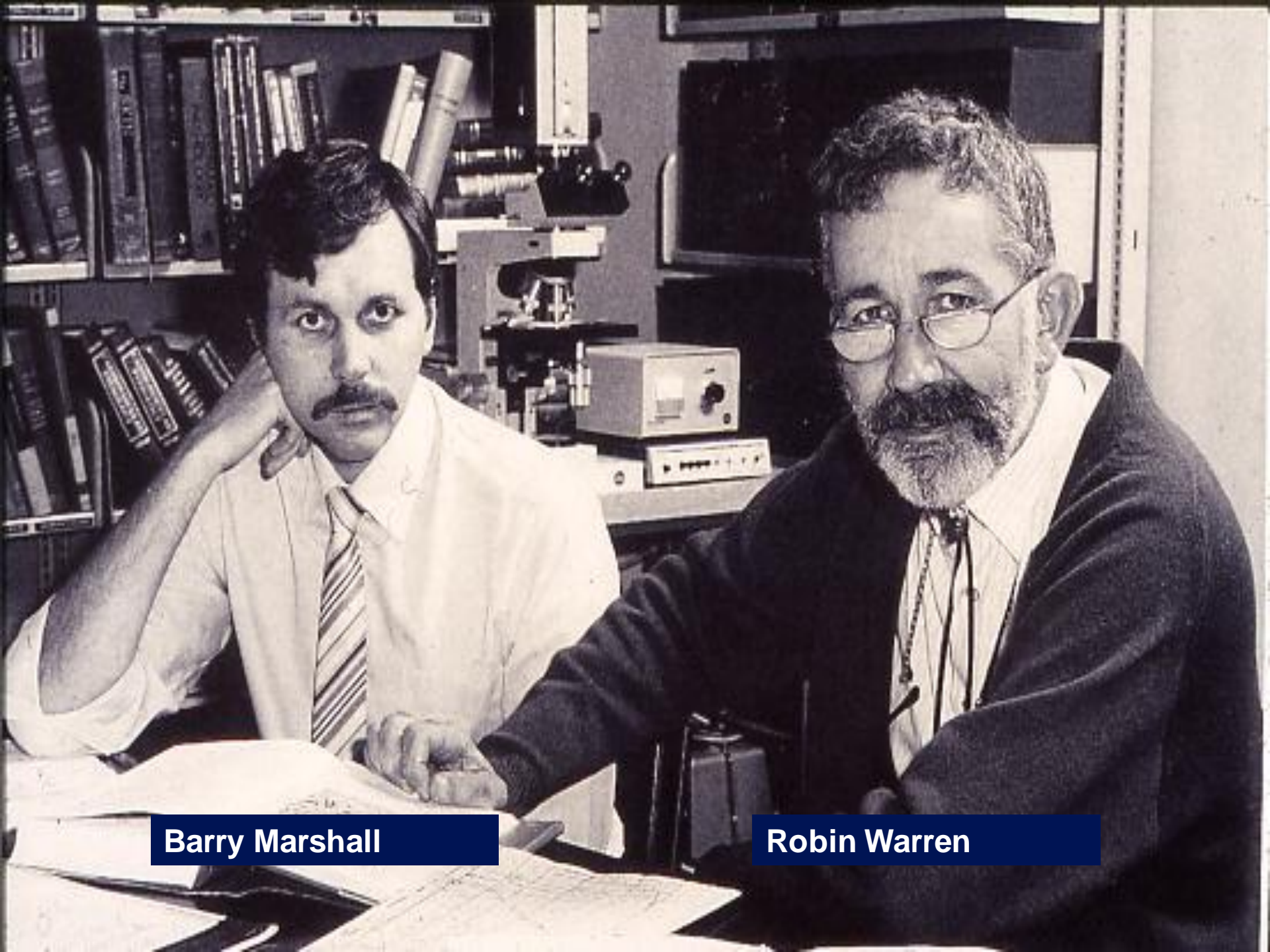
Helicobacter pylori : place des
examens biologiques dans le
diagnostic, la surveillance
thérapeutique et le dépistage

Francis Mégraud

INSERM U853 et Centre National de Référence des
Campylobacters et Hélicobacters
Laboratoire de Bactériologie, Université de Bordeaux et
Hôpital Pellegrin, Bordeaux

Helicobacter pylori





Barry Marshall

Robin Warren

Lauréats du Prix Nobel de Médecine 2005



Barry Marshall

Robin Warren

Caractéristiques de la superfamille VI de bactéries à Gram négatif (Branche ϵ des Protéobactéries)

- **Morphologie**
Incurvé, mobile, bacille à Gram négatif
- **Physiologie**
Microaérobie
Asaccharolytique
- **Ecologie**
Adaptation à la vie dans le mucus

Branche ϵ des Protéobactéries

Famille *Campylobacteraceae*

genre *Campylobacter*

genre *Arcobacter*

genre *Sulfospirillum*

Famille *Helicobacteraceae*

genre *Helicobacter*

genre *Wolinella*

Genre *Helicobacter*

Hélicobacters gastriques

H. pylori
H. acinonyx
H. heilmannii type 1 & 2
H. felis
H. salomonis
H. bizzozeronii

H. mustelae
H. suncus

Hélicobacters entériques

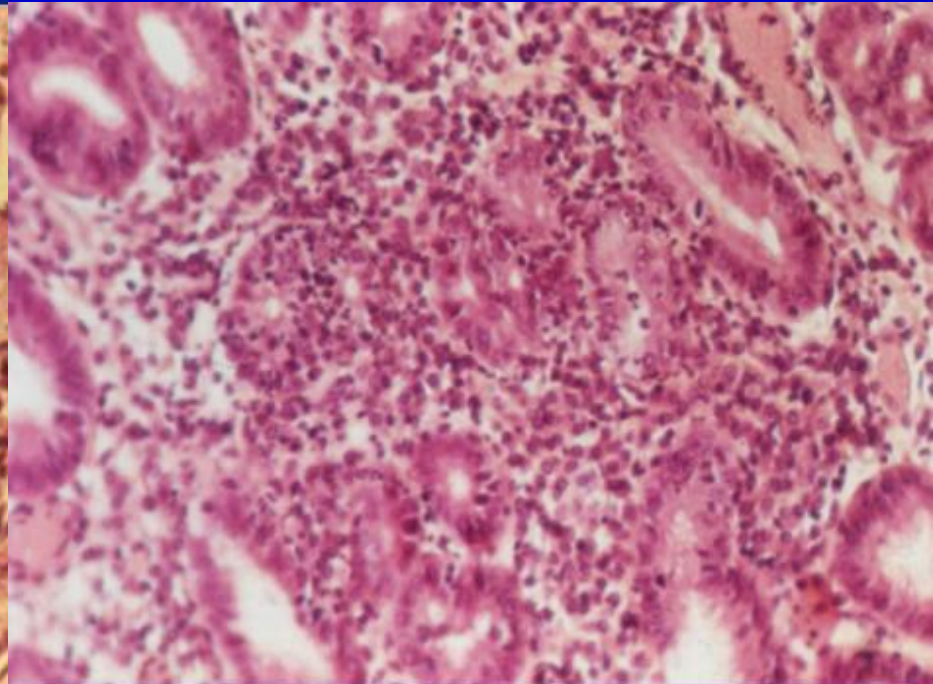
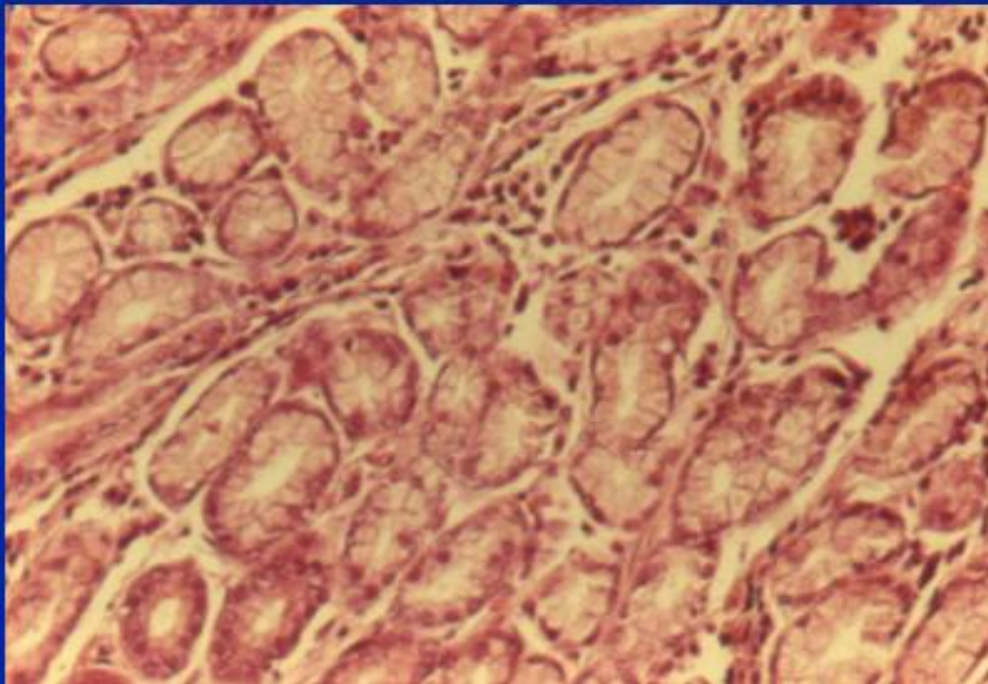
H. pullorum
H. canadensis
H. rodentium
H. aurati
H. trogontum
H. typhlonicus
H. cinaedi

H. canis
H. bilis
H. muridarum
H. hepaticus
H. fennelliae
H. pametensis
H. cholecystus
H. ganmani
H. winghamensis
H. mesocricetorum

