



Office de la Propriété
Intellectuelle
du Canada

Un organisme
d'Industrie Canada

Canadian
Intellectual Property
Office

An agency of
Industry Canada

CA 2180473 C 2012/06/12

(11)(21) **2 180 473**

(12) **BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT**

(13) **C**

(22) Date de dépôt/Filing Date: 1996/07/03

(41) Mise à la disp. pub./Open to Public Insp.: 1997/01/05

(45) Date de délivrance/Issue Date: 2012/06/12

(30) Priorité/Priority: 1995/07/04 (FR95 08 068)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/31* (2006.01),
A61K 39/106 (2006.01), *C07K 14/205* (2006.01),
C07K 16/12 (2006.01), *C12N 1/21* (2006.01),
G01N 33/564 (2006.01), *G01N 33/569* (2006.01),
A61K 48/00 (2006.01), *A61K 39/00* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
SUERBAUM, SEBASTIAN, DE;
LABIGNE, AGNES, FR

(73) Propriétaires/Owners:
INSTITUT PASTEUR, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE, FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : CLONAGE ET CARACTERISATION DU GENE FLBA DE H.PYLORI. PRODUCTION DE SOUCHES
AFLAGELLEES

(54) Title: CLONING AND CHARACTERIZATION OF H.PYLORI FLBA GENE. PRODUCTION OF AFLAGELLATE
STRAINS

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente demande concerne des séquences nucléotidiques régulant la biosynthèse des protéines des flagelles d'Helicobacter pylori, les protéines codées par ces séquences ainsi que des souches bactériennes aflagellées. L'invention vise aussi l'utilisation de ces moyens pour la détection d'une infection par H. pylori ou pour la protection contre une telle infection.



ABREGE

La présente demande concerne des séquences nucléotidiques régulant la biosynthèse des protéines des flagelles d'Helicobacter pylori, les protéines codées par ces séquences ainsi que des souches bactériennes aflagellées. L'invention vise aussi l'utilisation de ces moyens pour la détection d'une infection par H. pylori ou pour la protection contre une telle infection.

CLONAGE ET CARACTERISATION DU GENE *flaA* DE *H. PYLORI*.
PRODUCTION DE SOUCHES AFLAGELLEES

Helicobacter pylori (désigné également par l'expression H. pylori) est une bactérie à gram négatif retrouvée exclusivement à ce jour à la surface de la muqueuse de l'estomac chez l'homme.

Comme la plupart des bactéries, H. pylori est sensible à un milieu de pH acide mais cependant peut tolérer l'acidité en présence de taux physiologiques d'urée (Marshall et al (1990) Gastroenterol. 99: 697-702).
10 En hydrolysant l'urée sous forme de dioxyde de carbone et d'ammoniac qui sont relargués dans le microenvironnement de la bactérie, l'uréase de H. pylori permet la survie de la bactérie dans l'environnement acide de l'estomac. Récemment des études menées sur des modèles animaux ont fourni des éléments suggérant que l'uréase est un facteur important dans la colonisation de la muqueuse gastrique (Eaton et al (1991) Infect. Immun. 59: 2470-2475). L'uréase est également suspectée de causer des dommages soit directement, soit indirectement, à la muqueuse gastrique.

Helicobacter pylori (H. pylori) est à l'heure actuelle reconnu comme l'agent étiologique des gastrites antrales, et apparaît comme un des
20 cofacteurs requis pour le développement des ulcères. Par ailleurs il semble que le développement de carcinomes gastriques puisse être associé à la présence de H. pylori.

Afin de mettre au point des moyens nouveaux sensibles et spécifiques pour la détection in vitro d'infections par des bactéries de l'espèce Helicobacter pylori, les inventeurs se sont intéressés au système de régulation de la mobilité de ces bactéries.

Dans ce but, ils se sont intéressés à différentes modifications des souches de H. pylori, modifications qui n'affectaient pas la reconnaissance de ces bactéries par des sérums de patients infectés mais qui néanmoins
30 permettaient de ne pas obtenir de réaction de type « faux positif » en

particulier avec des bactéries de la famille de *Campylobacter* et par exemple, *Campylobacter jejuni*.

Les inventeurs ont en outre constaté que les bactéries modifiées obtenues pouvaient être, le cas échéant, utilisées dans le cadre de la fabrication de compositions immunogènes ou vaccinales. A cet égard, l'invention propose notamment des souches bactériennes vivantes atténuées.

10 Dans une première étape, les inventeurs ont identifié et isolé le gène flbA ayant une implication dans la régulation de la biosynthèse des flagelles de *H. pylori* et par conséquent, dans la régulation de la mobilité de la bactérie. La biosynthèse des flagelles comprend la synthèse des flagellines A et B, et de la gaine. Le gène flbA régule à la fois la synthèse des flagellines A et B, et la synthèse de la gaine contenant ces flagellines. Les inventeurs ont établi que le gène flbA était également intéressant en ce qu'il régulait la biosynthèse de la protéine d'ancrage de la bactérie, encore appelée "crochet".

20 SOMMAIRE DE L'INVENTION

La présente invention a trait à l'utilisation pour la détection *in vitro* d'une infection par *H. pylori* dans un échantillon de fluide biologique prélevé chez un patient, d'une souche bactérienne recombinante d'*Helicobacter pylori* ayant un phénotype aflagellé résultant de la mutation par substitution, addition et/ou délétion de bases ou d'un fragment nucléotidique dans la séquence nucléotidique du gène flbA participant à la régulation de la biosynthèse des protéines des flagelles de *H. pylori*, ladite séquence nucléotidique du gène flbA hybridant de façon spécifique avec une sonde correspondant à un fragment de nucléotides de *H. pylori* amplifié à

2a

l'aide des deux oligonucléotides dégénérés répondant aux séquences suivantes:

OLFlba-1: ATGCCTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG et OLFlba-2: GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC, ou s'hybridant de façon spécifique avec ces oligonucléotides lorsque l'hybridation est réalisée à 42°C en présence de 50% Formamide dans un tampon 2XSSC contenant 0,1% SDS et les lavages réalisés avec 2XSSC plus 0,1% SDS à 68°C, et ladite mutation étant telle que, soit le gène flbA n'est plus exprimé dans ladite souche bactérienne recombinante, soit le gène flbA ne permet pas la synthèse des flagelles de H. pylori.

10 La présente invention a également trait à une souche bactérienne recombinante, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par mutation, par substitution, addition et/ou délétion de bases ou d'un fragment nucléotidique dans la séquence nucléotidique du gène flbA participant à la régulation de la biosynthèse des protéines des flagelles de H. pylori, ladite séquence hybridant de façon spécifique avec une sonde correspondant à un fragment de nucléotides de H. pylori amplifié à l'aide des deux oligonucléotides dégénérés suivants:

20 OLFlba-1: ATGCCTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG et OLFlba-2: GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC, ou s'hybridant de façon spécifique avec ces oligonucléotides lorsque l'hybridation est réalisée à 42°C en présence de 50% Formamide dans un tampon 2XSSC contenant 0,1% SDS et les lavages réalisés avec 2XSSC plus 0,1% SDS à 68°C, et ladite mutation étant telle que, soit le gène flbA n'est plus exprimé dans ladite souche bactérienne recombinante, soit le gène flbA ne permet pas la synthèse des flagelles de H. pylori, ladite mutation étant effectuée dans la souche N6 déposée à la NCIMB le 26 juin 1992 sous le numéro NCIMB 40512.

La présente invention a également trait à l'utilisation pour la détection *in vitro* d'une infection par H.pylori dans un échantillon de fluide biologique prélevé chez un patient, d'un extrait bactérien caractérisé en ce qu'il s'agit d'un extrait de souches bactériennes définies dans l'invention.

2b

La présente invention a également trait à un procédé de détection in vitro d'une infection par H. pylori dans un échantillon de fluide biologique prélevé chez un patient, notamment dans un échantillon de sérum, comprenant les étapes de:

- mise en contact de l'échantillon testé avec une souche bactérienne telle que définie plus haut, ou avec un extrait bactérien tel que défini plus haut,
- détection d'une réaction immunologique entre ladite souche bactérienne et des anticorps dirigés contre H. pylori, présents dans l'échantillon testé.

10 La présente invention porte sur un sérum polyclonal dirigé contre une protéine ayant une séquence d'acides aminés telle que définie précédemment.

La présente invention porte sur un sérum polyclonal dirigé contre une souche de *H. pylori* telle que définie précédemment.

La présente invention a également trait à l'utilisation pour la détection in vitro d'une infection par H. pylori dans un échantillon biologique, d'une composition comprenant à titre de principe actif un sérum polyclonal obtenu contre une souche de H. pylori de phénotype aflagellé définie dans l'invention et un excipient.

La présente invention a également trait à un coffret de diagnostic pour détecter la présence d'anticorps chez des patients infectés par H. pylori
20 comprenant une souche bactérienne telle que définie plus haut ou un extrait bactérien tel que défini plus haut, et des réactifs nécessaires pour mettre en évidence une réaction de type antigène/anticorps.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

L'invention a donc pour objet l'utilisation pour la détection *in vitro* d'une infection par H.pylori dans un échantillon de fluide biologique prélevé chez un patient, d'une souche bactérienne recombinante d'Helicobacter pylori ayant un phénotype aflagellé résultant de la mutation par substitution, addition et/ou délétion de bases ou d'un fragment nucléotidique dans la séquence nucléotidique du gène

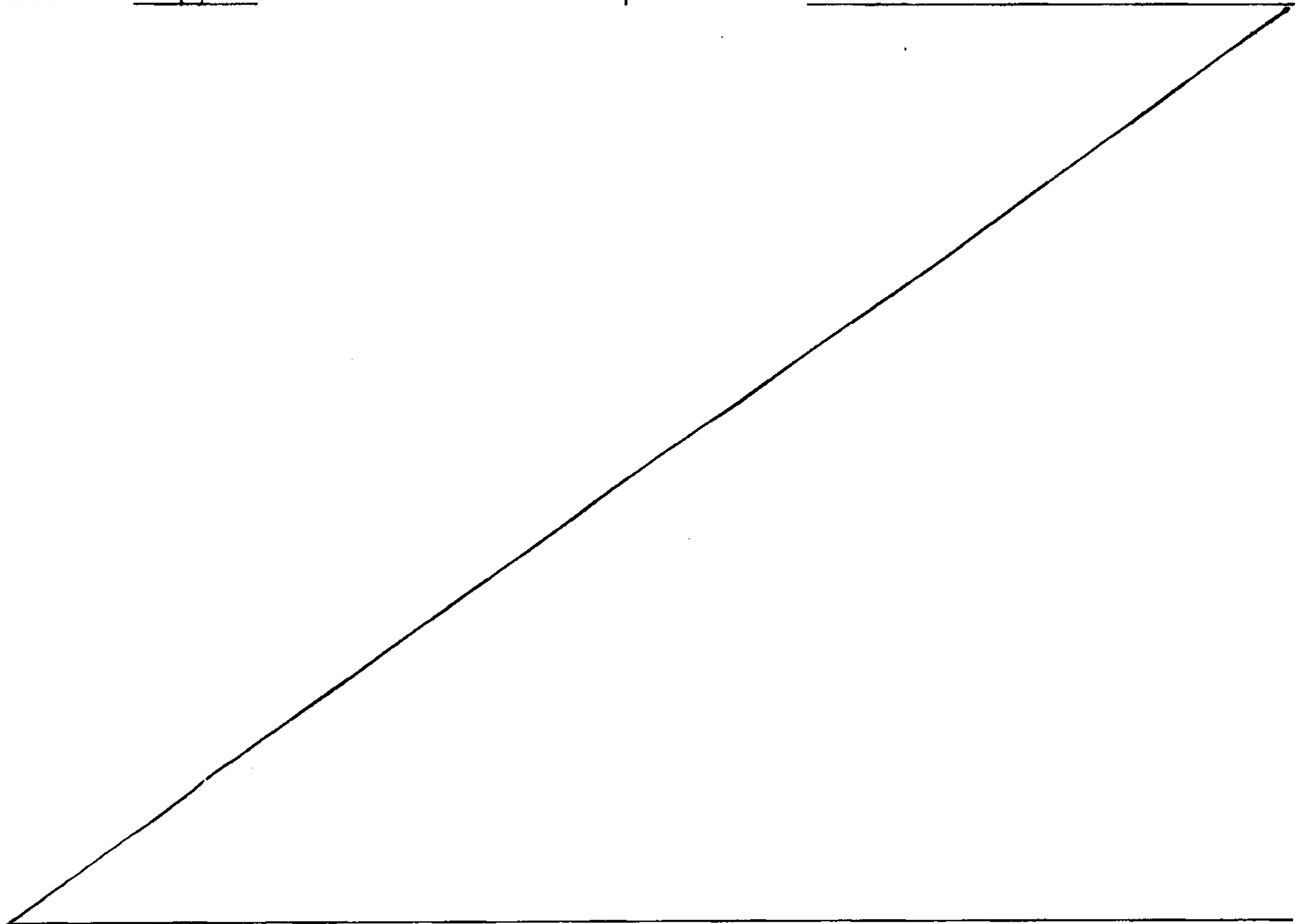
2c

flbA participant à la régulation de la biosynthèse des protéines des flagelles de H. pylori, ladite séquence nucléotidique du gène flbA hybridant de façon spécifique avec une sonde correspondant à un fragment de nucléotides de H. pylori amplifié à l'aide des deux oligonucléotides dégénérés répondant aux séquences suivantes:

OLFlba-1: ATGCCTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG et OLFlba-2: GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC, ou s'hybridant de façon spécifique avec ces oligonucléotides lorsque l'hybridation est réalisée à 42°C en présence de 50% Formamide dans un tampon 2XSSC contenant 0,1% SDS et les lavages réalisés avec 2XSSC plus 0,1% SDS à 68°C, et ladite mutation étant telle que, soit le gène flbA n'est plus exprimé dans ladite souche bactérienne recombinante, soit le gène flbA ne permet pas la synthèse des flagelles de H. pylori.

Une telle séquence peut être obtenue par les étapes de:

- criblage d'une banque génomique contenant l'ADN chromosomique d'une souche H. pylori avec une sonde correspondant à _____



un fragment de nucléotides de H. pylori amplifié à l'aide de deux oligonucléotides répondant aux séquences suivantes :

OLFibA-1 : ATGCCTCGAGGTGCGAAAAGCAAGATG

OLFibA-2 : GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC, ou capable d'hybrider dans des conditions de forte stringence avec ces oligonucléotides.

- récupération des séquences d'ADN hybridant avec ladite sonde,
- sous-clonage des séquences d'ADN obtenues dans un vecteur approprié de type plasmide et sélection de ceux des vecteurs modifiés hybridant dans des conditions de forte stringence avec la sonde correspondant au fragment d'ADN de H. pylori amplifié à l'aide des oligonucléotides OLFibA-1 et OLFibA-2,

- séquençage des fragments d'ADN contenus dans les vecteurs plasmidiques hybridant avec la susdite sonde et détermination de la phase ouverte de lecture contenue dans ces fragments.

Avantageusement, on utilisera ces fragments d'ADN pour reconstituer la séquence codante du gène *flbA* correspondant à une phase ouverte de lecture comportant environ 2196 nucléotides.

La banque génomique contenant l'ADN chromosomique de H. pylori peut être obtenue à partir de toute souche de H. pylori. On peut aussi préparer une banque cosmidique à partir de l'ADN chromosomique de H. pylori.

Une souche utilisable pour la réalisation de cette banque est par exemple la souche N6 déposée à la NCIMB le 26 Juin 1992, sous le n° NCIMB40512.

Les deux oligonucléotides amorces utilisés pour préparer la sonde destinée à l'hybridation de l'ADN recherché présent dans la banque d'ADN de H. pylori sont choisis parmi les régions conservées des différentes protéines de la famille LcrD/FibF.

Les deux oligonucléotides amorces OLFibA-1 et OLFibA-2 ont permis d'amplifier un fragment, utilisable comme sonde, de 130 paires de bases répondant à la séquence suivante :

ATG CCA GGA AAG CAA ATG GCG ATT GAT GCG GAT TTA AAT TCA
GGG CTT ATT GAT GAT AAG GAA GCT AAA AAA CGG CGC GCC GCT
CTA AGC CAA GAA GCG GAT TTT TAT GGT GCG ATG GAT GGC GCG
TCT AAA TTT

Les conditions de forte stringence dont il est question ci-dessus sont les suivantes : l'hybridation est réalisée à 42°C en présence de 50% Formamide dans un tampon 2XSSC contenant 0,1% SDS (1XSSC correspond à 0,15 M NaCl plus 15 mM de citrate de sodium - pH 7,0). Les lavages sont réalisés avec 2XSSC plus 0,1% SDS à 68°C par exemple deux fois pendant une heure.

Une séquence nucléotidique particulièrement intéressante selon l'invention est la séquence du gène flbA correspondant à l'enchaînement de nucléotides représenté à la figure 2, ou à un enchaînement nucléotidique hybridant dans des conditions de forte stringence avec le susdit enchaînement.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la séquence nucléotidique, objet de la présente demande, est caractérisée en ce qu'elle code pour une protéine répondant à la séquence d'acides aminés représentée à la figure 2 ou pour une séquence d'acides aminés ayant les mêmes propriétés régulatrices vis à vis de la biosynthèse des protéines des flagelles de H. pylori, que la susdite séquence.

L'invention a également pour objet une séquence nucléotidique répondant aux définitions précédentes, modifiée par délétion, substitution ou insertion de bases ou d'un fragment d'une séquence de nucléotides, de façon telle que :

- soit le gène flbA n'est plus exprimé dans un hôte cellulaire,

- soit l'expression du gène flbA dans un hôte cellulaire ne permet pas la biosynthèse des flagellines A et B ni de la gaine les contenant et le cas échéant ne permet pas la synthèse de la protéine d'ancrage de H. pylori ou le crochet.

La modification subie par la séquence nucléotidique de l'invention doit être telle qu'elle est irréversible et notamment qu'elle reste irréversible, lors de la recombinaison de cette séquence avec le gène flbA présent dans une bactérie que l'on transformerait avec une séquence nucléotidique ainsi modifiée. Cette recombinaison est par exemple de type
10 « double crossing over ». De préférence, la modification de la séquence nucléotidique ne doit pas entraîner de modification substantielle - après remplacement par cette séquence modifiée du fragment correspondant du gène flbA normal dans une souche déterminée de H. pylori - des fonctions des gènes voisins.

Entrent également dans le cadre de l'invention, des séquences nucléotidiques constituant un fragment du gène flbA répondant aux critères précédents. A titre d'exemples, des fragments objet de l'invention, comportent au moins 6 nucléotides, de préférence au moins 50, voire au moins 100 nucléotides.

20 De tels fragments sont par exemple choisis soit pour leur caractère spécifique du gène flbA, soit pour leur appartenance à des régions conservées de plusieurs gènes codant pour des protéines de la famille LcrD/FlbF.

Selon un autre mode de réalisation, l'invention vise également les fragments du gène flbA limités par les sites de restriction présents sur le gène. Certains de ces sites sont définis à titre d'exemple à la figure 1B.

Un autre fragment selon l'invention est un fragment d'au moins 1000 pb issu d'une quelconque région du gène flbA et comprenant de préférence un site de restriction ou susceptible d'accueillir un site de
30 restriction.

D'autres séquences nucléotidiques de l'invention sont par exemple des acides nucléiques recombinants comprenant une séquence nucléotidique telle que celles qui ont été décrites ci-dessus, elle-même modifiée par insertion d'une cassette contenant un marqueur, par exemple un gène de résistance à un antibiotique ou un gène de résistance à un métal lourd tel que décrit dans la demande FR 9406202 déposée le 20/05/94.

10 Une insertion peut ainsi être effectuée avec une cassette de résistance à la kanamycine. A cet égard, différentes techniques peuvent être mises en oeuvre et on se référera notamment à la publication de Labigne A. et al (J. of Bacteriology, vol. 170, 1988, p. 1704-1708) et à la publication de Labigne A. et al (Res. Microbiol 1992, 143, 15-26).

L'invention a également pour objet des oligonucléotides spécifiques d'une séquence nucléotidique déterminée précédemment et caractérisés en ce qu'ils répondent à l'une des séquences suivantes :

OLFibA-1 : ATGCCTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG

OLFibA-2 : GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC

OLFibA-7 : CGGGATCCGTGGTTACTAATGGTTCTAC

OLFibA-8 : CGGGATCCTCATGGCCTCTTCAGAGACC

20 Selon une autre variante de réalisation, l'invention concerne une séquence d'acides aminés de la protéine FlbA de H. pylori caractérisée en ce qu'elle est codée par une séquence nucléotidique telle que déterminée précédemment.

Une séquence d'acides aminés particulière de la protéine FlbA de H. pylori est présentée à la figure 2.

Ainsi, dans le cadre de l'invention, le gène flbA et la protéine exprimée par ce gène peuvent présenter un intérêt, en particulier pour l'utilisation dans des compositions immunogènes ou vaccinales.

30 L'invention vise également des souches bactériennes d'Helicobacter pylori ayant un phénotype aflagellé résultant de la mutation par

substitution, addition et/ou de la délétion de bases ou d'un fragment nucléotidique de la séquence nucléotidique définie ci-dessus du gène flbA participant à la régulation de la biosynthèse des protéines des flagelles de H. pylori.

5 Cette modification du gène flbA permet l'obtention d'une souche de type aflagellé c'est à dire n'exprimant plus les protéines FlaA et FlaB et de préférence n'exprimant plus les protéines de la gaine.

Selon une variante de réalisation de cette souche bactérienne, la souche obtenue sera en outre dépourvue de la protéine du crochet de H.
10 pylori.

De façon préférée, une souche bactérienne répondant aux critères précédents est caractérisée en ce qu'elle est obtenue à partir de la souche N6 déposée à la NCIMB le 26 Juin 1992 sous le numéro NCIMB 40512.

A titre d'exemple, l'invention a pour objet une souche aflagellée recombinante de H. pylori, désignée par N6flbA- et déposée à la NCIMB le 30 Juin 1995 sous le n° NCIMB 40747.

De telles souches aflagellées de H. pylori sont particulièrement intéressantes pour des utilisations en sérologie et par conséquent pour la détection in vitro d'une infection par H. pylori. Avantageusement, ces
20 souches sont de type recombinantes.

Ces souches présentent notamment l'avantage de permettre une détection in vitro spécifique et sensible de l'infection par H. pylori. En d'autres termes, l'invention permet avantageusement de détecter spécifiquement une infection par H. pylori en évitant en particulier les résultats « faux positifs » par exemple avec des souches de bactéries telles que Salmonella ou Campylobacter.

Etant donné que les souches de H. pylori de type aflagellé ainsi définies peuvent avoir également d'autres applications, et par exemple être mises en oeuvre dans le cadre de la préparation de compositions de
30 vaccins, on pourra avoir intérêt à préparer des souches bactériennes

recombinantes aflagellées ayant une seconde modification ou mutation et par exemple on pourra avoir recours à une souche bactérienne aflagellée caractérisée en ce qu'elle est en outre mutée de façon à produire une uréase atténuée, voire à ne plus produire d'uréase, la mutation consistant par exemple en une mutation de la séquence nucléotidique d'un ou plusieurs gènes choisis parmi les gènes ureA, ureB, ureC, ureD, ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI. Les gènes de structure de l'uréase désignés par ureA, ureB, ureC et ureD de l'uréase ont été décrits dans la publication (Labigne et al (1991) J. Bacteriol. 173: 1920-1931). Les autres gènes ont
10 été décrits dans la demande de brevet EP 0610322.

Les souches bactériennes de l'invention peuvent être utilisées telles quelles ou sous la forme d'extrait et en particulier l'invention a pour objet un extrait bactérien total de souche obtenu à partir des souches précédemment décrites.

Un tel extrait bactérien peut être préparé par extraction au N-OctylGlucoside. En ce cas, la technique de préparation utilisée est celle décrite par LELWALA-GURUGE J. (Scand. J. Infect. Dis. 1992, 24: 457-465).

Un autre extrait bactérien peut être obtenu par extraction au PBS ou
20 la glycine selon les techniques respectivement décrites par BAZILLOU M. et al (Clin. Diagn. Lab. Immuno., 1994, 1: 310-317) et AGUIRRE P.M. (Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1992, 11: 634-639).

Dans le cadre de ces applications, l'invention concerne une composition pour la détection in vitro d'une infection par H. pylori dans un échantillon de fluide biologique chez un patient, notamment dans un échantillon de sérum, comprenant à titre de principe actif, une souche bactérienne de l'invention ou un extrait bactérien selon la description donnée ci-dessus.

Les échantillons biologiques utilisés peuvent être de tous types et en particulier, il peut s'agir de tous fluides biologiques comme par exemple le sérum, la salive ou l'urine.

De même, les techniques mises en oeuvre pour la détection sont toutes les techniques faisant intervenir des réactions de type immunologique et en particulier de type antigène-anticorps. On utilise par exemple les techniques de type Western Blot, ELISA...

10 L'invention concerne donc également un procédé de détection in vitro d'une infection par H. pylori dans un échantillon de fluide biologique chez un patient, notamment dans un échantillon de sérum, comprenant les étapes de :

- mise en contact de l'échantillon testé avec une souche bactérienne selon l'invention ou un extrait bactérien défini plus haut,
- détection d'une réaction immunologique entre ladite souche bactérienne et des anticorps dirigés contre H. pylori, présents dans l'échantillon testé.

A titre d'exemple, une détection in vitro sur un échantillon biologique pour rechercher une infection par H. pylori peut être réalisée en mettant en oeuvre les étapes suivantes :

20 - des plaques sont recouvertes de l'antigène utilisé pour la détection, qu'il s'agisse d'une protéine pure ou recombinante ou encore d'une souche aflagellée ou d'un extrait bactérien en particulier d'extrait NOG (N-Octyl Glucoside) de la souche N6flbA- (à titre d'exemple, la quantité d'extrait pourrait être de 3 µg/ml ou la quantité d'antigène pourrait être de 2 µg/ml),

- une gamme de témoins négatifs et positifs (le témoin positif étant mis en oeuvre avec des dilutions différentes) est utilisée et en parallèle, on teste des sérums de patients dilués au 1/100ème (volume déposé 100 µl),

30 - une étape d'incubation est ensuite réalisée par exemple pendant une heure à 37°C, étape suivie de plusieurs lavages successifs et d'une

incubation ultérieure, par exemple pendant 1 heure à 37°C, avec un conjugué monoclonal (de type IgG humaine marquée à la peroxydase) utilisé à différentes dilutions (par exemple à une dilution de 1/32000 pour un antigène et à une dilution de 1/64000 pour un extrait bactérien), le volume déposé est de 100 µl,

- après l'incubation avec le conjugué monoclonal, différents lavages sont pratiqués (par exemple 4) et la révélation de la réaction enzymatique par « OPD + substrat » est faite pendant 30 minutes à l'obscurité. La réaction enzymatique est ensuite arrêtée par addition de H₂SO₄ puis
10 lecture des densités optiques D₀ à 492 nm/620 nm.

L'invention vise par ailleurs une composition immunogène pour l'obtention d'anticorps contre H. pylori, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, une souche bactérienne selon l'invention ou un extrait de cette souche bactérienne.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, une composition immunogène pour l'obtention d'anticorps contre H. pylori est caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence d'acides aminés de la protéine FlbA.

Entre également dans le cadre de la présente invention, une
20 composition vaccinnante pour l'obtention d'anticorps protecteurs contre une infection par H. pylori, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, une souche bactérienne selon l'invention ou un extrait bactérien selon les définitions précédentes.

Une autre composition vaccinnante pour l'obtention d'anticorps contre une infection par H. pylori, est caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, des antigènes de type uréase, en particulier des antigènes codés par les gènes ureA, ureB, ureC ou ureD et une protéine répondant à une séquence d'acides aminés définie plus haut.

L'invention vise aussi des anticorps monoclonaux ou des sérums
30 polyclonaux dirigés contre une séquence d'acides aminés précédemment

décrite. Ces anticorps sont obtenus par des techniques connues en soi et en particulier par immunisation d'un animal avec l'antigène choisi, suivie soit de la production et de la récupération des anticorps produits et de la sélection de ceux d'entre eux qui reconnaissent spécifiquement H. pylori, soit de la préparation d'hybridomes par fusion de cellules spléniques de l'animal préalablement immunisé avec des cellules de myelome, ces hybridomes étant ensuite mis en culture pour obtenir des anticorps monoclonaux sélectionnés pour leur spécificité de reconnaissance par rapport à l'antigène choisi de H. pylori.

10 D'autres anticorps monoclonaux ou sérums polyclonaux selon l'invention sont dirigés contre une souche de H. pylori aflagellée telle que décrite dans les pages précédentes.

L'invention concerne en outre une composition pour la détection in vitro d'une infection par H. pylori dans un échantillon biologique, comprenant à titre de principe actif des anticorps monoclonaux ou un sérum polyclonal obtenus contre une souche de H. pylori de phénotype aflagellé selon l'invention.

20 L'invention concerne également à titre de principe actif d'un médicament, les séquences nucléotidiques codant pour les séquences d'acides aminés selon l'invention capables d'induire une réponse immunogène chez un animal ou chez un patient. Une technique pour l'utilisation de séquences nucléotidiques comme médicaments a été décrite par DONNELLY et al 1995, Nature Medic. 1(6), p. 583-587.

figure 1

1A : Carte de restriction du plasmide pLL570 et du mini transposon Tn3 contenant la cassette du gène de résistance à la kanamycine.

1B : Cartes de restriction linéaires des plasmides recombinants pSUS39 et pSUS207. Les chiffres indiqués correspondent à la taille des fragments de restriction exprimée en paires de bases. H : HindIII ; Bg : BglII. La
30 présence d'un astérisque indique que le site de restriction a été modifié au

cours du clonage et qu'il n'est plus reconnu par l'enzyme de restriction correspondant.

figure 2 : Séquence nucléotidique du gène flbA de H. pylori et séquence en acides aminés déduite, donnée en code à une lettre.

figure 3 : Alignement multiple de la protéine FlbA de H. pylori avec cinq autres membres de la famille LcrD/FlbF. CjFlbA : Campylobacter jejuni FlbA ; CcFlbF : Caulobacter crescentus FlbF ; YpLcrD : Yersinia pestis LcrD ; StInvA : Salmonella typhimurium InvA ; SfMxiA : Shigella flexneri MxiA. Les astérisques indiquent la position d'acides aminés conservés dans tous les homologues de la famille LcrD/FlbF ; les points indiquent la position d'acides aminés conservés dans au moins 5 des 6 protéines homologues ; les séquences en acides aminés conservés utilisées pour la synthèse des oligonucléotides dégénérés (OLFlbA-1 et OLFlbA-2) sont soulignées. On remarquera en particulier le degré de conservation du domaine N-terminal de ces protéines homologues qui contraste avec le degré de variabilité du domaine hydrophile de la région C-terminale.

figure 4 : Représentation schématique de l'arbre phylogénique de six protéines appartenant à la famille LcrD/FlbF. Les protéines impliquées dans la régulation de l'expression de la mobilité, FlbA de H. pylori (HpFlbA), et de Campylobacter jejuni (Cj FlbA), et FlbF de Caulobacter crescentus (Cc FlbF) forment une branche distincte de celle des protéines impliquées dans la sécrétion de protéines de virulence (InvA, MxiA et LcrD de Salmonella, Shigella et Yersinia, respectivement). Les nombres indiqués représentent la distance évolutionnaire relative.

figure 5 : Représentation schématique de la stratégie suivie pour construire les mutants isogéniques de H. pylori souche N6, mutants dans lesquels le gène codant pour la protéine FlbA a été inactivé par insertion d'un gène codant pour la résistance à la kanamycine.

figure 6 : Analyse par immunobuvardage (Western blot) des protéines d'un mutant N6-flbA à l'aide de l'antisérum AK179 (3) dirigé spécifiquement

contre les flagelles purifiés de *H. pylori* : 1 : mutant N6-flbA ; 2 : double mutant *flaA/flaB* ; 3 : mutant *flaB* (8) ; 4 : mutant *flaA* (8) ; 5 : souche sauvage N6.

figures 7 à 11 : Résultats comparatifs de la sérologie réalisée sur *H. pylori*.

figures 12 et 13 : Extractions à partir de la souche aflagellée N6flbA- : les extractions ont été réalisées avec de la glycine, du PBS, ou du NOG.