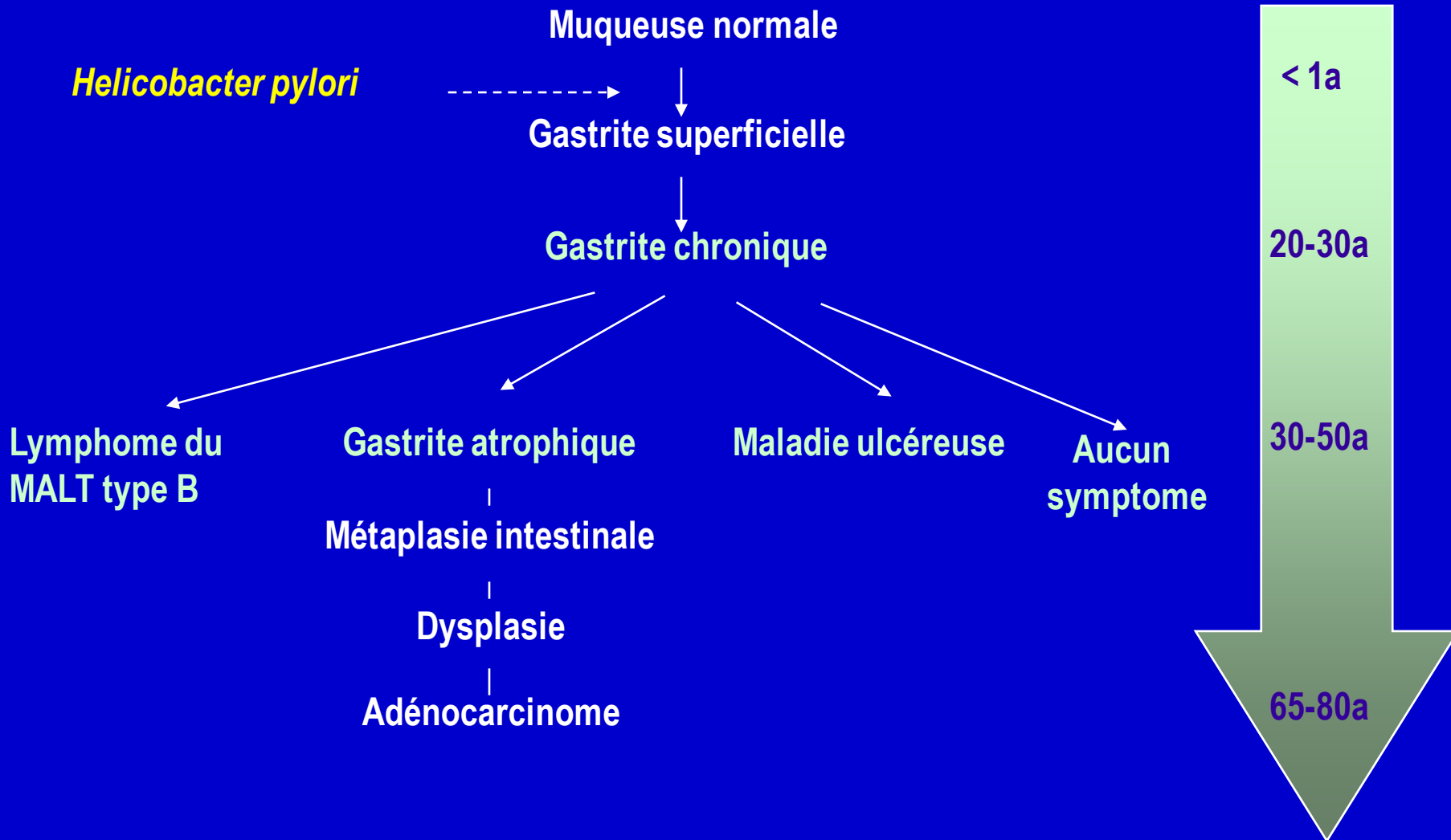
Lésion de base de l'infection à *H. pylori*

Muqueuse gastrique normale

Gastrite



H. pylori et maladies gastriques



Pourquoi le cancer ne se développe-t-il que chez certains sujets infectés ?

Facteurs
environnementaux

Facteurs
de l'hôte

```
graph TD; A[Facteurs environnementaux] --> B[Cancer gastrique]; C[Facteurs de l'hôte] --> B; D[Facteurs bactériens] --> B;
```

Cancer gastrique

Facteurs bactériens

Certaines souches sont-elles
plus carcinogènes que d'autres ?

Facteurs bactériens

Variabilité génotypique de *H. pylori*

- Études de microdiversité

Typage moléculaire - Toutes les souches non épidémiologiquement reliées sont virtuellement différentes

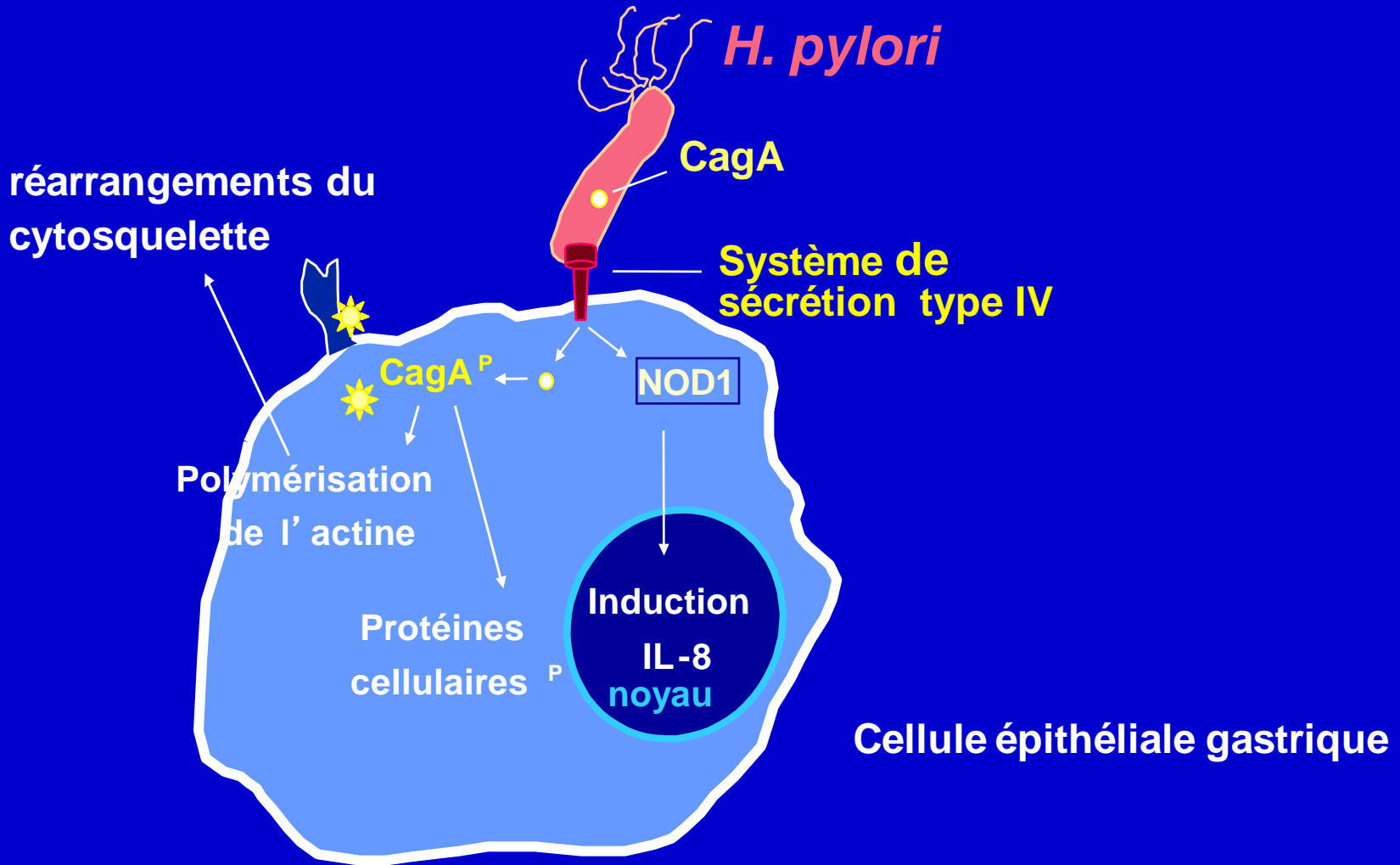
- Études de macrodiversité

Puces à ADN : 20% de gènes différents
Niveau de recombinaison extrêmement élevé

Facteurs de virulence de *H. pylori*

- Protéines de membrane externe
 - adhésines : *babA2*, *sabA*
 - *hopZ*, *hopQ*
- Inflammation (induction d' IL-8)
 - îlot de pathogénicité *cag*
 - *oipA*
 - *iceA1*
- Cytotoxine vacuolisante VacA

Rôle de l'îlot *cag* et de la protéine CagA



Méthodes de détection

Tests invasifs

Culture

Histologie

Urease test

PCR

Tests non invasifs

Test respiratoire

Test fécal (Ag)

Test urinaire (Ac)