Figure 12 : Les courbes ont été réalisées à partir des données suivantes :

STD#	CONC	NET ABS	CALC	DIFF	COEFFS:
		750.0	CONC		P2=2.0324 P1=2.2753 PO=-0
1	0.0000	0.0020	-0.008	0.0080	
2	0.1660	0.0760	0.1721	-0.006	
3	0.3300	0.1400	0.3459	-0.016	
4	0.6650	0.2390	0.6474	0.0176	
5	1.3300	0.4280	1.3336	-0.004	

MOYENNE: -1.0356E-07

S.D.: 0.0130

Figure 13 : Dosages protéiques en minométhode (BIOD RAD)

Glycine : dilution au 1/2 ; glucoside : dilution au 1/10 ; surnageant 1 : dilution au 1/4 ; surnageant 2 : non dilué.

Les courbes ont été réalisées à partir des données suivantes :

STD#	CONC	NET ABS	CALC	DIFF	COEFFS:
		750.0	CONC		P2=144.63 P1=314.31 PO=2.4815
1	0.0000	-0.003	1.5398	-1.540	
2	25.000	0.0600	21.861	3.1392	
3	50.000	0.1470	51.810	-1.810	
4	100.00	0.2750	99.855	0.1454	
5	200.00	0.5090	199.94	0.0636	

EXEMPLES

I Identification du gène flbA et préparation de souches aflagellées

Parmi les protéines connues pour jouer un rôle dans la régulation de l'expression de la mobilité chez les bactéries, les protéines appartenant à la famille LcrD/FlbF récemment identifiée, et qui inclut la protéine LcrD des bactéries du genre *Yersinia* (6), la protéine InvA de *Salmonella* (2), MxiA de *Shigella* (1), FlbF de *Caulobacter crescentus* (7) et FlbA de *Campylobacter jejuni* (4) sont des protéines intéressantes. Les protéines LcrD, InvA et MxiA sont impliquées dans la régulation et/ou la sécrétion de protéines associées à la virulence des bactéries qui les expriment, alors

que les protéines FlbF de Caulobacter crescentus et FlbA de Campylobacter jejuni sont impliquées dans la régulation de la biosynthèse des flagelles et donc de la mobilité. Les homologues connus à ce jour de la famille LcrD/FlbF ont des domaines très conservés surtout dans la partie N-terminale de ces protéines, et deux de ces régions conservées (MPGKQM, acides aminés 151 à 156 de la protéine LcrD de Yersinia) et MDGAMKF (acides aminés 189 à 195 de LcrD) ont ainsi pu être utilisées pour la définition de deux oligonucléotides dégénérés (OLFlbA-1 et OLFlbA-2, tableau 1) qui ont été synthétisés et ont servi d'amorces 10 nucléotidiques dans des expériences d'amplification génique réalisées à partir de l'ADN chromosomique d'Helicobacter pylori. Un fragment de 130 paires de base (pb) a ainsi pu être amplifié et la détermination de sa séquence nucléotidique a montré que ce fragment codait pour un segment d'une protéine très homologue aux protéines de la famille LcrD/FlbF. Ce fragment amplifié a alors été marqué radioactivement et utilisé comme sonde pour cribler une banque cosmidique de H. pylori.

Ce fragment correspond à la séquence comprise entre les nucléotides 575 et 707 de la séquence représentée à la figure 2.

Un des cosmides de la banque génomique a été identifié comme 20 codant pour l'homologue LcrD/FlbF de H. pylori, et a ensuite été soumis à une digestion partielle par Sau3A de façon à réaliser une mini banque (200 sous-clones) du cosmide dans le vecteur pILL570 contenant des fragments insérés ayant une taille comprise entre 2 et 5 (kilobases). Le vecteur pILL570 a été décrit dans la publication de Labigne A. et al (Institut Pasteur/Elsevier Paris 1992. Res. Microbiol. 1992, 143, 15-26). Sa carte de restriction est donnée à la figure 1A. Ces 200 clones ont alors été hybridés à la sonde de 130 pb et les clones hébergeant les plasmides pSUS39 et PSUS207 ont donné une hybridation positive. La carte de 30 restriction linéaire de ces deux plasmides recombinants est représentée dans la figure 1B et montre que les deux inserts de ces clones ont des

séquences chevauchantes. La détermination de la séquence nucléotidique de ces deux inserts a révélé qu'aucun des deux ne contenait le gène flbA dans son intégralité. Le gène flbA de H. pylori ainsi désigné du fait de son homologie avec le gène flbA de Campylobacter jejuni correspond à une phase ouverte de lecture de 2196 nucléotides et code pour une protéine de masse moléculaire calculée de 80,1 kilodaltons. La séquence nucléotidique de flbA et la séquence en acide aminés de FlbA sont données dans la figure 2. Il n'a pas été détecté en amont et en aval de la phase ouverte de lecture de séquences de consensus caractéristique de
10 séquences promoteurs ou terminateurs.

La protéine FlbA présente des similitudes avec les protéines FlbA de Campylobacter jejuni et FlbF de Caulobacter crescentus, toutes deux impliquées dans la mobilité (51,7 % et 40,4 % d'identité, respectivement) alors que ces pourcentages sont moins élevés avec les membres de la famille protéique LcrD/FlbF qui ne sont pas impliqués dans la mobilité : 32,8 % d'identité avec LcrD de Yersinia, 30,5 % avec MxiA de Shigella et 29,3 % avec InvA de Salmonella. Un alignement multiple de la séquence en acides aminés de ces protéines avec celle de FlbA de H. pylori est donné dans la figure 3. Les régions les plus conservées des homologues
20 de la famille LcrD/FlbF se trouvent dans la partie N-terminale des protéines.

L'évolution phylogénétique des protéines impliquées dans la mobilité (FlbA et FlbF) et celle des protéines impliquées dans la régulation de l'expression et/ou la sécrétion de protéines associées à la virulence est représentée schématiquement par un arbre phylogénique (figure 4). Deux branches distinctes sont visibles ; FlbA de H. pylori appartenant sans ambiguïté à la branche correspondant aux protéines de régulation impliquées dans la biosynthèse des flagelles.

Construction et caractérisation de mutants isogéniques de H. pylori
30 déficients dans la synthèse de la protéine FlbA.

Un fragment de 1600 paires de bases a été amplifié à partir du plasmide pSUS39 à l'aide des oligonucléotides OLFibA-7 et OLFibA-8 (Tableau 1), contenant chacun à leur extrémité 5' des sites de restriction BamHI. Ce fragment amplifié contient dans sa région centrale un site unique de restriction par l'endonucléase HindIII et a été cloné dans le vecteur pSUS33, un dérivé du plasmide pUC19 dans lequel le site situé dans le site de polyclonage HindIII a été délété. Pour obtenir pSUS33, le plasmide pUC19 a été restreint par HindIII ; les extrémités collantes résultant de cette restriction ont été traitées avec l'enzyme de Klenow et l'ADN T4 polymérase de façon à produire des extrémités franches ; le fragment résultant a été religaturé avec l'ADN T4 ligase et introduit dans E. coli DH5x pour produire pSUS33. Le plasmide recombinant résultant de l'intégration du fragment de 1600 paires de base dans pSUS33 a été désigné pSUS42 ; il a été linéarisé par HindIII, ses extrémités ont été transformées en extrémité à bouts francs et la cassette smal - kanamycine provenant du plasmide pILL600 (Labigne A. et al, 1988, J. Bact., 170, 1704-1708) a été clonée dans ce site unique donnant naissance au plasmide pSUS42. Le plasmide pSUS42 a ensuite été introduit par électroporation dans la souche "N6" de H. pylori. L'électroporation a été réalisée en suivant la technique décrite par Ferrero R.L. et al (Journal of Bacteriology, July 1992, p. 4212-4217, vol. 174, n° 13). Les transformants obtenus après sélection sur un milieu sélectif contenant de la kanamycine (25 µg/ml) ont ensuite été caractérisés génotypiquement et phénotypiquement. La figure 5 montre un schéma de la procédure suivie pour réaliser la construction de mutants. La caractérisation génotypique de ces mutants par amplification génique et hybridation de type Southern a montré que le génome des transformants résistants à la kanamycine contenait le gène de résistance inséré au milieu du gène flbA, et donc qu'il y avait eu remplacement allélique par double crossing-over de la copie sauvage du gène flbA par la copie inactivée flbA-Km avec perte des

séquences nucléotidiques du vecteur pSUS33. La caractérisation phénotypique des mutants *flbA* de *H. pylori* a montré qu'ils étaient non mobiles ; par ailleurs, leur analyse par microscopie électronique révélait qu'il y avait absence totale des éléments du flagelle, et absence de la gaine du flagelle. Les expériences d'immunobuvardages (Western blots) réalisées avec des anticorps dirigés contre les protéines des flagelles totales de *H. pylori* (Figure 6) montraient l'absence des deux bandes peptidiques correspondant aux sous-unités flagellaires FlaA et FlaB, ainsi qu'une bande correspondant à un polypeptide d'une masse apparente de 90 kilodaltons, protéine récemment identifiée comme la protéine du crochet (ou protéine d'ancrage) du flagelle par O'Toole et collaborateurs (5).

L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine FlbA de *H. pylori* est essentielle pour la biosynthèse de toutes les structures flagellaires, et que l'activation du gène codant pour cette protéine, résulte en l'arrêt complet de la synthèse de toute structure entrant dans la constitution du flagelle et non pas dans l'interruption de l'exportation des constituants de ces structures.

Tableau 1 : Oligonucléotides utilisés dans cette étude

20	Oligo-nucléotides	Position	Brin	Séquence nucléotidique
	OLFibA-1	AS 151-156(LcrD)	+	ATGCCTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG
	OLFibA-2	AS 189-195 (LcrD)	-	GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC
	OLFibA-7	515-534	+	CGGGATCCGTGGTTACTAATGGTTCTAC
	OLFibA-8	2092-2111	-	CGGGATCCTCATGGCCTCTTCAGAGACC

II Sérologie *H. pylori*

- modèles étudiés

1) HspAmaIE protéine recombinante de 47,5 kD (HspA=13 kD)

Sur la population dite population 1 de sérums documentés, une sensibilité de 41% et une spécificité de 96% avaient été obtenues.

- 2) N6flbA- souche aflagellée d'Helicobacter pylori
 3 extractions ont été réalisées : -N-Octyl Glucoside
 -PBS
 -Glycine
- L'extraction au N-Octyl Glucoside (NOG) semble pour l'instant la meilleure.
- 3) -N6 souche sauvage correspondante
 Une extraction au N-Octyl Glucoside a été réalisée.

10 Une deuxième population de sérums a été mise en oeuvre (population II). Il s'agit d'une centaine de sérums bien documentés du point de vue clinique, endoscopique, histologique, bactériologique et anatomopathologique. C'est grâce à cette population II que les performances des différents modèles étudiés ont été appréciées. Cinq populations différentes ont été testées.

- 5 populations de sérums testées :

- 300 sérums tout venant (FNTS)
- 18 sérums positifs par la sérologie WHITTAKER (CBMS)
- 92 sérums bien documentés dits sérums de la population II
- 20 - 87 sérums documentés du point de vue bactériologique et anatomopathologique dits sérums de la population I.
- 23 sérums pouvant présenter des réactions croisées :
 - 10 sérums anti-Legionella positifs
 - 10 sérums anti-Chlamydia positifs
 - 3 sérums anti-Campylobacter positifs

En parallèle, deux kits concurrents ont été testés, qui d'après les études bibliographiques sont performants.

- 2 kits commerciaux testés :
 - Cobas Core® (ROCHE)
 - 30 - Pylori Stat® (WHITTAKER)

- Résultats

Les sérums tout venant (FNTS) (Figures 8 à 11, tableau 2)

- 300 sérums ont été passés dans les modèles suivants :

- Hsp A malE

5 - N6 flbA-

- N6

10 Les études épidémiologiques donnent des séroprévalences, en France, entre 20 et 25%. La répartition de 300 sérums de donneurs de sang a été étudiée et on a calculé la prévalence de positivité pour différentes valeurs seuil, afin de valider la valeur seuil préalablement définie sur la sérothèque du CBMS (sérologie WHITTAKER).

Cette étude permet de comparer les différents tests avec une même séroprévalence.

15 - Les 43 premiers sérums ont également été passés dans les modèles suivants :

- Cobas Core® (ROCHE)

- Pylori Stat® (WHITTAKER)

-sérologie dite JLF (test ELISA, basé sur un extrait aqueux de plusieurs souches bactériennes)

20 Les résultats sont exprimés en unité arbitraire, et pour différentes valeurs seuil, un résultat positif est noté 1, un résultat négatif est noté 0.

En comparant ces 43 sérums vis à vis des différents tests, on peut constater que :

25 - la souche aflagellée N6flbA- et le test Cobas Core® (Roche) ont des séroprévalences comparables de l'ordre de 20%.

- HspA a une séroprévalence très faible (7%) ce qui laisse supposer un manque de sensibilité, compte tenu des résultats ultérieurs.

- la sérologie JLF paraît très spécifique puisque la séroprévalence n'est que de 14%, en tenant compte des résultats ultérieurs.

- le test Pylori Stat® (Whittaker) donne une séroprévalence élevée (29%) qui montrerait un manque de spécificité, ou une valeur seuil trop basse

Tableau 2A

[illegible]

Tableau 2B comparaison de 43 sérums FNTS vis à vis de :

N°	HspA	150	C50+H	C30+H	C.Core	P.Stat	0.35	N6fiba-						séroJLF	0.30	N6	
								PBS	100	80	60	NOG	100	80	80	NOG	100
22	1	0	0	0	1	0.43	1	13	0	0	0	40	0	0	0	21	0
23	0	0	0	1	25	0.49	1	265	1	1	1	296	1	1	1	>928	1
24	9	0	1	1	125	0.65	1	3390	1	1	1	3100	1	1	1	>928	1
25	0	0	0	0	0	0.20	0	34	0	0	0	20	0	0	0	51	0
26	0	0	0	0	2	0.29	0	97	0	1	1	60	0	0	0	105	1
27	0	0	1	1	10	0.33	0	265	1	1	1	239	1	1	1	359	1
28	3	0	0	0	7	0.21	0	26	0	0	0	14	0	0	0	27	0
29	1	0	0	0	8	0.20	0	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	2	0.23	0	3	0	0	0	3	0	0	0	4	0
31	0	0	0	0	1	0.21	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	2	0.31	0	24	0	0	0	15	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	1	0.23	0	14	0	0	0	8	0	0	0	30	0
34	0	0	0	0	3	0.23	0	0	0	0	0	1	0	0	0	8	0
35	1293	1	1	1	170	0.84	1	463	1	1	1	3103	1	1	1	>928	1
36	0	0	0	0	4	0.36	1	42	0	0	0	32	0	0	0	68	0
37	0	0	0	0	5	0.22	0	110	1	1	1	109	1	1	1	227	1
38	13	0	0	0	4	0.47	1	77	0	0	1	68	0	0	0	108	1
39	1	0	0	0	4	0.34	0	23	0	0	0	13	0	0	0	34	0
40	0	0	0	0	2	0.19	0	5	0	0	0	6	0	0	0	4	0
41	0	0	0	0	0	0.24	0	46	0	0	0	23	0	0	0	68	0
42	0	0	0	0	170	0.59	1	3388	1	1	1	3104	1	1	1	>928	1
43	0	0	1	1	3	0.19	0	7	0	0	0	5	0	0	0	8	0
nb de +		1	6	7	8		12		8	9	12		9	9	10		
% de +		2%	14%	16%	19%		29%		19%	21%	28%		21%	21%	23%		26%

Les sérums positifs en sérologie WHITTAKER (CBMS) (tableau 3)

Trois sérums se sont révélés positifs uniquement avec le test Pylori Stat® (Whittaker). Ils n'ont été confirmés par aucun autre test.

On peut supposer qu'il s'agit là d'un manque de spécificité de ce test.

Si l'on prend comme référence le test Cobas Core® (Roche) qui est l'un des meilleurs actuellement sur le marché, nous pouvons comparer nos différents modèles par rapport à Cobas Core®.

- La souche aflagellée N6flbA- est parfaitement corrélée à Cobas Core®.
- Les 3 sérums négatifs Cobas Core® le sont également avec N6flbA-.
- Les 15 sérums positifs Cobas Core® le sont aussi avec N6flbA-.
- La souche sauvage N6 montre les mêmes performances que la souche aflagellée.
- HspA manque aussi de sensibilité car 9 sérums positifs Cobas Core® sont négatifs avec HspA.

Les 3 sérums négatifs Cobas Core® le sont aussi avec HspA.

Tableau 3

19 sérums du CBMS positifs par la sérologie WHITTAKER (Pylori Stat)

N°sérum	DO	HspA	150	C. Core	8	N6/IBA-					N6	
						PBS	80	NOG	60	GLY	NOG	100
1	1.8	0	0	33	1	130	1	289	1	494	830	1
2	2.41	607	1	>80	1	471	1	3257	1	6587	>928	1
3	2.9	675	1	30	1	472	1	3263	1	1183	>928	1
4	1.4	146	0	42	1	156	1	407	1	825	556	1
5	1	179	1	44	1	59	0	81	1	317	276	1
6	2.6	193	1	>80	1	472	1	3260	1	1054	>928	1
A	0.7	19	0	4	0	13	0	8	0	33	12	0
B	2.6	5	0	>80	1	471	1	3255	1	6600	>928	1
C	3.1	1352	1	>80	1	470	1	3246	1	6582	>928	1
D	1.3	3	0	18	1	121	1	506	1	448	>928	1
E	0.6	7	0	1	0	23	0	45	0	150	0	0
F	2.1	0	0	15	1	139	1	3258	1	260	>928	1
G	0.2	0	0	8	0	3	0	4	0	28	0	0
H	1.4	25	0	18	1	127	1	176	1	143	159	1
I	2.3	960	1	>80	1							
J	1.9	5	0	38	1	91	1	117	1	57	101	1
K	1.38	4	0	52	1	88	1	182	1	167	>928	1
L	2.98	855	1	>80	1	471	1	586	1	943	>928	1
M	2.86	0	0	51	1	471	1	3256	1	1200	>928	1

Les sérums de la population II

92 sérums ont été sélectionnés et se répartissent en 3 groupes :

- 34 : patients dyspeptiques
diagnostic d'ulcère (duodénal ou gastrique) à l'endoscopie et à l'histologie
présence d'Helicobacter pylori par culture et/ou anapath ; un test rapide à l'urée a également été réalisé.
Ce groupe sera noté Hp+/U+

- 10 - 27 : patients dyspeptiques
diagnostic différent d'ulcère (gastrite...) à l'endoscopie et à l'histologie
présence d'Helicobacter pylori par culture et/ou anapath ; un test rapide à l'urée a également été réalisé.
Ce groupe sera noté Hp+/U-
- 31 : patients dyspeptiques ou non
gastro-duodénum normal à l'endoscopie et à l'histologie
absence d'Helicobacter pylori par culture et anapath ; un test rapide à l'urée a également été réalisé.
20 Ce groupe sera noté Hp-

Pour chaque patient, les données cliniques, endoscopiques, histologiques, bactériologiques et anatomopathologiques sont indiquées.

Cette population bien documentée a permis de définir des critères de Sensibilité et de Spécificité.

- HpA : On note toujours un manque de sensibilité important comme constaté avec la population I.
La sensibilité est de 59% pour une spécificité de 100.
- N6flbA- : On vérifie une sensibilité de 100% pour l'extrait au N-Octyl Glucoside avec une spécificité de 90%.

- La performance est comparable au test Cobas Core de Roche (sensibilité de 98% pour une spécificité de 94%).
- N6 : La souche sauvage est tout à fait comparable à la souche aflagellée sur la population II.
- Aucun des 31 sérums négatifs n'est positif avec la souche sauvage ; aucune réaction croisée due au flagelle n'a été détectée sur cette population II.

Tableau 4 : Sérums de la population II
34 patients Hp+/U+

N°	Date	Age	Sexe	Clinique	Endos.	UD/UG	Histo-A	Glemlsa	Cult	HP	HspA	VS=150	Variant	PBS	VS=80	NOG	VS=60	N6	VS=100	C.COR	VS=8	P.STAT	VS=0.19/0.27	JLF	VS=0.30
9	19/07/91	33	1	dyspepsie	UD	1	G210	0	1	0	1	0	168	1	305	1	1	>928	1	30	1	0.288	1	0.91	1
11	12/03/92	32	1	dyspepsie	UD	1	G313	1	1	1	1	51	>484	1	1000	1	1	>928	1	55	1	0.359	1	1.03	1
13	19/05/92	26	1	dyspepsie	UG	1	G311	1	0	0	1	1530	>464	1	1452	1	1	>928	1	>160	1	0.377	1	0.67	1
15	23/07/93	27	1	dyspepsie	UD	1	G222	1	1	1	1	42	137	1	229	1	1	406	1	40	1	0.223	1	0.26	0
16	10/12/91	37	1	dyspepsie	UD	1	G410	1	0	0	1	2135	>464	1	870	1	1	>928	1	80	1	0.399	1	1.14	1
17	18/05/94	40	1	perforation	UD	1	G230	1	0	1	1	14	>464	1	676	1	1	>928	1	62	1	0.302	1	1.12	1
18	16/12/92	22	1	dyspepsie	UD	1	G222	1	0	1	1	16	>464	1	1124	1	1	>928	1	>160	1	0.373	1	0.74	1
26	07/09/94	39	1	dyspepsie	UD	1	G220	1	1	1	1	11	82	1	84	1	1	403	1	10	1	0.209	1	0.74	1
27	05/02/92	47	0	dyspepsie	UD	1	G212	1	1	1	1	12	58	1	104	1	1	398	1	16	1	0.245	1	0.23	0
28	27/04/94	42	1	RCO-A UG	GDN	1	G320	1	1	1	1	7970	>464	1	2344	1	1	>928	1	>160	1	0.477	1	1.73	1
29	24/06/94	57	1	dysphagie-A'J	GDN-B	1	G222	0	1	0	1	805	>464	1	2360	1	1	>928	1	>160	1	0.463	1	1.51	1
33	04/11/91	60	1	dyspepsie	UD	1	G231	1	1	1	1	663	>464	1	2720	1	1	>928	1	>160	1	0.505	1	0.97	1
38	03/09/90	46	1	dyspepsie	UD	1	G331F	1	0	0	1	4680	>464	1	2676	1	1	>928	1	>160	1	0.419	1	1.34	1
39	02/03/94	79	1	dyspepsie AEG	UG	1	G212	1	1	1	1	422	240	1	436	1	1	>928	1	14	1	0.253	1	0.86	1
43	13/01/94	67	0	dyspepsie AEG	UD	1	G111	1	0	1	1	106	76	0	75	1	1	379	1	14	1	0.204	1	0.52	1
44	01/07/94	60	0	dyspepsie	UD	1	G321	1	1	1	1	9	>464	1	2876	1	1	>928	1	>160	1	0.485	1	1.89	1

Tableau 4 (suite): Sérum de la population II
34 patients Hp+/U+

N°	Date	Age	Sexe	Clinique	Endos.	UD/UG	Histo-A	Glemlsa	Cult	Ure	HP	HspA	VS=150	Variant a flagella	N60BA-	NOO	VS=60	C.COR	VS=8	P-STAT	VS=0.19/0.27	JLF	VS=0.50
48	02/02/95	69	1	dyspepsie	UD	1	G120	1	1	0	1	39	0	123	1	304	1	100	1	0.274	1	1.50	1
52	26/10/94	45	1	dyspepsie-A U	GDN	1	G221F	1	1	1	1	8	0	164	1	368	1	16	1	0.257	1	0.22	0
56	05/09/94	72	0	dyspepsie	UD	1	G233	1	0	1	1	1620	1	>464	1	1704	1	65	1	0.389	1	1.21	1
60	19/06/91	40	1	dyspepsie	UG	1	G333	0	1	0	1	3690	1	>464	1	3192	1	>160	1	0.524	1	6.28	1
64	07/11/94	37	1	dyspepsie urt.	UD	1	G323	1	1	1	1	7	0	173	1	980	1	40	1	0.362	1	0.39	1
65	15/12/94	41	1	perforation	UD	1	G211F	1	1	1	1	3	0	100	1	310	1	86	1	0.318	1	0.33	1
70	29/04/93	47	1	dyspepsie-melena	UD	1	G110	1	0	0	1	8	0	164	1	384	1	23	1	0.256	1	1.13	1
71	29/03/93	39	1	dyspepsie	UD	1	G221	1	0	1	1	107	0	97	1	121	1	23	1	0.183	0	0.14	0
76	09/06/93	36	1	dyspepsie	UD	1	G121*	1	0	0	1	313	1	140	1	726	1	37	1	0.298	1	0.25	0
78	12/05/93	49	0	dyspepsie-A U	GDN	1	G220	1	0	1	1	1335	1	>464	1	958	1	>160	1	0.394	1	1.16	1
81	08/06/94	29	1	dyspepsie-A U	GDN	1	G110	1	1	1	1	111	0	96	1	175	1	36	1	0.262	1	0.72	1
84	22/11/93	24	1	perforation	UD	1	G223	1	0	1	1	74	0	>464	1	842	1	68	1	0.316	1	0.86	1
88	17/06/93	36	1	dyspepsie	UD	1	G121	1	0	0	1	250	1	>464	1	440	1	43	1	0.288	1	0.89	1
89	22/06/94	23	1	dyspepsie	UD	1	G222	1	1	1	1	18	0	175	1	712	1	117	1	0.344	1	0.51	1
90	25/05/94	41	1	dyspepsie	UD	1	G321	1	1	1	1	80	0	384	1	612	1	97	1	0.349	1	0.78	1
92	02/06/93	67	1	dyspepsie-K Ph	UG	1	G123	1	1	1	1	21	0	230	1	177	1	61	1	0.168	0	0.17	0
99	18/02/92	36	0	dyspepsie	UD	1	G321	1	0	1	1	21	0	294	1	370	1	29	1	0.362	1	1.58	1
100	13/05/92	38	1	dyspepsie	UD	1	G221	0	1	1	1	20	0	415	1	444	1	67	1	0.369	1	0.31	1

Tableau 5 : Sérum de la population II

27 patients Hp+/U-

N°	Date	Age	Sexe	Clinique	Endos.	UD/UG	Histo-A	Giemsa	HP	HspA	VS=150	Variant a la gelée H6nBA- PBS VS=80 NOG VS=60	N6 NOG	VS=100	C.COR VS=8	P-STAT VS=8	VS=0.19/0.27 JLF	VS=0.30				
1	14/04/93	24	0	dyspepsie urt	GDN	0	G221	1	1	1	218	1	>464	1	884	1	>928	1	0.293	1	0.43	1
2	29/06/94	45	1	dyspepsie An	GDN	0	G311	1	1	0	32	0	>464	1	1896	1	>928	1	0.377	1	0.50	1
3	08/04/92	44	1	dyspepsie	GDN	0	G313	1	1	1	63	0	384	1	460	1	480	1	0.198	1	0.05	0
4	01/12/94	28	0	dyspepsie	GDN	0	G321F	1	1	0	28	0	>464	1	1788	1	>928	1	0.291	1	0.59	1
6	22/06/94	28	0	dyspepsie	GDN	0	G220	0	1	0	14	0	204	1	354	1	324	1	0.233	1	0.18	0
7	21/04/93	58	0	dyspepsie urt.	GDN	0	G320	1	1	1	770	1	>464	1	2088	1	>928	1	0.323	1	0.42	1
12	04/11/92	48	0	dyspepsie-RGO	GDN	0	G210	1	1	1	341	1	251	1	908	1	>928	1	0.343	1	0.71	1
23	07/12/94	28	0	dyspepsie	GDN	0	G312	1	1	0	1550	1	460	1	452	1	>928	1	0.33	1	0.85	1
24	21/04/93	39	1	RGO urt.	GDN	0	G321	1	1	0	30	0	94	1	149	1	>928	1	0.237	1	0.15	0
25	09/11/94	78	0	dyspepsie An.	GDN	0	G121	1	1	0	3250	1	>464	1	1384	1	>928	1	0.41	1	0.75	1
31	21/07/93	53	1	dyspepsie	GDN	0	G333	1	1	0	3820	1	455	1	958	1	>928	1	0.493	1	5.89	1
32	09/12/92	53	0	dyspepsie all.	GDN	0	G211	1	1	0	61	0	345	1	455	1	>928	1	0.336	1	0.38	1
37	07/12/92	59	1	dyspepsie	érosions G	0	G211	1	1	0	71	0	464	1	455	1	>928	1	0.3	1	0.92	1
42	26/12/94	29	1	dyspepsie	GDN	0	G321F	0	1	0	423	1	>464	1	1892	1	>928	1	0.404	1	0.87	1
45	08/06/94	46	0	dyspepsie urt.	GDN	0	G310	1	1	1	247	1	232	1	431	1	>928	1	0.325	1	1.07	1
49	12/05/93	43	1	dyspepsie urt.	GDN	0	G220	1	1	0	37	0	47	0	61	1	251	1	0.179	0	0.26	0
55	24/05/93	48	0	dyspepsie ané	GDN	0	G333	1	1	0	2375	1	>464	1	786	1	>928	1	0.374	1	0.42	1
58	19/12/94	56	0	dyspepsie An	GDN	0	G310	1	1	0	1615	1	>464	1	762	1	>928	1	0.323	1	0.63	1
59	06/05/93	20	0	RGO	GDN	0	G111	1	1	0	0	0	63	0	134	1	254	1	0.183	0	0.44	1
63	06/01/92	51	1	dyspepsie	GDN	0	G322	0	1	0	22	0	>464	1	1028	1	>928	1	0.332	1	0.48	1
67	01/06/94	37	0	vomissements	GDN	0	G222	0	1	1	72	0	134	1	184	1	188	1	0.203	1	0.23	0
69	23/09/92	29	0	dyspepsie urt.	GDN	0	G222	1	1	1	175	1	>464	1	461	1	608	1	0.278	1	0.35	1
73	27/06/94	63	1	dysphagie	GDN	0	G212	1	1	1	812	1	158	1	309	1	>928	1	0.317	1	1.28	1
74	20/04/94	62	0	dyspepsie	GDN	0	G222	1	1	1	4850	1	319	1	2156	1	>928	1	0.372	1	1.01	1
77	04/11/92	71	1	dyspepsie-ané.	GDN	0	G211	1	1	0	13	0	142	1	240	1	400	1	0.236	1	0.29	0
85	21/11/94	51	1	RGO	GDN	0	G121F	1	1	1	2	0	167	1	326	1	128	1	0.247	1	0.18	0
93	07/12/94	42	0	RGO	GDN	0	G321	1	1	1	59	0	175	1	357	1	>928	1	0.281	1	1.54	1

Tableau 5 bis : Sérum de la population II
31 patients Hp-

N°	Date	Age	Sexe	Clinique	Endos.	UD/UG	Histo-A	Giemsa	HP	HP	HspA	VS=150	Variant affaibli N6/BA- PBS VS=80	NOG	VS=100	C.CORR VS=80	P. STAT VS=0.19x0.27	JLF	VS=0.30
8	29/07/92	44	1	RGQ/dyspepsie urt	GDN	0	normale	0	0	0	23	0	34	0	0	0	0.158	0	0.01
14	02/06/93	34	1	dyspepsie urt	GDN	0	normale	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0.1	0	0.03
19	17/06/93	43	1	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	16	0	15	0	0	0	0.173	0	0.13
20	23/11/94	72	1	corticoides	GDN	0	normale	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0.168	0	0.01
21	15/03/93	65	1	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0.107	0	0.06
22	16/11/94	39	1	dyspepsie urt	GDN	0	normale	0	0	0	2	0	64	0	0	0	0.152	0	0.04
30	25/01/95	39	0	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	10	0	28	0	0	0	0.095	0	0.02
34	13/01/94	74	1	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	29	0	38	0	0	0	0.176	0	0.00
35	14/11/94	88	0	RGQ	GDN	0	normale	0	0	0	28	0	35	0	0	0	0.135	0	0.00
38	31/01/94	43	1	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	9	0	4	0	0	0	0.113	0	0.08
41	21/04/93	37	1	dyspepsie urt	GDN	0	normale	0	0	0	15	0	122	0	0	0	0.17	0	0.03
46	07/10/92	39	1	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.153	0	0.03
47	27/01/93	40	0	dyspepsie urt	GDN	0	normale	0	0	0	7	0	114	0	0	0	0.133	0	0.00
50	09/07/92	19	1	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	4	0	11	0	0	0	0.13	0	0.01
51	10/02/93	28	1	dyspepsie urt	GDN	0	normale	0	0	0	14	0	7	0	0	0	0.119	0	0.00
54	24/02/93	51	1	RGQ	GDN	0	normale	0	0	0	8	0	24	0	0	0	0.143	0	0.00
57	06/09/91	60	1	RGQ	GDN	0	normale	0	0	0	32	0	61	0	0	0	0.227	1	0.38
61	11/01/95	42	1	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	9	0	10	0	0	0	0.082	0	0.00
62	21/07/93	37	0	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	4	0	6	0	0	0	0.115	0	0.01
68	07/01/92	61	1	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	6	0	70	0	0	0	0.17	0	0.07
72	21/10/92	41	1	RGQ	GDN	0	normale	0	0	0	13	0	1	0	0	0	0.189	0	0.09
79	07/04/93	48	0	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	3	0	12	0	0	0	0.124	0	0.03
80	03/02/93	41	0	dyspepsie urt	GDN	0	normale	0	0	0	3	0	11	0	0	0	0.2	1	0.06
82	24/11/93	42	1	RGQ	GDN	0	normale	0	0	0	3	0	25	0	0	0	0.139	0	0.00
86	11/01/95	35	0	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0.126	0	0.00
87	30/03/94	23	0	RGQ	GDN	0	normale	0	0	0	22	0	3	0	0	0	0.125	0	0.01
91	13/07/94	17	0	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	12	0	40	0	0	0	0.186	0	0.01
94	13/02/92	35	0	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	21	0	22	0	0	0	0.274	1	0.07
95	21/03/90	33	1	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	19	0	43	0	0	0	0.246	0	0.02
97	05/01/95	42	1	RGQ	GDN	0	normale	0	0	0	3	0	3	0	0	0	0.122	0	0.00
98	22/05/92	54	1	dyspepsie	GDN	0	normale	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0.00	0	0.00