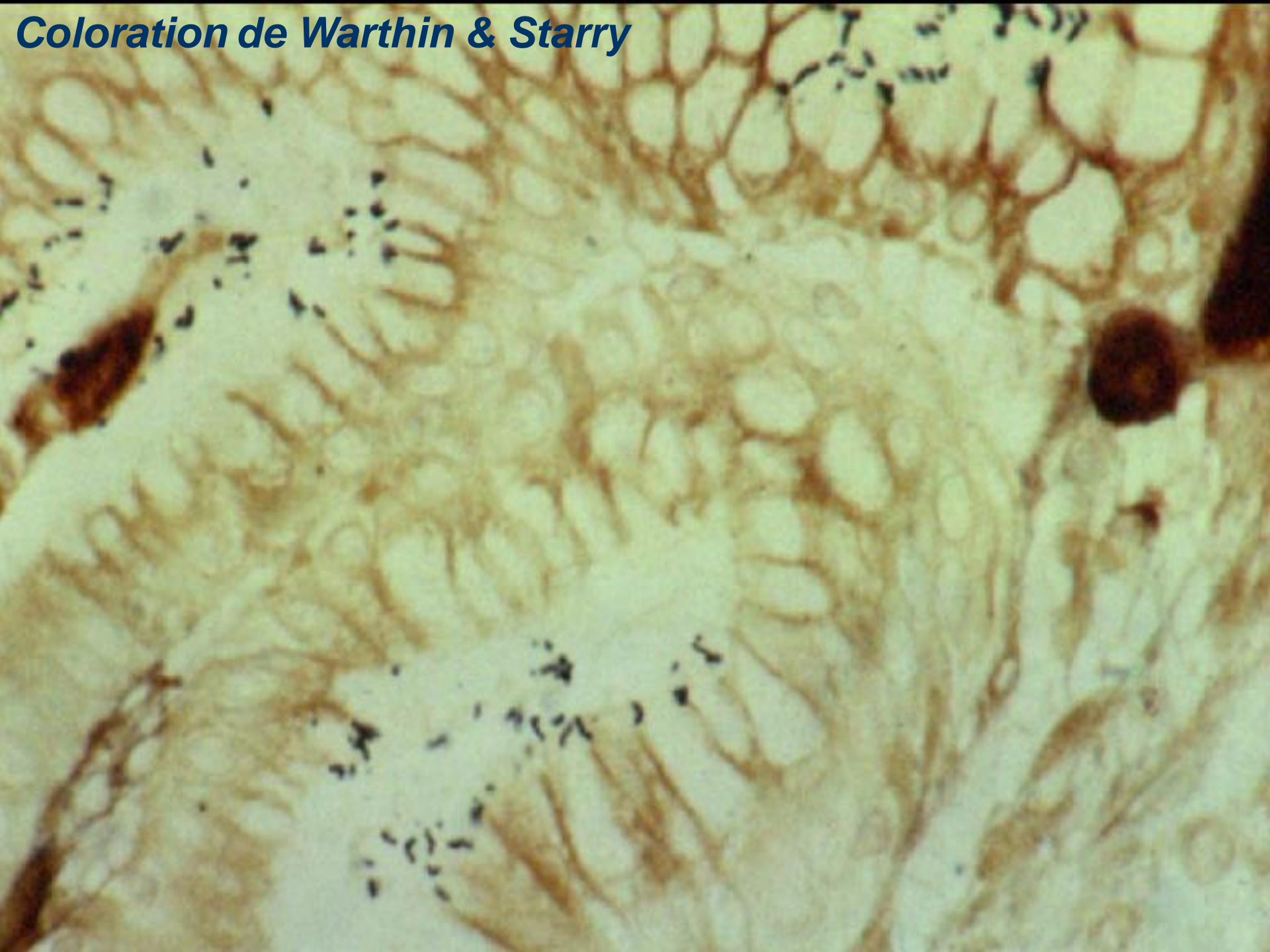
Test salivaire (Ac)

Sérologie (Ac)

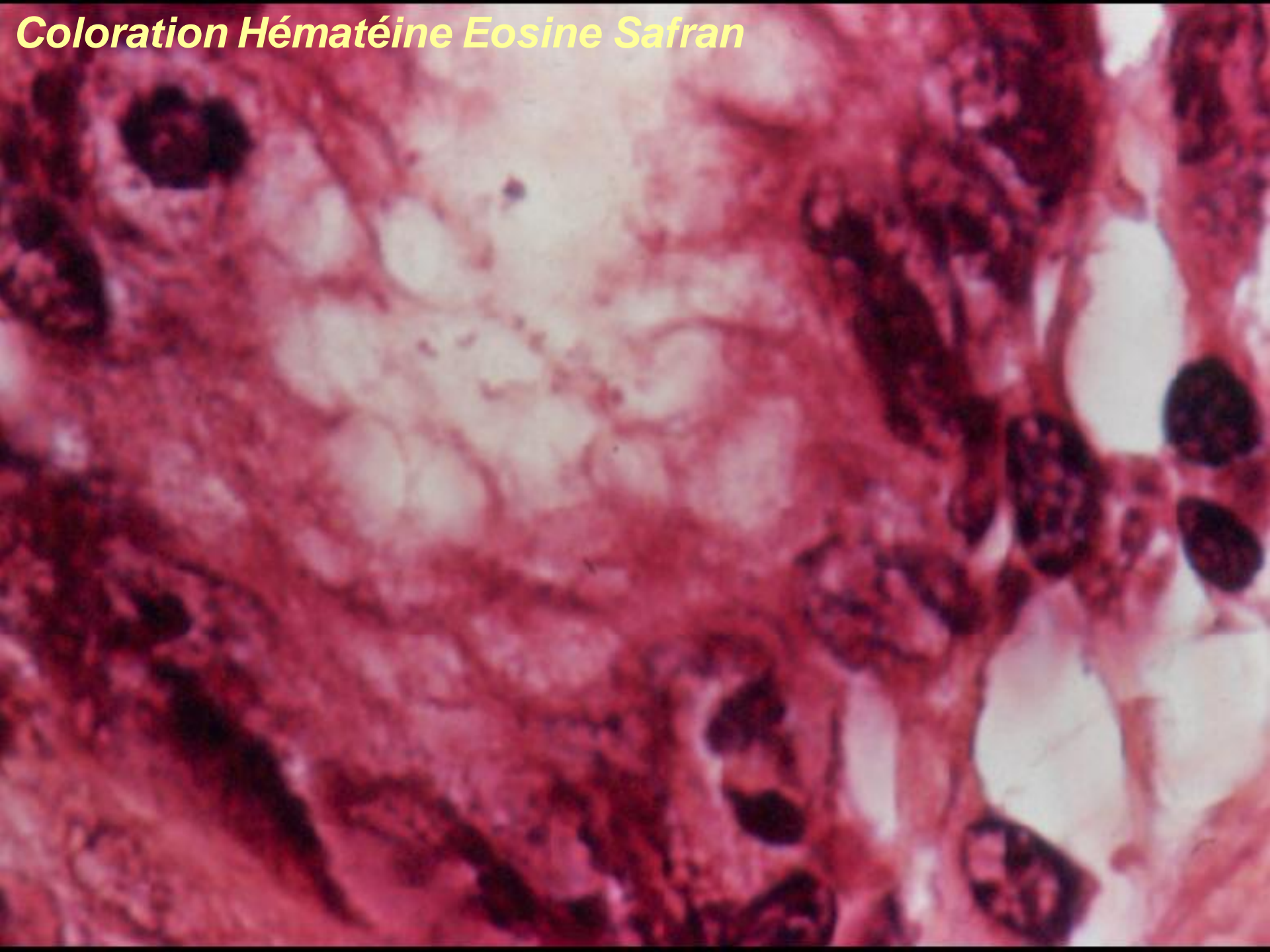
“Doctor test” (Ac)

Quelle méthode utiliser pour le diagnostic ?

Coloration de Warthin & Starry



Coloration Hématéine Eosine Safran



La “cascade” du cancer gastrique

selon P. Correa

H. pylori

→ Gastrite chronique



Atrophie



Métaplasie intestinale



Dysplasie



Adénocarcinome

Intérêt de l'examen anatomopathologique

- Bonne sensibilité et spécificité
- Pas de problème de transport des échantillons
- Valeur ajoutée de l'examen de l'état de la muqueuse

Mais dépend de la qualité des biopsies et de l'expérience de l'observateur

Méthode FISH

Utilise un couple de sondes oligonucléotidiques marquées fluorescentes (contre l'ADNr 16S et 23S)

Méthode: hybridation
observation par microscopie à fluorescence

Avantages: rapide (3 heures)
indépendant de la culture et de la PCR

Trebesius, Gut 2000, 46: 608-14

Test rapide à l'uréase

CLOtest®



- en salle
- d'endoscopie
- 80% sensibilité en 1h

L'uréase de *H. pylori* hydrolyse l'urée en CO₂ et NH₃ et le NH₃ fait virer l'indicateur de pH du jaune au rouge.

Intérêt du test rapide à l'uréase

En cas de résultat positif:

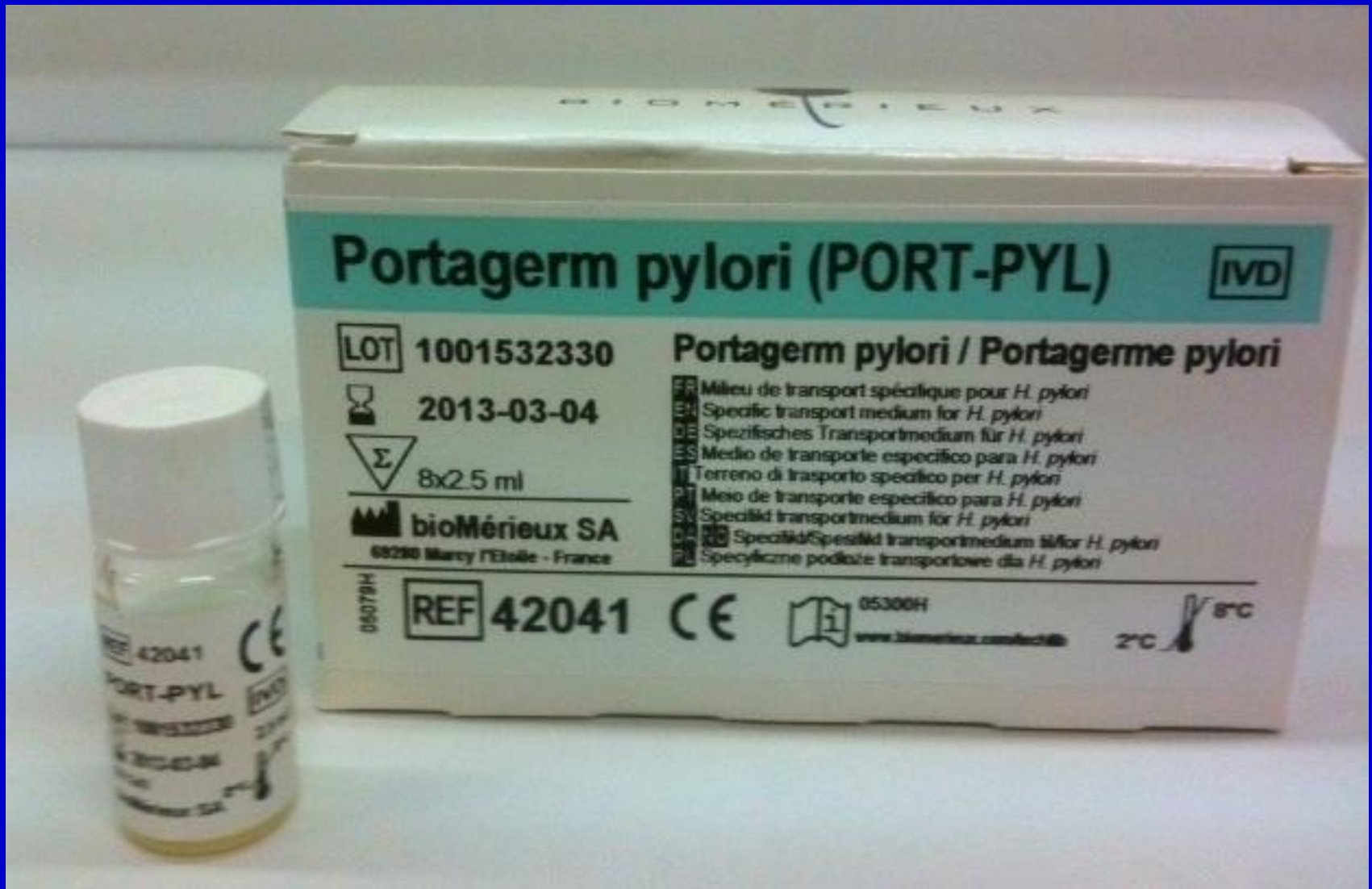
il permet la mise en route immédiate d'un traitement

NB. Pas utilisé en France car c'est un 'docteur test' non remboursé par l'assurance maladie

Exigences pré-analytiques pour la culture

- Conditions de prélèvement:
 - nécessaire d'obtenir des biopsies pour la culture (1 Antre 1 Fundus) avant celles obtenues pour l'histologie
 - les introduire dans un milieu de transport (ex: Portagerm pylori)
- Conditions de transport:
 - utiliser un système pour transport réfrigéré
 - envoyer en courrier rapide

Transport des biopsies pour culture



Colonies de *H. pylori* sur gélose au sang



Résistance bactérienne est importante à considérer pour 2 groupes d'antibiotiques:

- **Macrolides (clarithromycine)**
- **Fluoroquinolones (lévofloxacine)**

À cause de leur impact sur le résultat du traitement et de leur prévalence élevée

Test réalisable par antibiogramme ou par méthode moléculaire

La résistance de *H. pylori* n'est pas importante pour les autres groupes d'antibiotiques:

- **Amoxicilline**
- **Tétracycline**
- **Rifabutine**

du fait de leur prévalence faible

Cas particulier: Métronidazole

- Absence de reproductibilité des tests in vitro, peut être due à l'absence de contrôle du potentiel redox :

le métronidazole est une prodrogue qui doit être réduite dans la cellule bactérienne

- Impact limité de la résistance in vitro sur l'efficacité des traitements d'éradication:

18% de baisse d'efficacité avec IPP-Métro-clari et 5% avec la quadrithérapie

Réalisation d'un antibiogramme

Critères de l'EUCAST

- Sur Mueller Hinton 10% sang cheval ou 5% sang cheval + BetaNAD
- Inoculum Mc Farland 3 à partir d'une culture récente
- Utiliser des Etest pour obtenir la CMI
- Incubation 37° C en atmosphère micro-aérobie pendant 2 à 3 jours
- Valeurs seuil définies

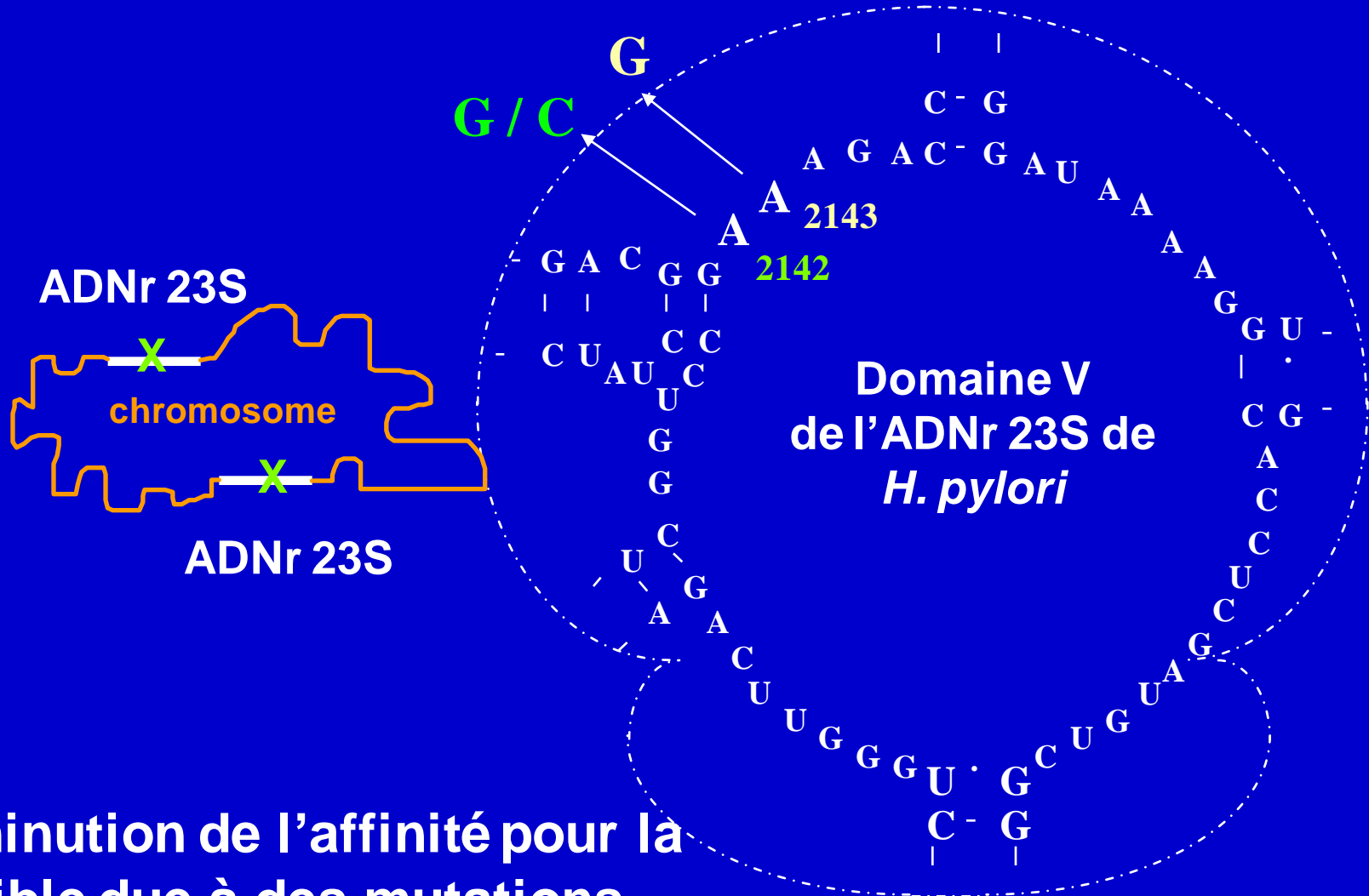
Intérêt de la culture

- **Bonne sensibilité et spécificité maximale**
- **Valeur ajoutée de la possibilité de faire l'antibiogramme**

Mais problème de transport des échantillons et de réalisation au laboratoire

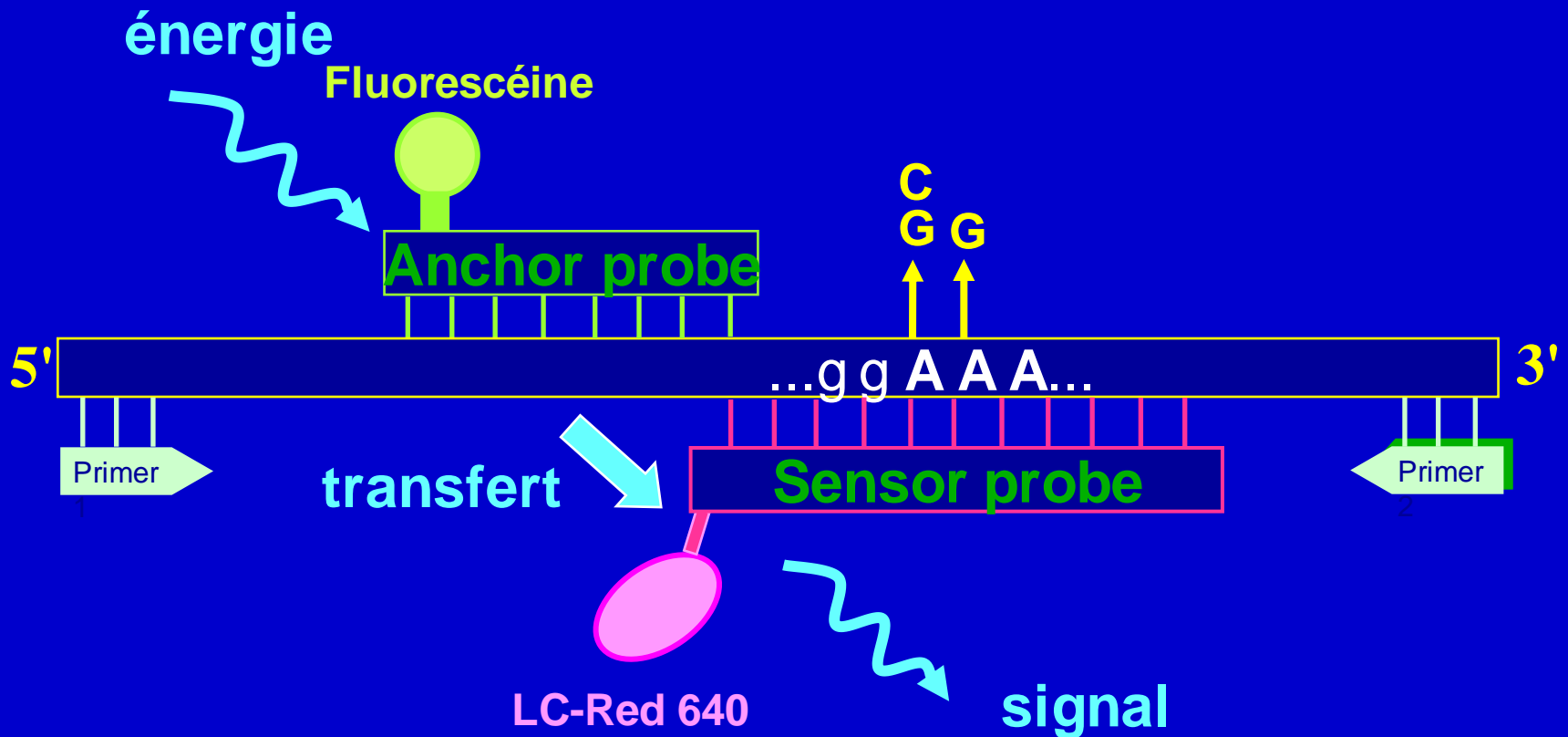
PCR en temps réel pour la
détection de *H. pylori* ...
et des mutations associées à la
résistance à la clarithromycine