Tableau 6 : Sérums de population II
Par rapport à la présence de Hp (culture et/ou anapath)
et Ulcère

Par rapport à Hp+ et UD/UG soit: 34Hp+/U+	HspA malE		VS=100	Sensibilité	Spécificité
			VS=50	44.1% (15/34)	100% (31/31)
			VS=20	52.9% (18/34)	100% (31/31)
				64.7% (22/34)	73.8% (25/31)
	N6flbA-	NOG	VS=100	94.1% (32/34)	96.8% (30/31)
			VS=80	94.1% (32/34)	93.6% (29/31)
			VS=60	100% (34/34)	90.3% (28/31)
		PBS	VS=100	82.4% (28/34)	93.6% (29/31)
			VS=80	94.1% (32/34)	93.6% (29/31)
			VS=60	97.1% (33/34)	83.9% (26/31)
	Séro JLF		VS=0.30	82.4%(28/34)	96.8% (30/31)
	Pylori Stat			94.1% (32/34)	90.3% (28/31)
Cobas Core			100% (34/34)	93.6% (29/31)	

Tableau 7 : Sérums de population II
Par rapport à la présence de Hp (culture et/ou anapath)

			Sensibilité	Spécificité
<u>Par rapport</u> <u>à Hp+ :</u> - 34 UD/UG - 27 GNU <u>soit :</u> 61 Hp+ 31 Hp-	HspA malE		VS=100 45.9% (28/61)	100% (31/31)
			VS=50 59% (36/61)	100% (31/31)
			VS=20 80.7% (45/61)	73.8% (25/31)
	N6flbA-	NOG	VS=100 95.1% (58/61)	96.8% (30/31)
			VS=80 95.1% (58/61)	93.6% (29/31)
			VS=60 100% (61/61)	90.3% (28/31)
		PBS	VS=100 85.3% (52/61)	93.6% (29/31)
			VS=80 93.4% (57/61)	93.6% (29/31)
			VS=60 96.7% (59/61)	83.9% (26/31)
	Séro JLF		VS=0.30 78.7%(48/61)	96.8% (30/31)
	Pylori Stat			93.4% (57/61) 90.3% (28/31)
	Cobas Core			93.3%(60/61)* 93.6% (29/31)

* sérum = VS

Tableau 8 : Sérums de population II
Par rapport à la présence de Hp (culture et/ou anapath) et l'absence
d'Ulcère

			Sensibilité	Spécificité	
Par rapport à Hp+ et GNU soit : 27 Hp+/U-	HspA malE		VS=100	48.2% (13/27)	100% (31/31)
			VS=50	66.7% (18/27)	100% (31/31)
			VS=20	85.2% (23/27)	73.8% (25/31)
	N6flbA-	NOG	VS=100	96.3% (26/27)	96.8% (30/31)
			VS=80	93.6% (26/27)	93.6% (29/31)
			VS=60	100% (27/27)	90.3% (28/31)
		PBS	VS=100	88.9% (24/27)	93.6% (29/31)
			VS=80	92.6% (25/27)	93.6% (29/31)
			VS=60	96.3% (26/27)	83.9% (26/31)
	Séro JLF		VS=0.30	74.1%(20/27)	96.8% (30/31)
Pylori Stat			92.6% (25/27)	90.3% (28/31)	
Cobas Core			96.3%(26/27)	93.6% (29/31)	

La place de la sérologie

La sérologie est placée à 2 niveaux :

- Sérologie très sensible : afin de dépister le portage de la bactérie chez les sujets jeunes se plaignant de douleurs épigastriques.

Si la sérologie s'avère négative, le sujet ne subira pas d'endoscopie ni de biopsie, et une autre cause à ses douleurs sera recherchée.

- Sérologie spécifique de risque : il s'agit là de mettre en évidence le risque de faire une infection grave à *Helicobacter pylori* c'est à dire un ulcère, un cancer ou un lymphome gastrique (lymphome du MALT).

10 - soit en utilisant une molécule spécifique du risque en question

- soit en utilisant un seuil spécifique de risque

(valeur seuil plus élevée chez les sujets à risque que chez les sujets non à risque).

Cette sérologie spécifique peut être utilisée pour faire un screening de la population générale, et ainsi de dépister les cancers et les lymphomes, liés à *Helicobacter pylori* qui ne seraient pas dépistés par faute de symptômes. (Seuls les sujets se plaignant de douleurs vont consulter un gastro-entérologue).

La réponse à la question de sensibilité est bonne.

Tableau 9 : Moyenne et écart type des U.A. dans les 3 groupes de patients.

		Hp- (n=31)	Hp+/U- (n=27)	Hp+/U+ (n=34)
Hsp A	<u>moyenne</u>	<u>10.61</u>	<u>775.72</u>	<u>770.32</u>
	écartype	8.81	1312.56	1666.52
N6fIBA- (NOG)	<u>moyenne</u>	<u>17.16</u>	<u>895.50</u>	<u>944.85</u>
	écartype	26.69	818.57	915.27

Tableau 10 : Moyenne et écart type des U.A. en fonction de l'Histologie gastrique.

Intensité	Atrophie			Inflammation			Activité			
	Hsp A	NOG	P.Stat	Cag A	Hsp A	NOG	P.Stat	Hsp A	NOG	P.Stat
0								<u>977</u> 2052	<u>712</u> 680	<u>0.31</u> 0.08
1	<u>410</u> 1004	<u>412</u> 390	<u>0.26</u> 0.07	<u>93</u> 122	<u>437</u> 669	<u>577</u> 466	<u>0.30</u> 0.06	<u>479</u> 1117	<u>938</u> 876	<u>0.32</u> 0.09
2	<u>423</u> 964	<u>730</u> 707	<u>0.30</u> 0.08	<u>188</u> 200	<u>639</u> 1655	<u>672</u> 780	<u>0.31</u> 0.09	<u>733</u> 1382	<u>796</u> 753	<u>0.31</u> 0.07
3	<u>1321</u> 2059	<u>1403</u> 1012	<u>0.36</u> 0.08	<u>554</u> 607	<u>2309</u> 1742	<u>2175</u> 1132	<u>0.43</u> 0.08	<u>1302</u> 1628	<u>1402</u> 1174	<u>0.35</u> 0.12

61 Hp+ :

Répartition	Atrophie	Inflammation	Activité
0	0	0	15
1	10	21	25
2	28	33	12
3	22	7	9
4	1	0	0

Corrélation entre l'intensité de la gastrite et le taux en anticorps

La gastrite se définit par 3 paramètres :

- L'atrophie (représentée par le 1er chiffre après G) ; son intensité est notée de 1 à 4.
- L'inflammation globale correspond à l'infiltration de Polynucléaires neutrophiles et de Monocytes ; (représentée par le 2ème chiffre après le G). Son intensité est notée de 1 à 3.
- L'activité correspond au nombre de Polynucléaires neutrophiles (représentée par le 3ème chiffre après le G) ; son intensité est notée de 0 à 3. Certaines formes folliculaires sont notées F.

Normalement, on peut observer la corrélation suivante :

L'activité est très bien corrélée à Helicobacter pylori.

L'inflammation est bien corrélée à Helicobacter pylori.

On a donc calculé en fonction de ces 3 paramètres et de leur intensité, la moyenne des titres observés dans chaque groupe.

Interprétation des résultats :

L'utilisation d'un test t permettra de mettre en évidence une différence significative ou non entre 2 moyennes observées avec un risque de 5%.

- 20 L'hypothèse sur laquelle est fondée le test t est l'égalité des variances, mise en évidence par un test F (test de Fisher).

Certaines variances n'étant pas égales, on ne pourra donc pas comparer toutes les moyennes entre elles.

Les comparaisons des moyennes, lorsque cela est possible, ont pu mettre en évidence des différences significatives ou non dans les différents groupes.

- Différence significative :

Dans le groupe « Inflammation », entre les moyennes des « 2 » et « 3 » de HspA et de NOG.

- 30 - - Différence non significative :

Au niveau de l'activité, on n'a pas mis en évidence de différence significative entre les différents niveaux d'intensité :

- HspA : pas de différence significative entre les niveaux 0 et 2

0 et 3

1 et 2

1 et 3

2 et 3

- NOG : pas de différence significative entre les niveaux 0 et 1

0 et 2

1 et 2

1 et 3

2 et 3.

On peut néanmoins constater une tendance à l'augmentation des titres en fonction de l'intensité de la gastrite :

- au niveau de l'atrophie, les moyennes doublent lorsque l'on passe du niveau 1 à 2 et du niveau 2 à 3 pour HspA et pour l'extrait au NOG de la souche aflagellée.

- au niveau de l'inflammation, les moyennes doublent lorsque l'on passe du niveau 1 à 2.

20 Le nombre d'effectifs dans chaque groupe est relativement faible (toujours <30) pour conclure à des différences statistiquement significatives.

Tableau 11 : Moyenne des U.A. en fonction de l'Histologie gastrique.

Intensité	sur Hp+/U+	Atrophie			Inflammation			Activité		
		Hsp A	NOG	P.Stat	Hsp A	NOG	P.Stat	Hsp A	NOG	P.Stat
0	moyenne (écart-type)							$\frac{1292}{2619}$	$\frac{675}{697}$	$\frac{0.32}{0.09}$
1	moyenne (écart-type)	$\frac{121}{118}$	$\frac{326}{218}$	$\frac{0.25}{0.05}$	$\frac{438}{759}$	$\frac{511}{451}$	$\frac{0.30}{0.06}$	$\frac{599}{1298}$	$\frac{1016}{1050}$	$\frac{0.34}{0.10}$
2	moyenne (écart-type)	$\frac{304}{507}$	$\frac{793}{784}$	$\frac{0.32}{0.09}$	$\frac{586}{1820}$	$\frac{845}{813}$	$\frac{0.33}{0.09}$	$\frac{219}{329}$	$\frac{827}{835}$	$\frac{0.32}{0.09}$
3	moyenne (écart-type)	$\frac{2004}{2856}$	$\frac{1722}{1060}$	$\frac{0.41}{0.07}$	$\frac{2133}{1989}$	$\frac{2194}{1006}$	$\frac{0.43}{0.09}$	$\frac{911}{1502}$	$\frac{1316}{1040}$	$\frac{0.35}{0.12}$

34 Hp+/U+ :

Répartition	Atrophie	Inflammation	Activité
0	0	0	9
1	7	10	13
2	17	19	6
3	9	5	6
4	1	0	0

Les sérums pouvant présenter des réactions croisées

2 types de sérums ont été utilisés.

20 sérums (10 anti-Legionella + et 10 anti-Chlamydia +) pouvant présenter des réactions croisées avec HspA, car ces 3 bactéries possèdent des « Heat shock proteins » très voisines les unes des autres.

3 sérums anti-Campylobacter positifs, afin de mettre en évidence des réactions croisées avec la souche flagellée N6, qui disparaîtraient avec la souche aflagellée N6flbA-. Il est très difficile de se procurer des sérums anti-Campylobacter positifs, c'est pourquoi il n'y a que 3 sérums.

10 HspA ne présente aucune réaction croisée, ni avec les 10 sérums anti-Legionella positifs, ni avec les 10 sérums anti-Chlamydia positifs.

Certains de ces sérums ont des titres positifs en anticorps anti-Helicobacter pylori, aussi bien avec la souche flagellée qu'avec la souche aflagellée, mais le contexte clinique de ces sérums n'est pas connu.

Tableau 12 : Sérums pouvant présenter des réactions croisées

Legionella +	Titre	N6	VS=100	N6fIBA-	VS=60	HspA	VS=100
A	P2 P3 =256	0	0	4	0	47	0
B	P4 P5 =64	>928	1	641	1	42	0
C	P2 P3 =128	212	1	87	1	68	0
D	P2 P3 =64	70	0	19	0	15	0
E	P1=256 /P2=512	>928	1	239	1	258	1
F	P2 P3 P4 P5 =128	322	1	121	1	41	0
G	P1=512 /P6=1024	>928	1	193	1	121	1
H	P4 P5 =64	>928	1	479	1	18	0
I	P2=128 /P3=64	33	0	17	0	25	0
J	P2=256 /P3=128	16	0	8	0	32	0

Chlamydia +	Titre	N6	VS=100	N6fIBA-	VS=60	HspA	VS=100
A	256	6	0	8	0	25	0
B	256	7	0	9	0	34	0
C	64	636	1	290	1	39	0
D	256	367	1	225	1	19	0
E	32	>928	1	855	1	19	0
F	128	>928	1	783	1	27	0
G	32	115	1	55	0	15	0
H Twar	16	19	0	10	0	14	0
I	32	>928	1	592	1	>928	1
J Twar	64	610	1	280	1	44	0

Campylobacter +		N6	VS=100	N6fIBA-	VS=60	HspA	VS=100
A		35	0	28	0	17	0
B		13	0	4	0	27	0
C		50	0	68	1	89	0

CONCLUSION

HspA malE

Cette molécule ne peut toujours pas être utilisée seule car elle manque aussi de sensibilité, mais elle pourrait être intéressante si on l'associe à d'autres molécules.

Elle présente toutefois un risque de réactions croisées, du fait de la conservation importante de ces « Heat shock proteins » entre les différentes espèces bactériennes

N6flbA-

- 10 Ce variant aflagellé paraît très intéressant, la sensibilité et la spécificité obtenues avec la population II de sérums montre une performance très intéressante.

N6

Pour l'instant, la souche flagellée semble intéressante. Cependant, les réactions croisées relatives au flagelle n'ont été que peu étudiées en raison de la difficulté à se procurer des sérums bien documentés en sérologie Campylobacter.

Test JLF

- 20 Un test sérologique basé sur l'extraction aqueuse (PBS) de plusieurs souches d'Helicobacter pylori a été mis au point. Ce test semble très performant.

Un extrait NOG du variant aflagellé a été utilisé pour tester la population I de sérums.

87 sérums, documentés du point de vue bactériologique et anatomopathologique uniquement ont été testés avec l'extrait bactérien aflagellé.

Un sérum est positif si la culture est positive, ou si l'anapath, et le test rapide à l'urée sont positifs.

- 30 Un sérum est négatif si les 3 tests (culture, anapath, et test rapide à l'urée) sont négatifs.

On trouve une Sensibilité de 90.3% (28/31) pour une Spécificité de 71.4% (40/56).

Sur 16 sérums faux positifs avec un premier test, 9 sont positifs soit avec la sérologie JLF, soit avec le Western Blot JLF, soit avec les deux.

Sur les 3 sérums faux négatifs avec un premier test, les 3 sont négatifs, soit avec la sérologie JLF, soit avec le Western Blot JLF, et un sérum est négatif avec les deux systèmes.