Mécanisme de la résistance de *H. pylori* aux macrolides



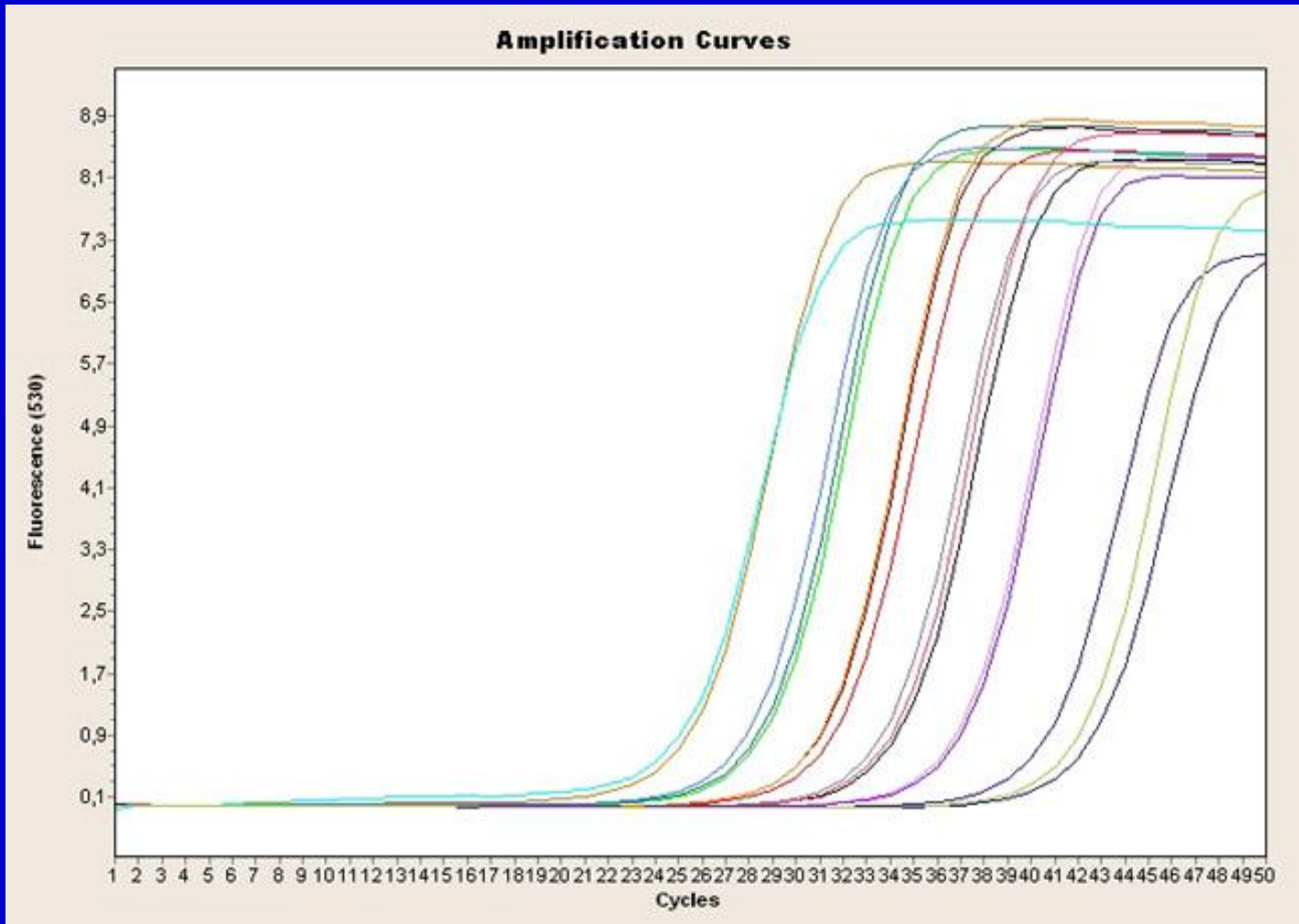
Diminution de l'affinité pour la cible due à des mutations ponctuelles

Principe de la PCR en temps réel en FRET avec une sonde double



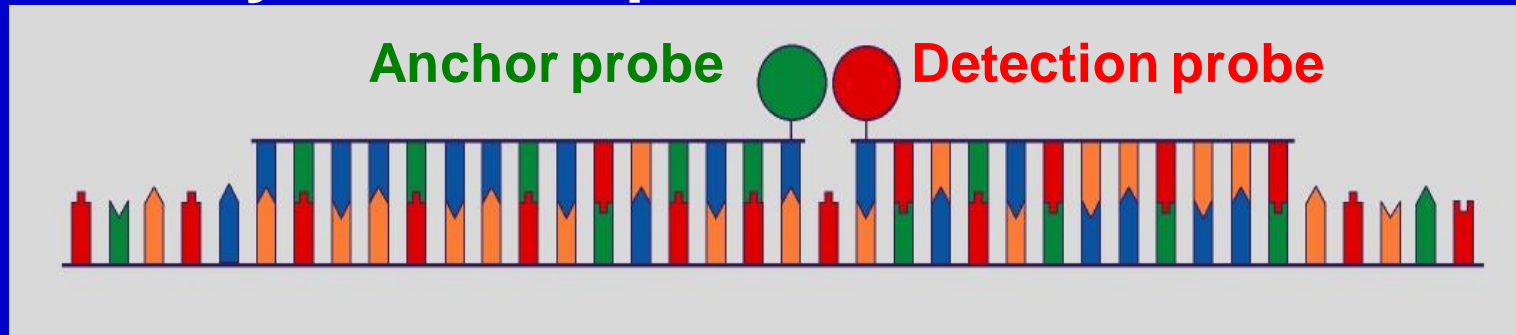
FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

Courbe d'amplification



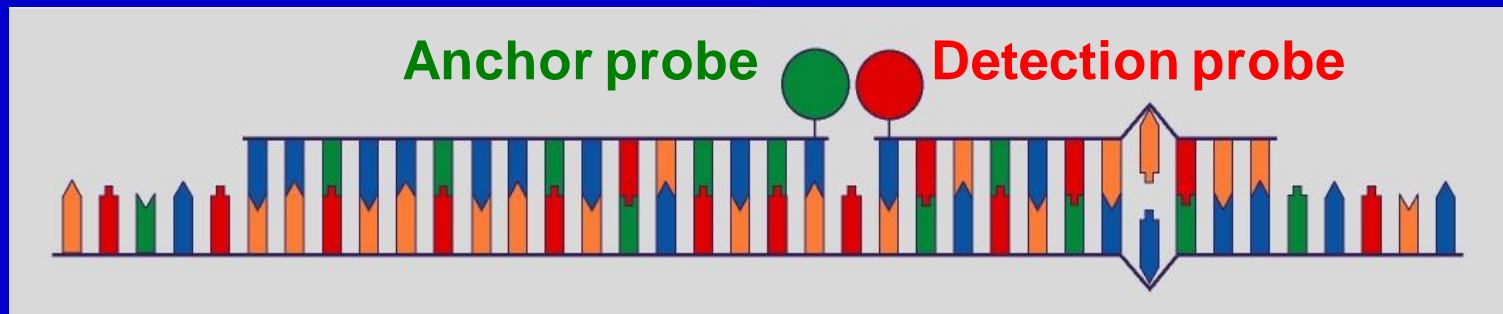
Detection de la mutation par la température de fusion des amplicons

Hybridation parfaite



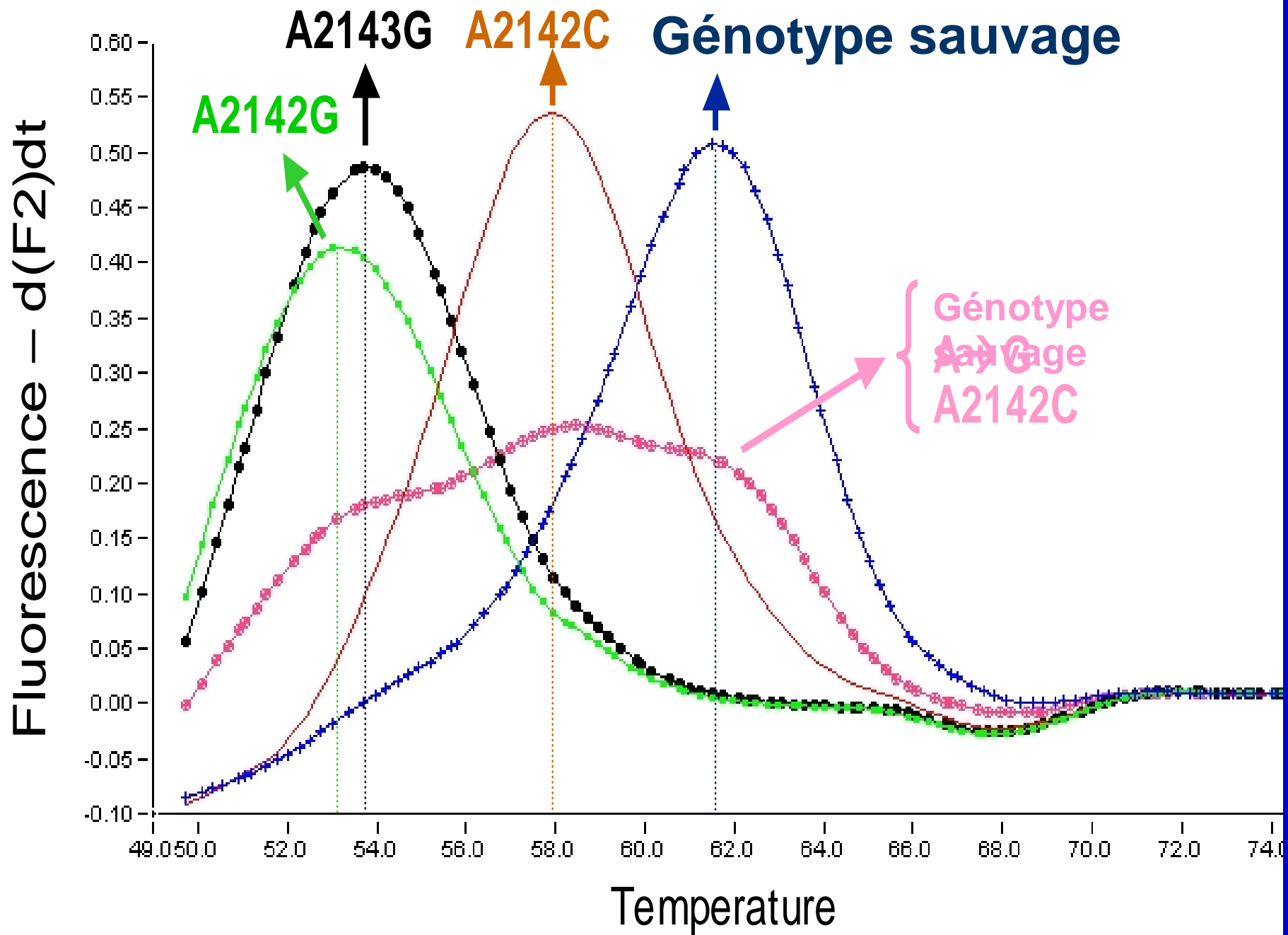
↳ Tm élevé

Misappariement



↳ décroissance du Tm

Tm : température conduisant à 50% de déshybridation



PCR en temps réel FRET-MCA

Réception biopsie

1 heure



**Ecrasement biopsie, lyse
bactérienne & extraction ADN**

ADN

45 minutes



PCR (LightCycler®)