Tableau 13 : 87 sérums de la population I testés avec l'extrait au N-Octyl Glucoside de la souche aflagellée

N°sérum	HspA	VS 150	séroJLF	VS 35	WB JLF	interp	WB Bioptim	Hp	N6nBA-	
									NOG	VS=60
572	35	0	21	0	2p	-	+	0	128	1
573	11	0	46	1	3p	+	-	1	229	1
574	11	0	3	0	1p	-	-	0	9	0
575	0	0	63	1	3p	+	-	0	166	1
576	121	0	19	0	3p	+	+	0	246	1
577	0	0	1	0	0	-	-	0	3	0
578	6	0	4	0	0	-	-	0	24	0
579	2630	1	114	1	3p	+	-	1	>464	1
580	721	1	125	1	4p	+	-	1	>464	1
581	0	0	2	0	0	-	-	0	2	0
582	0	0	2	0	1p	-	-	0	6	0
583	0	0	3	0	2p	-	-	0	27	0
584	36	0	1	0	2p	-	-	0	12	0
585	2114	1	125	1	4p	+	+	1	>464	1
587	19	0	2	0	2p	-	-	0	11	0
588	1388	1	58	1	3p	+	-	1	>464	1
589	323	1	3	0	4p	+	+	0	9	0
591	4	0	4	0	2p	-	-	0	9	0
592	6	0	0	0	2p	-	+	1	3	0
593	44	0	28	0	3p	+	-	1	>464	1
595	76	0	78	1	4p	+	+	0	9	0
597	0	0	0	0	0	-	-	1	9	0
599	49	0	125	1	4p	+	+	1	>464	1
600	0	0	3	0	0	-	-	0	3	0
601	6	0	1	0	0	-	-	0	6	0
602	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0
605	11	0	0	0	0	-	-	0	10	0
608	5	0	5	0	0	-	-	0	9	0
609	308	1	8	0	0	-	-	0	13	0
610	2370	1	111	1	4p	+	-	1	>464	1
612	477	1	34	0	4p	+	+	0	422	1
613	46	0	0	0	0	-	-	0	3	0
616	741	1	73	1	4p	+	+	1	>464	1
617	1725	1	125	1	4p	+	-	1	286	1
618	426	1	101	1	4p	+	+	1	>464	1
621	0	0	82	1	4p	+	+	1	>464	1
622	15	0	6	0	2p	-	-	0	25	0
624	411	1	110	1	4p	+	+	0	>464	1
626	46	0	11	0	1p	-	-	1	53	0
627	0	0	48	1	1p	-	-	1	27	0
629	6	0	2	0	0	-	-	0	2	0
631	31	0	21	0	2p	-	-	0	92	1
632	0	0	3	0	0	-	-	0	22	0
633	285	1	104	1	3p	+	+	1	>464	1
634	48	0	69	1	4p	+	-	1	>464	1
636	523	1	33	0	2p	-	-	1	71	1

Tableau 14 : 87 sérums de la population I testés avec l'extrait au N-Octyl Glucoside de la souche aflagellée

N°sérum	HspA	VS 150	séroJLF	VS 35	WB JLF	interp	WB Bioptim	Hp	N6fBA-	
									NOG	VS=60
638	922	1	36	1	3p	+	+	1	>464	1
641	0	0	6	0	1p	-	-	0	8	0
645	29	0	8	0	1p	-	-	0	29	0
647	0	0	2	0	1p	-	-	0	4	0
649	5	0	5	0	0	-	-	0	12	0
650	6	0	0	0	0	-	-	0	3	0
654	0	0	1	0	0	-	-	0	4	0
655	49	0	59	1	2p	-	-	1	229	1
656	0	0	3	0	0	-	-	0	8	0
657	363	1	105	1	4p	+	+	1	>464	1
658	0	0	8	0	1p	-	-	0	8	0
659	0	0	3	0	0	-	-	0	3	0
662	73	0	3	0	2p	-	-	0	40	0
663	25	0	21	0	2p	-	-	0	103	1
467	86	0	26	0	4p	+	-	0	96	1
468	32	0	68	1	4p	+	+	1	>464	1
469	265	1	118	1	3p	+	+	1	>464	1
470	734	1	77	1	2p	-/+	+	0	>464	1
471	214	1	100	1	4p	+	-	1	>464	1
472	4	0	5	0	0	-	-	0	0	0
473	1023	1	55	1	3p	+	-	1	>464	1
474	12	0	10	0	0	-	-	0	21	0
475	9	0	13	0	0	-	+	0	210	1
476	2611	1	74	1	4p	+	+	1	>464	1
478	0	0	0	0	0	-	-	0	1	0
479	175	1	9	0	4p	+	-	0	348	1
480	0	0	1	0	0	-	-	0	7	0
481	800	1	92	1	3p	+	+	1	425	1
482	0	0	1	0	0	-	-	0	8	0
483	0	0	39	1	3p	+	+	1	>464	1
484	0	0	3	0	0	-	-	0	20	0
485	0	0	1	0	0	-	-	0	11	0
486	0	0	2	0	0	-	-	0	6	0
725	0	0	7	0	0	-	-	0	198	1
730	190	1	45	1	1p	-	-	0	372	1
732	0	0	10	0	1p	-	-	0	145	1
735	0	0	30	0	2p	-	-	1	143	1
736	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0
737	25	0	102	1	4p	+	-	1	155	1
738	2233	1	125	1	4p	+	-	1	>464	1
739	79	0	33	0	1p	-	+	0	274	1

TECHNIQUE

Plaques coatées à : 2 µg/ml en Antigène Hsp A
 3 µg/ml en extrait NOG de NflbA et N6

Gamme: 5 points de gamme témoin négatif

témoin positif utilisé à 4

dilutions

Sérums de patients: dilution au 1/100

volume déposé 100µl

- 10 - Incubation : 1 heure à 37°C
 - 3 lavages

Conjugué monoclonal (IgG toxo) utilisé au 1/32000 pour HspA
 1/64000 pour N6flbA-
 1/56000 pour N6
 volume déposé 100 µl

- Incubation du conjugué 1 heure à 37°C
 - 4 lavages
- 20 - Révélation de la réaction enzymatique par OPD + substrat
 30 minutes à l'obscurité
 - Arrêt de la réaction enzymatique par H₂SO₄
 - Lecture des D.O. à 492 nm / 620 nm
 Conversion des D.O en Unités Arbitraires (UA).

Tableau 15 : Sérums documentés de la population I
42 sérums Hp+

N°sérum	Sexe	DDN	Endos.	ANATOMOPATHOLOGIE		BACTERIOLOGIE			Hp	SéroJLF	VS=0.3	NOG	VS=60
				Glemlsa	Histo	Gram	Urée	Cult.					
952253	1	01/10/60	G, H	0	G	1	1	1	1	1	1	>464	1
236174	1	02/05/60	G	0	G	1	1	1	1	10.42	1	216	1
974107	2	15/02/32	G (mini)	0	G	1	1	1	1	1.39	1	272	1
34812	1	10/12/52	G, B	0	G	1	1	1	1	0.82	1	452	1
229712	2	11/08/53	G	0	G	1	1	1	1	0.11	0	148	1
46511	1	17/01/70	G	0	G	1*	0	1	1	1.26	1	213	1
180334	2	14/01/59	G	0	U	1	1	1	1	0.83	1	>464	1
189005	2	23/10/25	U	0	U	1	1	1	1	0.87	1	>464	1
49860	1	06/07/64	U	0	U	1	1	1	1	2	1	>464	1
168332	1	06/11/60	G	1	G	1	1	1	1	0.23	0	394	1
195282	1	11/06/46	G	1	G	1	0	1	1	0.91	1	180	1
176859	1	24/04/50	G	1	G	1	1	1	1	1.39	1	>464	1
987898	1	13/05/58	G	1	G	1	1	1	1	0.69	1	297	1
954498	2	01/12/45	G	1	G	1	1	1	1	1.12	1	>464	1
195175	2	01/09/08	G	1	G	0	0	1	1	2.7	1	>464	1
156007	2	27/09/56	G, B	1	G	1	1	1	1	1.68	1	>464	1
18318	1	19/12/63	G, B	1	G	1	1	1	1	0.36	1	437	1
215979	2	04/05/19	H, G, B	1	G	1	1	1	1	1.2	1	45	0
25322	2	12/02/16	G	1	G	1	1	1	1	2.5	1	>464	1
26555	1	09/11/65	U, H	1	G	1	1	1	1	2.4	1	>464	1
193295	1	24/01/16	U bu. ant.	1	G	1	1	1	1	2.5	1	>464	1
237220	1	01/06/65	U bulb.	1	G	1	0	1	1	0.14	0	328	1

Légende

G = Gastrite
 H = Hernie latérale
 U = Ulcère (UD = Ulcère duodénal)
 (UG = Ulcère gastrique)
 D = Duodénite
 B/Bulb. = Bulbite
 O = Oesophagite

Tableau 15 bis: Sérums documentés de la population I
42 sérums Hp+

N°sérum	Sexe	DDN	Endos.	ANATOMOPATHOLOGIE		BACTERIOLOGIE			Hp	SéroJLF	VS=0.3	NOG	VS=60
				Giemsa	Histo	Gram	Urée	Cult.					
237191	1	06/05/42	U bulb.	1	G	1	0	1	1	1.16	1	>464	1
238683	1	13/09/30	G, U bulb.	1	G	1	1	1	1	1.73	1	>464	1
79163	1	06/07/72	G	1	G	1	1	1	1	0.46	1	312	1
87951	1	15/04/41	G	1	G	1	1	1	1	0.7	1	>464	1
93773	1	12/05/43	G	1	G	0	0	1	1	1.05	1	>464	1
97478	1	04/05/65	G	1	G	1	1	1	1	0.42	1	>464	1
96436	1	06/11/74	G	1	G	1	1	1	1	0.84	1	183	1
86502	1	02/10/45	G	1	G	1	1	1	1	0.78	1	>464	1
42230	2	12/06/58	G	1	G	1	1	1	1	0.81	1	>464	1
51105	2	12/08/45	G, UD	1	G	1	1	1	1	1.1	1	>464	1
58631	1	21/08/43	G	1	G	1	1	1	1	0.8	1	214	1
79105	2	28/01/61	G, UD	1	G	1	1	1	1	1.25	1	>464	1
99121	1	28/10/59	G	1	G	1	1	1	1	0.9	1	449	1
216779	1	08/04/47	G, U	1	G	1	1	1	1	0.25	0	283	1
996070	1	29/01/47	G	1	G/U	1	1	1	1	0.31	1	121	1
72420	1	15/05/55	G, UD	1	G préatroph.	1	1	1	1	1.2	1	>464	1
205110	1	10/06/61	UD	1	GUD	1	1	1	1	0.3	0	386	1
62720	1	18/10/56	UG	1	U	1	1	1	1	0.68	1	>464	1
67767	2	01/10/44	UGD	1	U	1	1	1	1	1.2	1	>464	1
205855	1	09/07/38	G, U	1	UD	1	1	1	1	0.25	0	71	1

Légende

G = Gastrite
 H = Hernie iatale
 U = Ulcère (UD = Ulcère duodénal)
 (UG = Ulcère gastrique)
 D = Duodénite
 B/Bulb. = Bulbite
 O = Oesophagite

Tableau 16 : Sérum documentés de la population I
55 sérum Hp-

N°sérum	Sexe	DDN	Endos.	ANATOMOPATHOLOGIE		BACTERIOLOGIE			Hp	SéroJLF	VS=0.3	NOG	VS=60
				Giemsa	Histo	Gram	Uree	Cult.					
79476	1	23/06/31	G	0	Adénome ulcéré	0	0	0	0	0.02	0	6	0
75439	2	14/05/32	G	0	G	0	0	0	0	1.19	1	>464	1
97286	2	03/01/37	G	0	G	0	0	0	0	0.45	1	66	1
68053	1	02/05/48	G	0	G	0	0	0	0	1.02	1	304	1
71300	2	14/10/63	G	0	G	0	0	0	0	0.89	1	>464	1
944990	1	01/10/54	G	0	G	0	0	0	0	0.04	0	4	0
967659	2	28/01/46	G	0	G	0	0	0	0	0.01	0	5	0
985409	2	26/07/20	U min	0	G	0	0	0	0	0.21	0	69	1
985551	2	18/08/09	G, U, B	0	G	0	0	0	0	0.05	0	14	0
992025	1	22/03/32	G	0	G	0	0	0	0	0.07	0	65	1
998792	2	11/04/44	G	0	G	0	0	0	0	0.08	0	26	0
16479	1	13/07/93	RAS	0	G	1*	0	0	0	0.02	0	0	0
77183	2	24/08/14	G, U	0	G	0	0	0	0	0.03	0	9	0
77566	1	25/01/32	G	0	G	0	0	0	0	0.01	0	22	0
991337	1	24/10/60	G	0	G	0	0	0	0	0.07	0	26	0
78471	2	15/12/15	G	0	G + Hyperplasie	0	0	0	0	0.07	0	106	1
83356	1	10/07/21	U cicat.	0	G + métapl. intest.	0	0	0	0	0.37	1	>464	1
936515	2	05/06/81	RAS	0	G min	0	0	0	0	0.02	0	0	0
991386	2	22/01/71	G	0	G min	0	0	0	0	0.17	0	3	0
6130	1	05/05/72	G	0	G min	1*	0	0	0	0.06	0	0	0
81415	1	23/08/31	G	0	G min	0	0	0	0	0.03	0	5	0
82175	1	13/01/49	U cicat.	0	G min	0	0	0	0	0.03	0	34	0
78652	1	01/08/18	G, U	0	Hypotrophie gast.	0	0	0	0	0.04	0	10	0
89819	2	16/02/42	Normale	0	Normale	0	0	0	0	0.88	1	>464	1
942184	2	09/02/67	G	0	Normale	0	0	0	0	0.1	0	52	0
981000	2	10/10/47	G	0	Normale	0	0	0	0	0.06	0	19	0
1613	1	11/01/26	G, B, D	0	Normale	0	0	0	0	0.68	1	195	1

Tableau 16bis : Sérums documentés de la population I
55 sérums Hp-

N°sérum	Sexe	DDN	Endos.	ANATOMOPATHOLOGIE		BACTERIOLOGIE			Hp	SéroJLF	VS=0.3	NOG	VS=60
				Giemsa	Histo	Gram	Urée	Cult.					
984979	2	23/04/29	UG	0	Normale	0	0	0	0	0	0	3	0
58767	2	19/12/93	RAS	0	Normale	0	0	0	0	0.08	0	0	0
79861	2	26/07/63	G, O	0	Normale	0	0	0	0	0.06	0	16	0
85290	2	26/04/63	RAS	0	Normale	0	0	0	0	0.01	0	2	0
91423	1	13/02/39	RAS	0	Normale	0	0	0	0	0.03	0	0	0
93252	2	26/08/85	RAS	0	Normale	0	0	0	0	0.09	0	10	0
94430	1	06/04/62	RAS	0	Normale	0	0	0	0	0.13	0	>464	1
990363	2	03/06/36	G, B	0	Normale +/-	0	0	0	0	0.18	0	42	0
87467	1	07/10/50	UGD	0	U	0	0	0	0	0.02	0	60	0
239085	1	05/02/45	Bulb., UG	0	U	0	0	0	0	0.03	0	73	1
3473	1	06/02/46	G, U	1	G	0	0	0	0	1.01	1	>464	1
78605	1	14/05/83	U bulb.	1	G	0	0	0	0	0.56	1	>464	1
83721	1	21/01/95	G	1	G	0	0	0	0	0.61	1	245	1
90169	1	18/04/38	G, B	1	G	0	0	0	0	1.15	1	>464	1
91081	2	08/01/45	G, D	1	G	0	0	0	0	1.8	1	>464	1
43127	1	24/02/41	G	1	G	0	0	0	0	1.15	1	>464	1
928133	2	25/03/71	G	1	G	0	0	0	0	0.03	0	3	0
9128	1	08/03/77	G	1	G	0	0	0	0	0.01	0	0	0
974895	1	11/05/38	B, G	1	G	0	0	0	0	0.08	0	2	0
26697	1	23/08/44	H, O, U	1	G	0	0	0	0	0.21	0	8	0
78414	1	06/02/21	G, B, U	1	G	0	0	0	0	0.02	0	5	0
78451	1	26/11/45	G	1	G	0	0	0	0	0.02	0	19	0
79500	1	01/03/50	U oesoph.	1	G	0	0	0	0	0.01	0	3	0
79880	1	02/01/74	UG, B	1	G	0	0	0	0	0.06	0	5	0
416	1	18/02/71	O, G	1	G min	0	0	0	0	0.03	0	1	0
74548	1	25/02/45	UGD	1	U	0	0	0	0	0.38	1	371	1
99538	1	02/04/58	U bulb.	1	U	0	0	0	0	1.08	1	>464	1
98953	2	19/12/16	U	1	U	0	0	0	0	0.62	1	>464	1

Tableau 17 : Population documentée de la population I
55 sérums Hp-
42 sérums Hp+

	SENSIBILITE	SPECIFICITE
Séro JLF	85.7% (36/42)	70.9% (39/55)
NOG 60	97.6% (41/42)	61.8% (34/55)

PROTOCOLES D'EXTRACTION A PARTIR DE LA SOUCHE AFLAGELLEE N6flbA-

Quantité fournie 800 mg de bactéries recueillies avec du PBS,
centrifugées

3 extractions testées.

EXTRACTIONS DE LA SOUCHE AFLAGELLEE

	Extraction Glycine	Extraction N-Octyl Glucoside	Extraction PBS
Récupération	PBS	PBS 0.01 M	PBS pH 7.4
Lavage	2 fois dans du PBS 8.000 rpm / 12 min	2 fois dans du PBS 8.000 rpm / 12 min	
Extraction	Tampon Glycine Acide 0.2M pH 2.2 15 min. Tp ambiante agitation douce 100 mg (poids humide) pour 2.5 ml	PBS contenant : 1% N-Octyl Glucoside pH 7.2 (Sigma Chemical Co.) 20 min. Tp ambiante	Vortexer pendant 1 min.
Centrifugation	11.000 g 15 min.	23.500 g 20 min.	5.000 g 10 min.
Neutralisation	NaOH 1M		
Dialyse	PBS pH 7.2 24 H à +4°C cut-off 10.000	PBS pH 7.2 24 H à +4°C cut-off 10.000	PBS pH 7.2 24 H à +4°C cut-off 10.000
Conservation	détermination de la concentration Conservation à -20°C	élimination des particules insolubles conservation à -20°C	détermination de la concentration Conservation à - 20°C

SDS PAGE DES DIFFERENTS EXTRAITS DE LA SOUCHE
AFLAGELLE N6 FLBA-

N° puits	Type d'échantillon	Concentration ug/ml	Volume échantillon / Volume à Tampon	Volume déposé
1	Etalon PM		5 + 5 / 190	10
2	Extrait Glycine	202.9	60 / 60	60
3				
4	Extrait N-Octyl Glucoside	874	51 / 39	60
5				
6	Extrait PBS 1	539.2	60 / 20	60
7				
8	Extrait PBS 2	77.9	60 / 20	60
9				
10	Etalon PM		5 + 5 / 190	10
11	Culot Extrait Glycine	2778.7	20 / 20	20
12				
13	Culot Extrait Glucoside	972.9	40 / 40	60
14				
15	Extrait Glycine sédimenté	309.3	60 / 20	60
16				
17	HspA Mal E	3000	20 / 20	20
18				
19				
20	Kaléidoscope			20

Références :

1. Andrews, G.P., Maurelli, A.T. : *mxiA* of *Shigella flexneri* 2a, which facilitates export of invasion plasmid antigens, encodes a homolog of the low-calcium-response protein, *LcrD* of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 60: 3287-3295 (1992).
2. Galan, J.E., Ginocchio, C. Costeas, P. : Molecular and functional
10 characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA* : homology of *InvA* to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* 174, 4338-4349 (1992).
3. Leying, H., Suerbaum, S. Geis, G., Haas, R. : Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol. Microbiol.* 6. 2563-2874 (1993).
5. O'Toole, P.W., Kostrzynska, M., Trust, T.J.: Non-mobile mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* defective in flagellar hook
20 production. *Mol. Microbiol.* 14, 691-703 (1994).
6. Plano, G.V., Barve, S.S., Straley, S.C. : *LcrD*, a membrane-bound regulator of the *Yersinia pestis* low-calcium response. *J. Bacteriol.* 173. 7293-7303 (1991).
7. Ramakrishna, G., Zhao, J-L., Newton, A. : The cell cycle-regulated gene *flbF* of *Caulobacter crescentus* is homologous to a virulence locus of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 173, 7283-7292 (1991).
8. Suerbaum, S., Josenhans, C., Labigne, A.: Cloning and genetic
30 characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flab*

flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange, *J. Bacteriol.* 175, 3278-3288 (1993).

REVENDICATIONS

1. Utilisation pour la détection *in vitro* d'une infection par H.pylori dans un échantillon de fluide biologique prélevé chez un patient, d'une souche bactérienne recombinante d'Helicobacter pylori ayant un phénotype aflagellé résultant de la mutation par substitution, addition et/ou délétion de bases ou d'un fragment nucléotidique dans la séquence nucléotidique du gène flbA participant à la régulation de la biosynthèse des protéines des flagelles de H. pylori, ladite séquence nucléotidique du gène flbA hybridant de façon spécifique avec une sonde correspondant à un fragment de nucléotides de H. pylori amplifié à l'aide des deux oligonucléotides dégénérés répondant aux séquences suivantes: OLFlba-1:
ATGCCTTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG et OLFlba-2:
GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC, ou s'hybridant de façon spécifique avec ces oligonucléotides lorsque l'hybridation est réalisée à 42°C en présence de 50% Formamide dans un tampon 2XSSC contenant 0,1% SDS et les lavages réalisés avec 2XSSC plus 0,1% SDS à 68°C, et ladite mutation étant telle que, soit le gène flbA n'est plus exprimé dans ladite souche bactérienne recombinante, soit le gène flbA ne permet pas la synthèse des flagelles de H. pylori.
2. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle la souche bactérienne recombinante est caractérisée en ce que le phénotype aflagellé résulte de la mutation dans la séquence nucléotidique du gène flbA dont la séquence non mutée répond à l'enchaînement nucléotidique ou code pour la protéine répondant à la séquence aminée représentée à la Figure 2.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans laquelle la souche bactérienne recombinante est caractérisée en ce qu'elle est en outre dépourvue de la protéine du crochet de H. pylori.

4. Souche bactérienne recombinante, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par mutation, par substitution, addition et/ou délétion de bases ou d'un fragment nucléotidique dans la séquence nucléotidique du gène flbA participant à la régulation de la biosynthèse des protéines des flagelles de H. pylori, ladite séquence hybridant de façon spécifique avec une sonde correspondant à un fragment de nucléotides de H. pylori amplifié à l'aide des deux oligonucléotides dégénérés suivants: OLFlba-1:

ATGCCTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG et OLFlba-2:

GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC, ou s'hybridant de façon

10

spécifique avec ces oligonucléotides lorsque l'hybridation est réalisée à 42°C en présence de 50% Formamide dans un tampon 2XSSC contenant 0,1% SDS et les lavages réalisés avec 2XSSC plus 0,1% SDS à 68°C, et ladite mutation étant telle que, soit le gène flbA n'est plus exprimé dans ladite souche bactérienne recombinante, soit le gène flbA ne permet pas la synthèse des flagelles de H. pylori, ladite mutation étant effectuée dans la souche N6 déposée à la NCIMB le 26 juin 1992 sous le numéro NCIMB 40512.

5. Souche bactérienne recombinante selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'il s'agit de la souche N6flbA - , déposée à la NCIMB le 30 juin 1995 sous le numéro NCIMB 40747.

20

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, dans laquelle la souche bactérienne est caractérisée en ce qu'elle est en outre mutée de façon à produire une uréase atténuée, voire à ne plus produire d'uréase.
7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que la mutation conduisant à une uréase atténuée, voire à ne plus produire d'uréase consiste en une mutation de la séquence nucléotidique d'un ou plusieurs

gènes choisis parmi les gènes ureA, ureB, ureC, ureD, ureE, ureF, ureG, ureH et ureI.

8. Souche bactérienne recombinante selon la revendication 4 ou 5, caractérisée en ce qu'elle est en outre mutée de façon à produire une uréase atténuée, voire à ne plus produire d'uréase.
9. Souche bactérienne selon la revendication 8, caractérisée en ce que la mutation conduisant à une uréase atténuée, voire à ne plus produire d'uréase, consiste en une mutation de la séquence nucléotidique d'un ou plusieurs gènes choisis parmi les gènes ureA, ureB, ureC, ureD, ureE, ureF, ureG, ureH et ureI.
10. Utilisation pour la détection *in vitro* d'une infection par H.pylori dans un échantillon de fluide biologique prélevé chez un patient, d'un extrait bactérien caractérisé en ce qu'il s'agit d'un extrait de souches bactériennes définies dans l'une quelconque des revendications 1 à 3 et 6 à 7 ou telles que définies dans l'une quelconque des revendications 4, 5, 8 et 9.
11. Utilisation selon la revendication 10 d'un extrait bactérien, ledit extrait étant caractérisé en ce qu'il est obtenu après une extraction au N-OctylGlucoside.
12. Utilisation selon la revendication 10 d'un extrait bactérien, ledit extrait étant caractérisé en ce qu'il est obtenu après une extraction au PBS ou à la glycine.
13. Extrait bactérien caractérisé en ce qu'il s'agit d'un extrait de souches bactériennes selon la revendication 4 ou 5.
14. Extrait bactérien selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il est obtenu après une extraction au N-OctylGlucoside.

15. Extrait bactérien selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il est obtenu après une extraction au PBS ou à la glycine.
16. Procédé de détection in vitro d'une infection par H. pylori dans un échantillon de fluide biologique prélevé chez un patient, comprenant les étapes de:
 - mise en contact de l'échantillon testé avec une souche bactérienne définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 9, ou avec un extrait bactérien défini dans l'une quelconque des revendications 10 à 15,
 - détection d'une réaction immunologique entre ladite souche bactérienne ou ledit extrait bactérien et des anticorps dirigés contre H. pylori, présents dans l'échantillon testé.
17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'échantillon de fluide biologique est un échantillon de sérum.
18. Utilisation pour l'obtention d'anticorps contre H. pylori, d'une souche bactérienne définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 9, ou d'un extrait bactérien défini dans l'une quelconque des revendications 10 à 15.
19. Utilisation selon la revendication 18 pour la préparation d'une composition vaccinnante pour l'obtention d'anticorps protecteurs contre une infection par H. pylori.
20. 20. Sérum polyclonal dirigé contre une souche de H. pylori selon la revendication 4 ou 5.
21. Utilisation pour la détection in vitro d'une infection par H. pylori dans un échantillon biologique, d'une composition comprenant à titre de principe actif un sérum polyclonal obtenu contre une souche de H. pylori de phénotype

aflagellé définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 7 et un excipient.

22. Coffret de diagnostic pour détecter la présence d'anticorps chez des patients infectés par H. pylori comprenant une souche bactérienne définie dans l'une des revendications 1 à 7 ou un extrait bactérien défini dans l'une quelconque des revendications 10 à 12, et des réactifs nécessaires pour mettre en évidence une réaction de type antigène/anticorps.