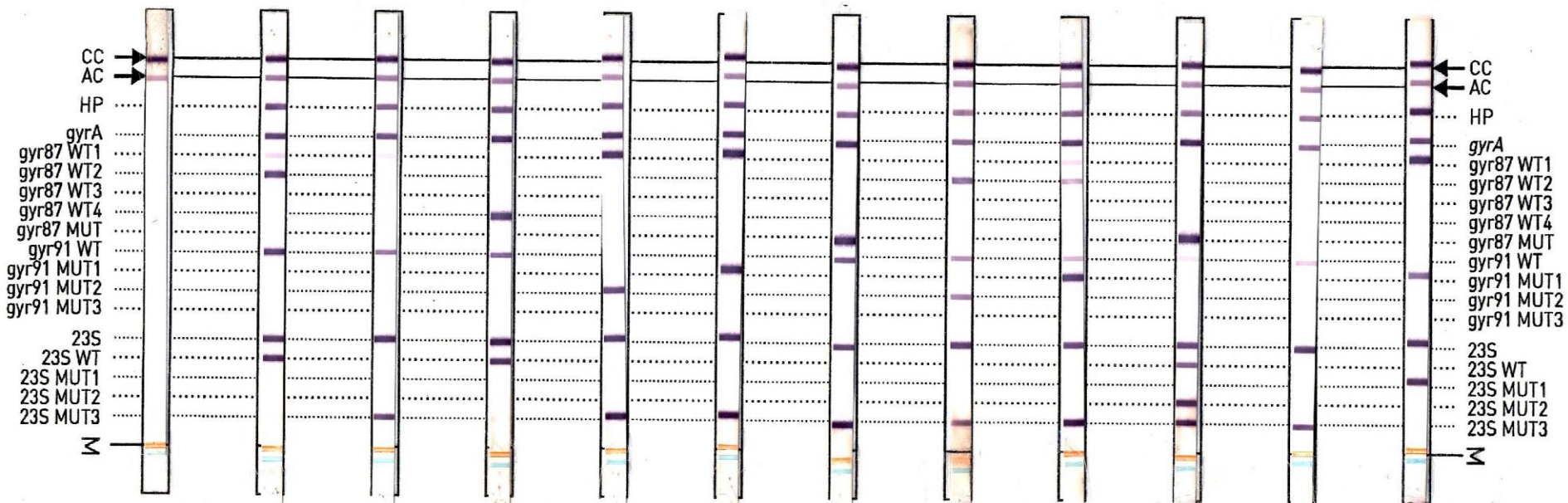
**Identification & détection des
mutations ponctuelles**

MCA: Melting Curve Analysis

Détection de *H. pylori* et des mutations associées à la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones

GenoType® HelicoDR (HAIN Lifescience)

PCR multiplex standard suivie d'une hybridation sur bandelette



Intérêt de la PCR

- Très bonne sensibilité et spécificité
- Pas de problème de transport des échantillons
- Résultat rapide
- Valeur ajoutée de la possibilité de rechercher les mutations associées à la résistance pour les 2 antibiotiques les plus importants

Mais kits encore difficile à obtenir

Traitements disponibles

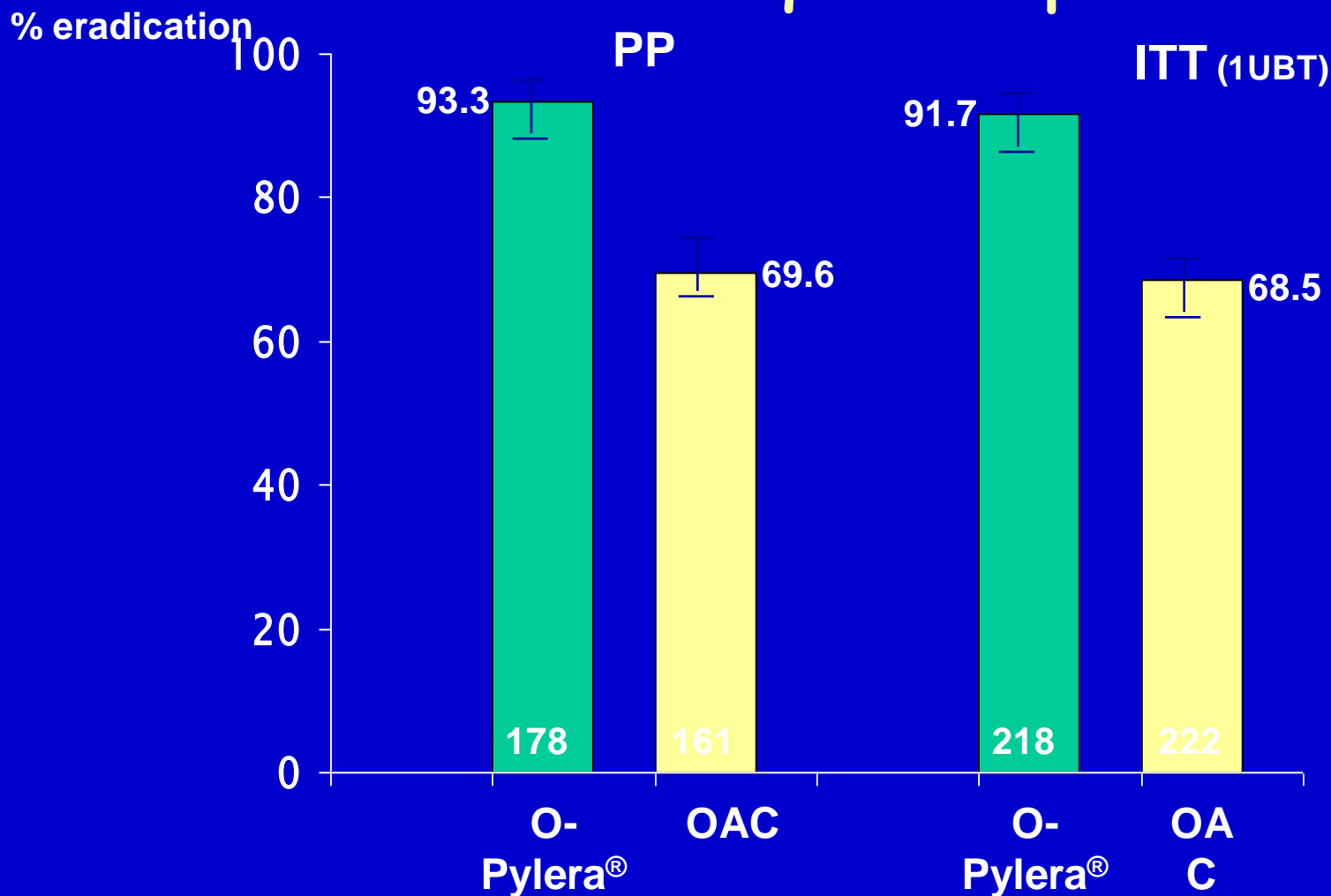
Triple thérapies de 1^{ère} intention:

IPP - Clarithromycine - Amoxicilline

**IPP - Clarithromycine - Métronidazole
administrés durant 7 à 14 jours**

Eradication de *H. pylori* avec Pylera[®]-oméprazole (10j) vs triple thérapie standard à base de clarithromycine (7d)

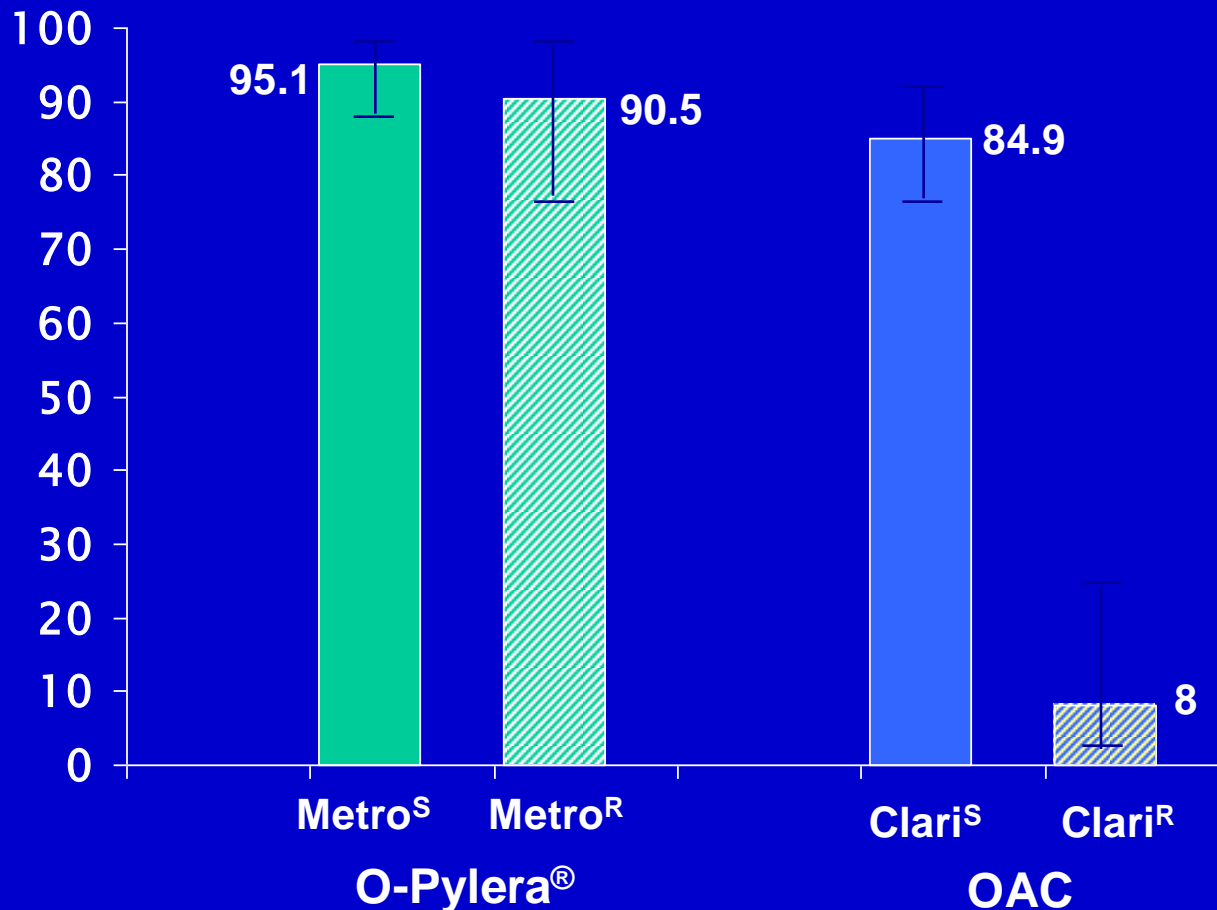
Etude Multicentrique Européenne



Eradication de *H. pylori* avec Pylera[®]-oméprazole (10j) vs triple thérapie standard à base de clarithromycine (7j) selon la résistance bactérienne

Etude Multicentrique Européenne

% eradication



Place de la sérologie

Seule méthode qui n'est pas affectée par les modifications locales de l'estomac:

- La masse bactérienne peut être en dessous du seuil de détection avec les autres méthodes

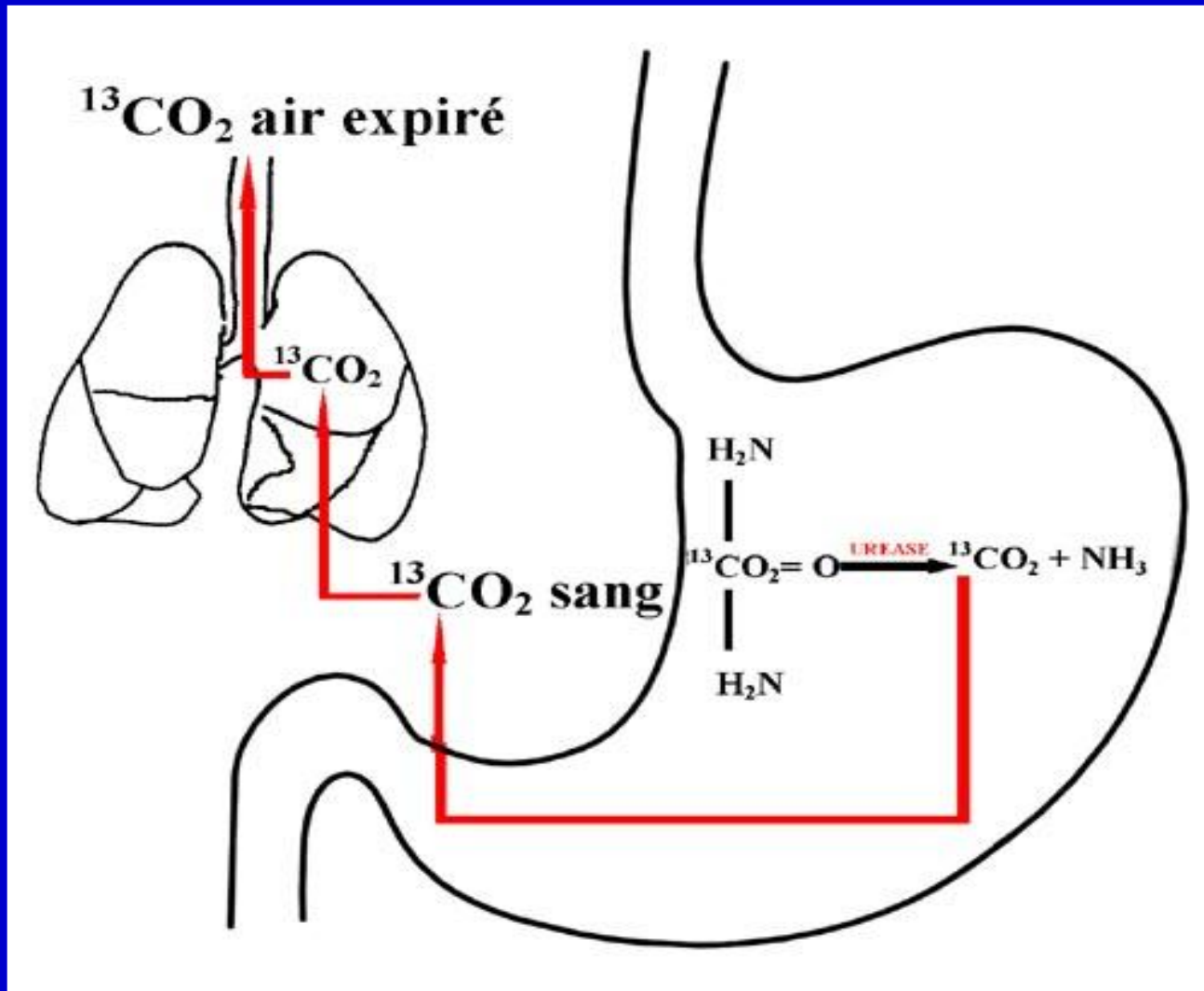
1. Transitoirement en cas de prise d'antibiotiques ou d'IPP

2. De manière permanente en cas de lésion précancéreuse ou cancéreuse gastrique

- Les Ac notamment anti CagA peuvent rester élevés durant des mois ou des années après la disparition de *H. pylori* de l'estomac

Quelle méthode utiliser pour la surveillance thérapeutique ?

Principe du test respiratoire à l'urée marquée au ^{13}C



- Recueil d'air expiré avant et 30 min après l'ingestion d'urée marquée au ^{13}C
- Détermination du ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Standardisation du TRU ¹³C

- Repas d'épreuve : acide citrique
- Dose d'urée : 75mg
- Collection des échantillons: 30 min
- Type d'appareil : MS ou IR
- Valeur seuil : $\delta > 4$ per mil

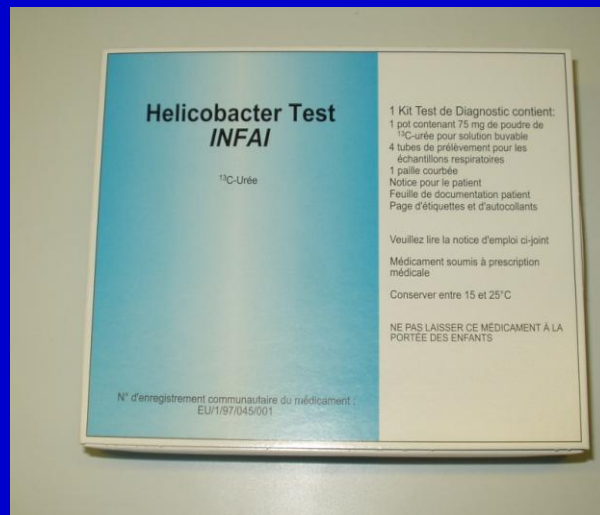
Intérêt du TRU ¹³C

- Bonne sensibilité et spécificité
- Test absolument non invasif et facile à réaliser
- Pas de problème de transport
- Résultat objectif

Mais peu de laboratoires disposent d'un spectromètre de masse et résultat influencé par la prise d'IPP

Tests respiratoires commercialisés en France

Helicobacter Test INFAI



HeliKit (Mayoly Spindler)



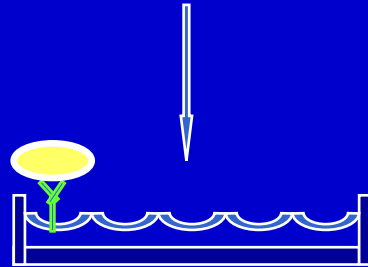
Manque repas d'épreuve
ac. citrique, jus d'orange

Principe de la recherche d'Ag dans les selles (Premier Platinum HpSA Meridian)

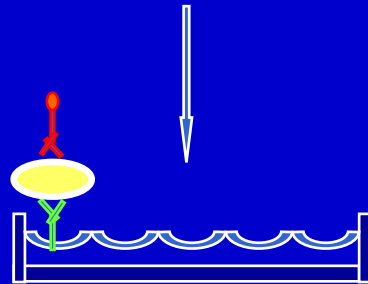
Test ELISA



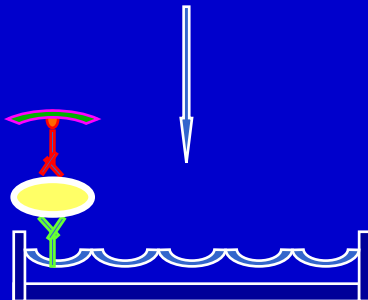
Ac monoclonaux fixés sur
plaque



+ selles du malade



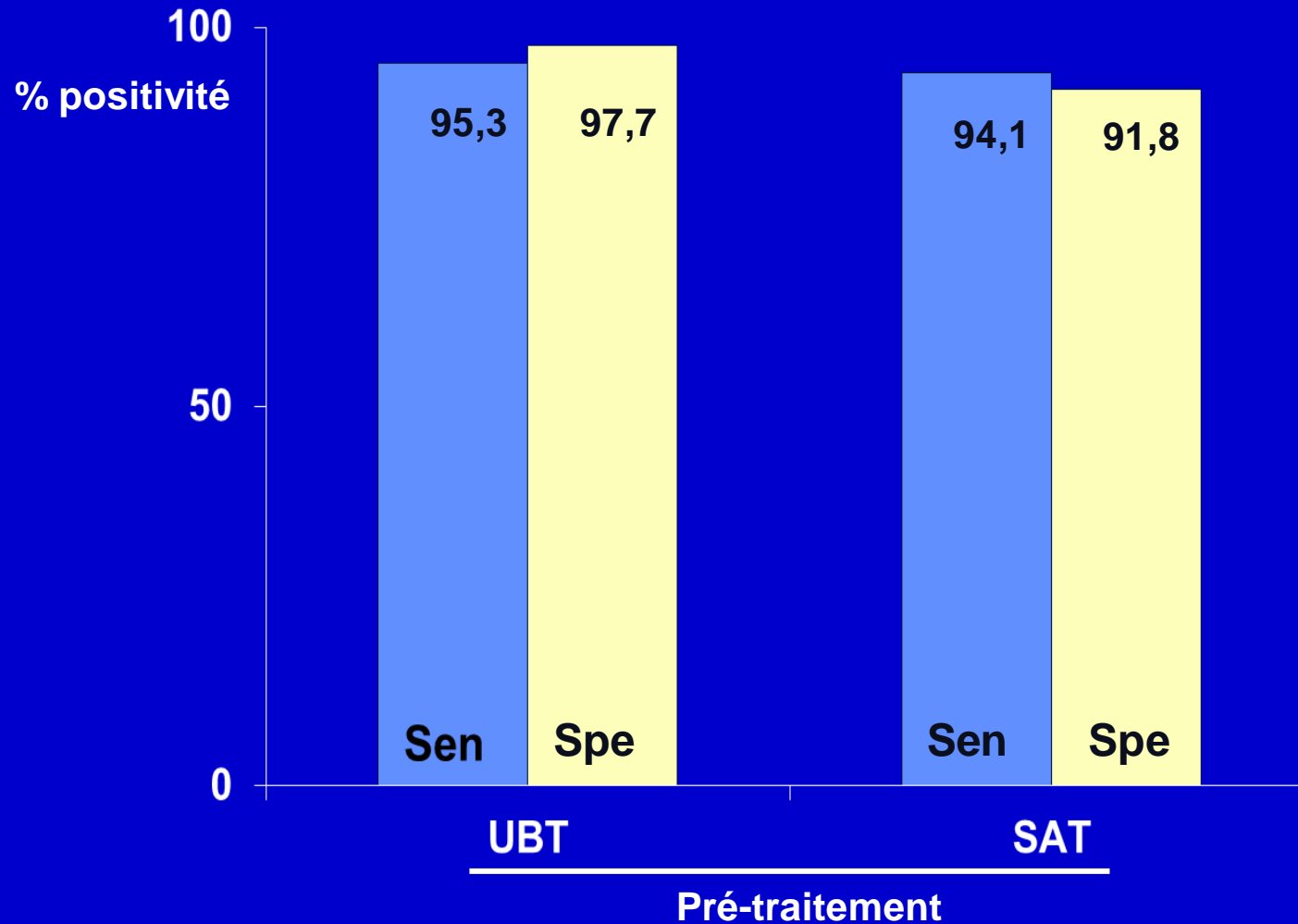
+ conjugué



+ substrat de
l'enzyme

Mesure d'une DO

Comparaison de la sensibilité et la spécificité du TRU et du TAS



Etude multicentrique de 501 patients: Culture positive ou histologie & uréase test positifs

Vaira et al., Lancet 1999;354:30-3

Quelle méthode utiliser pour le
dépistage dans la population
générale ?

Le moment pour proposer une éradication massive est-il arrivé ?

Quels sont les outils dont nous disposons pour le diagnostic et le traitement de l'infection à *H. pylori* ?

Quels sont les bénéfices et les problèmes que l'on peut attendre ?

Méthodes diagnostiques

Tests invasifs

Culture

Histologie

Urease test

PCR

Tests non invasifs

Test respiratoire

Test fécal (Ag)

Test urinaire (Ac)

Test salivaire (Ac)

Sérologie (Ac)

“Doctor test” (Ac)

Quel est le meilleur test de screening dans la population ?

Sérologie

Sur la base de

- fiabilité**
- coût**
- praticabilité**
- acceptabilité**

Impact de l'éradication de *H. pylori* en dehors de la prévention du cancer gastrique

- Diminution de la maladie ulcéreuse dans la population
- Amélioration de la dyspepsie non ulcéreuse chez une minorité de patients
- Diminution possible de certaines maladies auto-immunes et des maladies cardiovasculaires

Autres arguments positifs d'un point de vue personnel ou social

- Les gens sont concernés par la possible transmission de l'infection à leurs proches**
- Acceptation habituelle de l'éradication**
- Groupes les plus pauvres sont concernés**

Ethique

Problème majeur dans un programme où les avantages-inconvénients - conséquences ne sont pas clairement définis

Introduit des inquiétudes, de fausses sécurités...

Coût global de l'éradication

Elevé

**problème: dépense immédiate
pour un résultat à très
long terme (décennies)**

Comparaison avec la prévention du cancer colique

	Cancer gastrique	Cancer colique
Dépistage	Test sanguin (très fiable)	Test fécal (peu fiable)
Intervention	1 semaine de triple thérapie (coût limité)	Ablation de polypes (invasif, coûteux)
Prévention	Limitée? (point de non retour)	Bonne

Que devrait-on faire aujourd'hui?

- Mettre en place un programme d'éradication massive?
- Attendre que *H. pylori* disparaisse de lui-même?

Autre possibilité: éradication sélective

Chez les patients qui ont des symptômes digestifs

Chez les apparentés 1^{er} degré des malades souffrant de cancer gastrique

Dans les groupes ayant un risque élevé de cancer gastrique

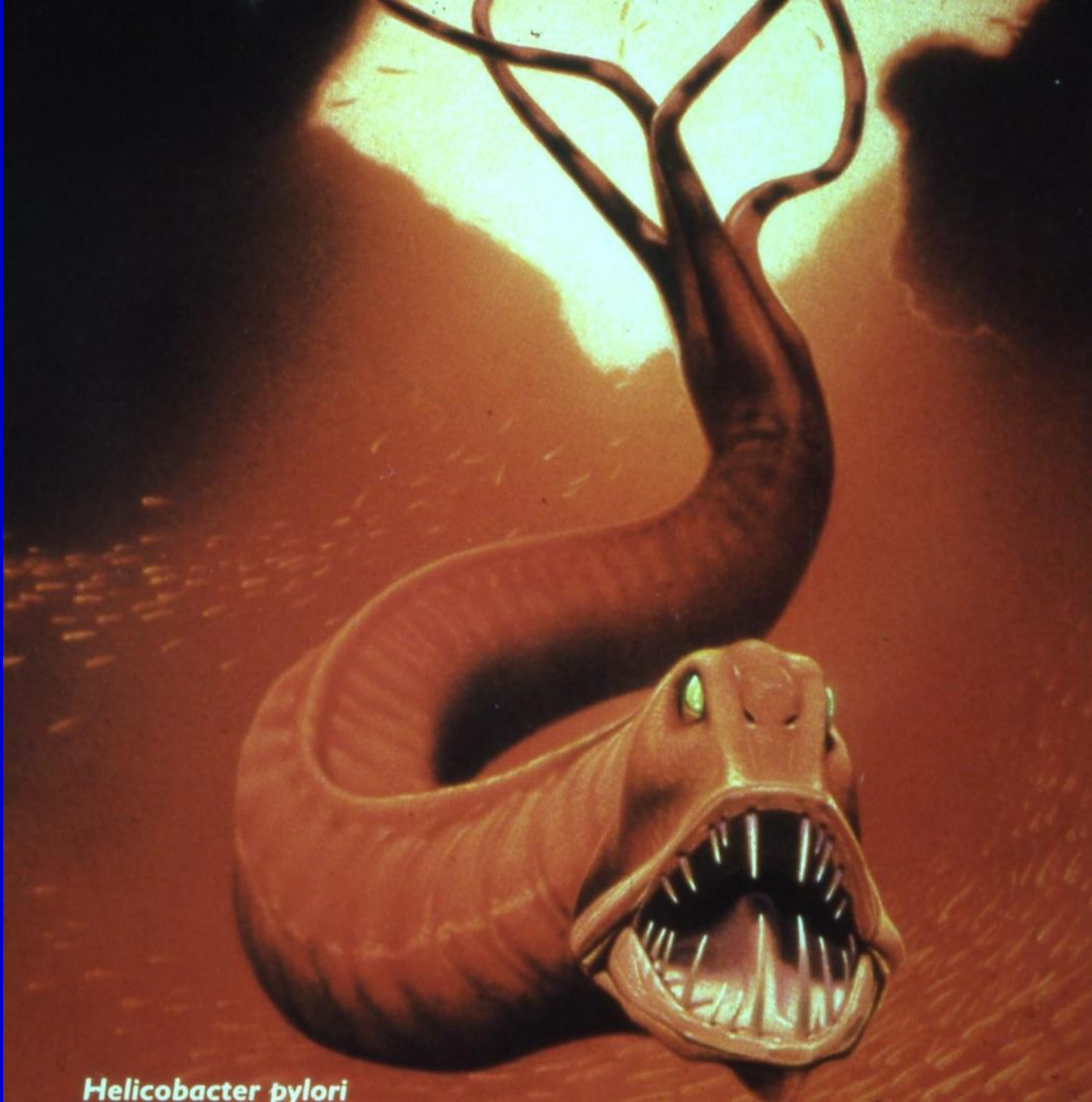
Chez les enfants?

Limite: un grand nombre de cas de cancers ne sera pas détecté

Vaccination

Serait la panacée!

- **Pas nécessaire de dépister**
(effet préventif et thérapeutique du vaccin)
- **Pas d'effet secondaire , ni de problème de résistance**
- **Coût limité**



Helicobacter pylori

Il est temps d'entreprendre
une campagne pour avoir un
Estomac Sain !

Création de
Healthy Stomach Initiative

Château Malartic-Lagravière

Mardi 11 juin 2013



Effet de la prise d'IPP au long cours sur le résultat du TRU

- Méthode

30 patients traités par 40 mg de pantoprazole durant 60 jours

TRU réalisé au temps 0, après 14, 30 et 60 jours et pour les cas TRU -, ensuite tous les 3 jours

- Résultat

TRU - dans 4 cas après 60 jours. Positivité réapparaît après 3 jours dans 1 cas et après 9 jours dans 3 cas