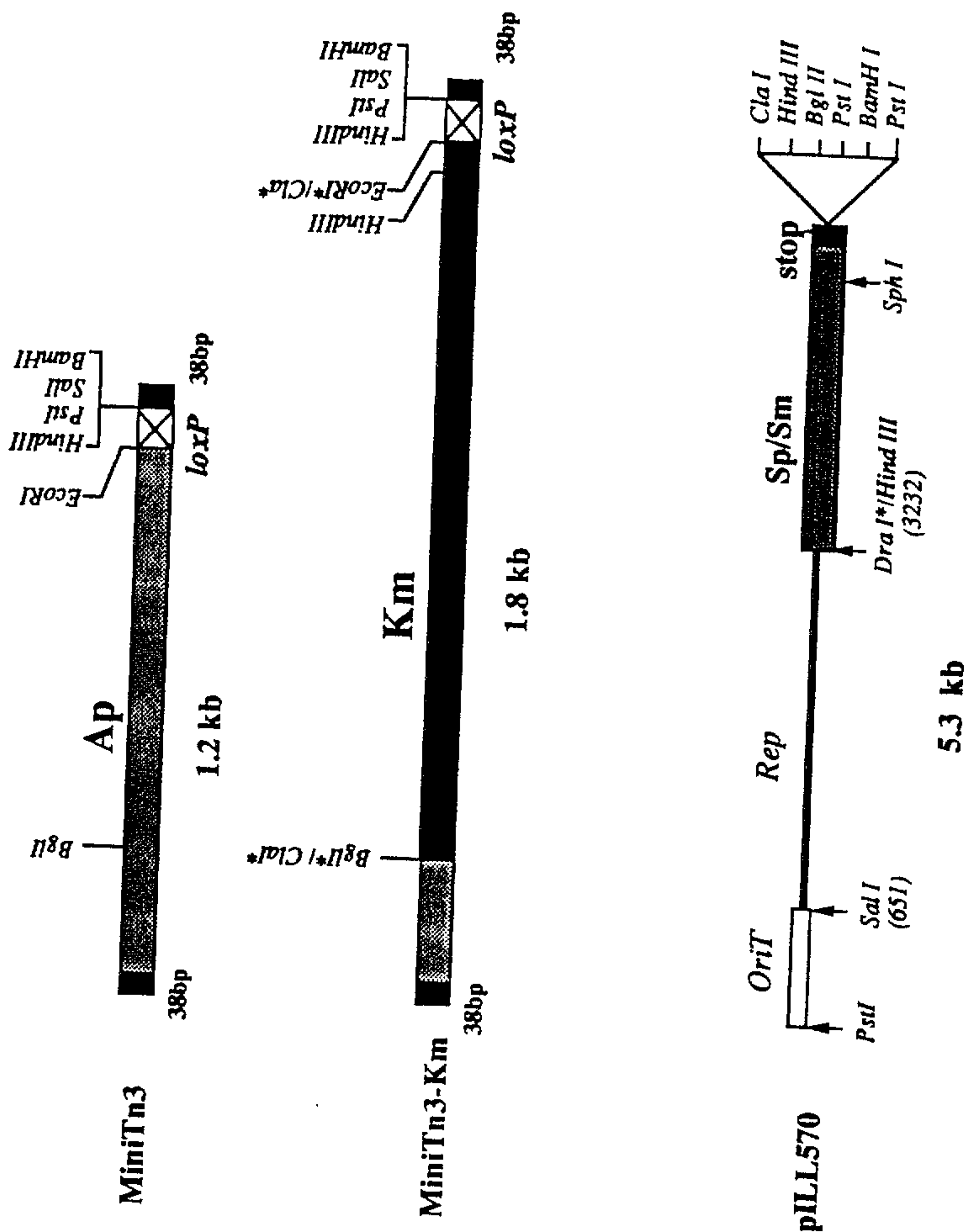


FIGURE 1A

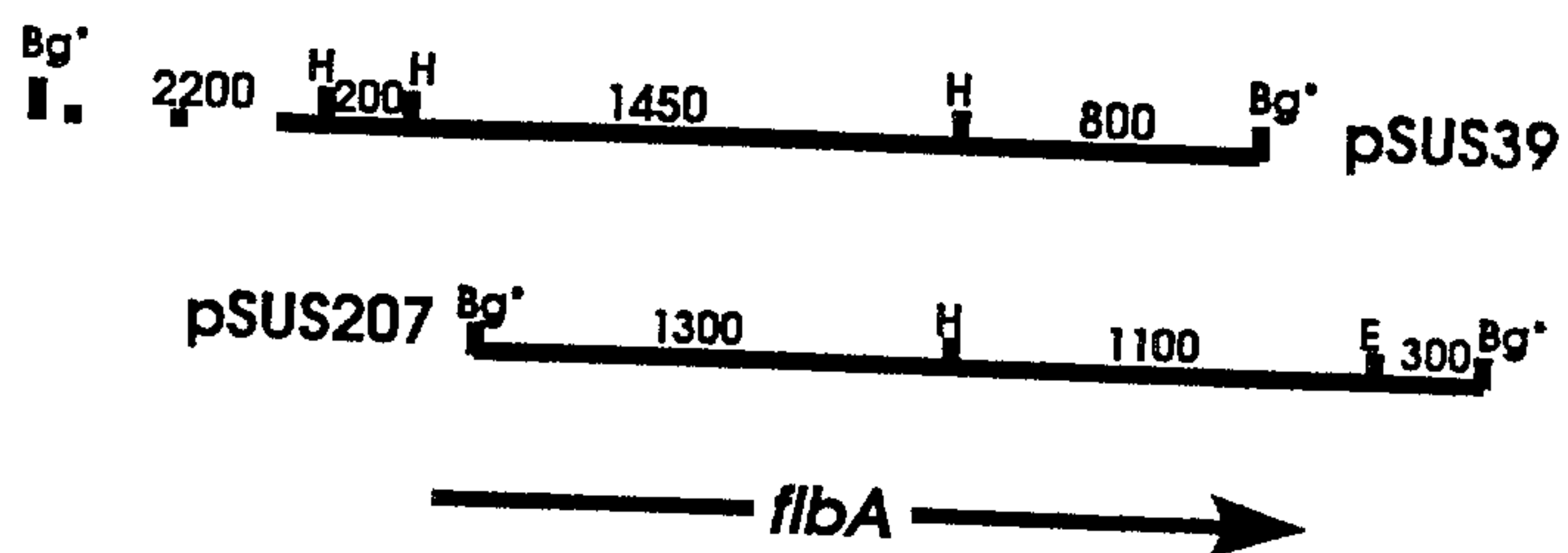


FIGURE 1B

1
 AGC TTT TTT GTG CCA TAC TTT TAA ACT TTA TAT TAT AAT AAG AGA CAA ACA CAC CTA CCA
 31
 61
 AAA TTA AGG CAT TGA TTT TAG ATT ATG GCA AAC GAA CGC TCC AAA TTA GCT TTT AAA AAG
 M A N E R S K L A F K K
 91
 121
 ACT TTC CCT GTC TTT AAA CGC TTC TTG CAA TCC AAA GAC TTA GCC CTT GTG GTC TTT GTG
 T F P V F K R F L Q S K D L A L V V F V
 151
 181
 ATA GCG ATT TTA GCG ATC ATT ATC GTG CCG TTA CCG CCT TTT GTG TTG GAT TTT TTA CTC
 I A I L A I I I V P L P P F V L D F L L
 211
 241
 ACG ATT TCT ATC GCG CTA TCG GTG TTG ATT ATT TTA ATC GGG CTT TAT ATT GAC AAA CCG
 T I S I A L S V L I I L I G L Y I D K P
 271
 301
 ACT GAT TTT AGC GCT TTC CCC ACT TTA TTA CTC ATT GTA ACC TTA TAC CGC TTG GCT TTA
 T D F S A F P T L L L I V T L Y R L A L
 331
 361
 AAT GTC GCC ACC ACT AGA ATG ATT TTA ACC CAA GGC TAT AAA GGG CCT AGC GCG GTG AGC
 N V A T T R M I L T Q G Y K G P S A V S
 391
 421
 ATT ATT ATC ACG GCG TTT GGG GAA TTT AGC GTG AGC GGG AAT TAT GTG ATT GGG GCT ATT
 I I I T A F G E F S V S G N Y V I G A I
 451
 481
 ATC TTT AGT ATT TTA GTG CTG GTG AAT TTA TTA GTG GTT ACT AAT GGT TCT ACT AGG GTT
 I F S I L V L V N L L V V T N G S T R V
 511
 541
 ACT GAA GTT AGG GCG CGA TTT GCC CTA GAC GCT ATG CCA GGA AAG CAA ATG GCG ATT GAT
 T E V R A R F A L D A M P G K Q M A I D
 571
 601
 GCG GAT TTA AAT TCA GGG CTT ATT GAT GAT AAG GAA GCT AAA AAA CGG CGC GCC GCT CTA
 A D L N S G L I D D K E A K K R R A A L
 631
 661
 AGC CAA GAA GCG GAT TTT TAT GGT GCG ATG GAT GGC GCG TCT AAA TTT GTC AAA GGC GAT
 S Q E A D F Y G A M D G A S K F V K G D
 691
 721
 GCG ATC GCT TCT ATC ATT ATC ACG CTT ATC AAT ATC ATT GGG GGT TTT TTA GTG GGC GTG
 A I A S I I I T L I N I I G G F L V G V
 751
 781
 TTC CAA AGG GAT ATG AGC TTG AGC TTT AGT GCT AGC ACT TTC ACT ATC TTA ACC ATT GGC
 F Q R D M S L S F S A S T F T I L T I G
 811
 841
 GAT GGG CTT GTA GGG CAA ATC CCT GCC TTA ATC ATT GCG ACA CGG ACC GGT ATT GTC GCC
 D G L V G Q I P A L I I A T R T G I V A
 871
 901
 ACT CGC ACC ACG CAA AAC GAA GAA GAG GAC TTT GCT TCT AAG CTC ATC ACA CAG CTC ACC
 T R T T Q N E E E D F A S K L I T Q L T
 931
 961
 AAT AAA AGC AAA ACT TTA GTG ATT GTG GGG GCG ATT TAT TGC TTT TGC ACC ATT CCT GGA
 N K S K T L V I V G A I Y C F C T I P G
 991
 1021
 CTC CCT ACC TTT TCT TTA GCG TTT GTA GGG GCT CTC TTT TTA TTC ATC GCA TGG CTG ATT
 L P T F S L A F V G A L F L F I A W L I
 1051
 1081
 AGC AGG GAG GGA AAG GAC GGG TTG CTC ACT AAA TTA GAA AAT TAT TTG AGT CAA AAA TTC
 S R E G K D G L L T K L E N Y L S Q K F
 1111
 1141
 GGC TTG GAT TTG AGC GAA AAA CCC CAC AGC TCC AAA ATC AAA CCC CAC GCC CCC ACC ACA
 G L D L S E K P H S S K I K P H A P T T
 1171
 1201
 AGG GCT AAA ACC CAA GAA GAG ATT AAA AGA GAA GAA GAG CAA GCC ATT GAT GAA GTG TTA
 R A K T Q E E I K R E E E Q A I D E V L
 1231

FIGURE 2A

4 / 17

1261 AAA ATT GAA TTT TTA GAA TTG GCT TTA GGC TAT CAG CTC TAC AGC TTA GCG GAC ATG AAA
 K I E F L E L A L G Y Q L Y S L A D M K
 1321 CAA GGG GGC GAT TTG TTA GAA AGG ATT AGG GGT ATT AGA AAA AAG ATA GCG AGC GAT TAT
 Q G G D L L E R I R G I R K K I A S D Y
 1381 GGT TTT TTG ATG CCT CAA ATT AGG ATT AGG GAT AAT TTA CAA CTC CCC CCA ACG CAT TAT
 G F L M P Q I R I R D N L Q L P P T H Y
 1441 GAA ATC AAG CTT AAG GGC ATT GTG ATT GGT GAA GGC ATG GTG ATG CCG GAT AAG TTT TTA
 E I K L K G I V I G E G M V M P D K F L
 1501 GCC ATG AAT ACC GGT TTT GTG AAT AAA GAA ATT GAA GGC ATT CCT ACT AAA GAG CCG GCT
 A M N T G F V N K E I E G I P T K E P A
 1561 TTT GGA ATG GAC GCT TTA TGG ATT GAA ACT AAA AAT AAA GAA GAA GCC ATC ATT CAA GGC
 F G M D A L W I E T K N K E E A I I Q G
 1621 TAT ACC ATT ATT GAT CCA AGC ACC GTT ATT GCG ACG CAC ACC AGC GAA TTA GTG AAA AAA
 Y T I I D P S T V I A T H T S E L V K K
 1681 TAC GCT GAA GAT TTT ATC ACT AAA GAT GAA GTG AAA TCC CTT TTA GAG CGC TTG GCC AAA
 Y A E D F I T K D E V K S L L E R L A K
 1741/581 GAC TAT CCT ACG ATT GTA GAA GAG AGT AAA AAA ATC CCC ACC GGT GCG ATC CGA TCA GTC
 D Y P T I V E E S K K I P T G A I R S V
 1801 TTG CAA GCC TTG TTG CAT GAA AAA ATC CCC ATT AAA GAC ATG CTC ACT ATT TTA GAA ACG
 L Q A L L H E K I P I K D M L T I L E T
 1861 ATT ACC GAT ATT GCG CCA TTA GTT CAA AAC GAT GTG AAT ATC TTA ACC GAA CAA GTG AGG
 I T D I A P L V Q N D V N I L T E Q V R
 1921 GCG AGG CTT TCT AGG GTG ATC ACT AAC GCT TTT AAA TCT GAA GAC GGG CGT TTG AAA TTT
 A R L S R V I T N A F K S E D G R L K F
 1981 TTA ACC TTT TCT ACC GAT AGC GAA CAA TTT TTG CTT AAT AAA TTG CGA GAA AAT GGC ACT
 L T F S T D S E Q F L L N K L R E N G T
 2041 TCT AAG AGC CTA CTA CTC AAT GTG GGC GAA TTG CAA AAA CTC ATT GAA GCG GTC TCT GAA
 S K S L L L N V G E L Q K L I E A V S E
 2101 GAG GCC ATG AAA GTC TTG CAA AAA GGG ATC GCT CCG GTG ATT TTG ATC GTA GAG CCT AAT
 E A M K V L Q K G I A P V I L I V E P N
 2161 TTA AGA AAA GCC CTT TCT AAT CAA ATG GAG CAG GCT AGG ATT GAT GTA ATC GTG CTA AGC
 L R K A L S N Q M E O A R I D V I V L S
 2221 CAT GCT GAA TTA GAT CCT AAC TCT AAT TTT GAA GCC TTA GGC ACG ATC CAT ATT AAC TTT
 H A E L D P N S N F E A L G T I H I N F
 2281 TAA GGG ATA AAT AAT TGA TAA AAA AGG AGA ATG ATG CAA GTT TAT CAC CTT TCA CAC ATT
 *
 2341
 2371 GAT TTA GAC GGC TAT GCA TGC CAG CTT GTT TCA AAA CAA TTT TTT AAA AAT ATC CAA TGC
 2401
 2431 TAT AAC GCT AAT TAC GGG CGT GAA GTC TCA GCG AGA ATT TAT GAG ATT TTA AAC GCG ATC
 2461
 2491 GCT CAA TCT AAA GAG AGT GAA TTC CTT ATT TTG ATT AGC GA

FIGURE 2B

1 MANERS-KLAFKTFPVFKRFLOSKDLALVVFVIAILAIIVPLPPFVLDLFLLTISIALS HpFlba
 1 MAKNKIVDLVFPFLGPLIAPVLKAKSLTIVGFLVCILAIIVPLPSPILDFFLALSIALS CjFlba
 1 MADAAAPNASSMPSAKSLLDGLMRGEMGLALGVVGIIIVLLIIPVPAPLLDVLLAISLTGS CcFlbF
 1 -----MNPHDLEWLNRIKERKDIMLAVLLAVVFMVLPPLPLVDILIAVNMTIS YpLcrD
 1 -----MLLSLLNSARLRPELLILVLMVMIISMFIPLPTYLVDFLIALNIVLA StInva
 1 -----MVMIIAMLIPLPTYLVDFLIIGNIVLA SfmXia
 . . . *
 60 VLIILIGLYIDKPTDFSAPFTLLLVTLVRLALNVATTRMILTQGYKGPSAVSIIITAFG HpFlba
 61 VLIILISIIYIPKPTDLTFTPTLILITLFRSLNIAATTRMILSEGQNGPEAVSEIIAAGF CjFlba
 61 VLILMTAILIKKPLEFTSFPTVLLVTTLFRGLNIASTRILSHGQEGTGAGAVIEAFG CcFlbF
 52 VVLLMIAIYINSPLQFSAPPAVLLVTTLFRLLSVSTTRMILLQ-----ADAGQIVYTFG YpLcrD
 49 ILVFMGSFYIDRILSFSTFPAVLLITLFRLLSVSTTRMILLQ-----DAGEIITAFG StInva
 29 ILVFMGSFYIERILSFSTFPAVLLITLFRLLSVSTTRMILLQ-----IITTFG SfmXia
 . . . *
 120 EFSVSGNYVIGAIIFSILVLVNLVVTNGSTRVTEVRARFALDAMPKGQMAIDADLNSGL HpFlba
 121 EFVVGGMVIGVIVFCILVLINFMVVTGSTRVSEVQARFTLDAMPKGQMAIDADLNSGL CjFlba
 121 HLMMQGNFVIGVIVFIILIVNFMVVTGSGRIAEVAARFTLDAMPKGQMAIDADLNSGL CcFlbF
 107 NFVVGGMNIVGIVIFLIITIVQFLVITKGSERVAEVSARFSLDAMPKGQMSIDGDMRAGV YpLcrD
 104 QFVIGDSLAVGFVFSIVTVVQFIVITKGSERVAEVAARFSLDAMPKGQMSIDADLKAGI StInva
 84 QFVIGDSLAVGFVFSIVTVVQFIVITKGSERVAEVAARFSLDAMPKGQMSIDADLKAGI SfmXia
 . . . *
 180 IDDKEAKKRRALSQEADFYGAMDGASKFVKGDALIASIIITLINIIGGFLVGVFQORDMSL HpFlba
 181 IDEQTARARRQEVIAEAFYGAMDGSSKFIKGDVAGIIITINIIGGFLIGSFQHDMAI CjFlba
 181 ISQDEAKIRREKELEQESTFFGAMDGASKFVKGDALIASIIITAINIIGGIIIGVVQHKMPF CcFlbF
 167 IDVNEARERRATIEKESQMFSGMDGAMKFKGDALIASIIIFVNILGGVTIGVTQKGLAA YpLcrD
 164 IDADAARERRSVLERESQLYGSFDGAMKFIKGDALIASIIIFVNIFIGGISVGMTRHGMDL StInva
 144 IDAAGAKERRSILERESQLYGSFDGAMKFIKGDALIASIIIFVNILGGISVGMSSQHGMSL SfmXia
 . . . *
 240 SFSASTFTILTIGDGLVQIPALIIATRTGIVATRTTQNEEEDFASKLITQLTNKSCTLV HpFlba
 241 SDAASTYTILTIGDGLVSIQIPGLITSTATAIIITRASKDEENFAEGTLTQLLSEYRTLLI CjFlba
 241 GDAASTYTITIGDGLVSIQIPALIIISIAAGMVVSKAGVEGSADKALTQLAMNPVGLGMV CcFlbF
 227 AEALQLYSILTVGDGMVSQVPALLIAITAGIIVTRVSSSEDSSDLGSDIGKQVVAQPKAML YpLcrD
 224 SSALSTYTMTLTIGDGLVAQIPALLIAISAGFIVTRVNGDTDN-MGRNIMTQLLNNPFVLV StInva
 204 SGALSTYTILTIGDGLVSIQIPALLISISAGFMLTRVNGDSDN-MGRNIMSQIFGNPFVLI SfmXia
 . . . *
 300 IVGAIYC-FCTIPGLPTFSLAFVGFALFLFIWALISREGKDGLLTLENYLSQKFGDLSE HpFlba
 301 VGFVLF-I-FALVPGLPTLSLGFALVFLSLGYLTKQVKEGKI-----DITTVKKSAPSA CjFlba
 301 SASSG-I-IALIPGMPIFPFAAMALA-----AGALAY CcFlbF
 287 IGGVLLLLFGLIPGFPTVTFILALLVCGGYMLSRKQSRNDEANQDLQSILTSFGSGAPA YpLcrD
 283 VTAILTISMGTLPGFPLPVFVILSVVLSVLFYFKFREAKRSAAPKTSKGEQPLSIEEKE StInva
 263 VTSALALAIGMLPGFPFVFLIAVTLTALFYKVKVVEKEKSLSESDSSGYTG----- SfmXia
 . . . *
 359 KPHSSKIKPHAPTTRAKTQEEIKREEEQAIDEVLKIEFLELALGYQLYSLADMKGQGDLL HpFlba
 355 VASQSGAGGTAAAPAKKSEEEILKEEHEKINDILKVEILELELGYGLIKLAE-----NELT CjFlba
 331 KRVQDAKKPKALDPADLEAAAPSEPEEEPIASASLAIDDVKIELGYGLLTLLINDLDGRKLT CcFlbF
 347 ARTKAKTSGANKGRLGEQEAFTVPLLDVDS-----SQQEALEANALN YpLcrD
 343 GSSLGLIGDLKDVSTE-----TVPLILLVPKSRREDLEKA StInva
 316 -----TFDIDNTHDSSLAMIENLDRISETVPLILLFAENKINANDME SfmXia

FIGURE 3A

419 ERIRGIRKKIASDYGFLMPQIRIRDNLQLPPTHYEIKLKGIVIGEGMVMPDKFLAMNTGF HpFlba
 411 ERIRSMRRSIAESLGFLMPKIRIRDNLRLKPNEYSFKLKGVSIAAEIYPDKYLAMDSGF CjFlba
 391 DQIRALRKTALASEYGFVMPVVRILDNMRLANQGYAIRIKEMEAGAGEVRLGCLMCMDPRG CcFlbF
 392 DELVRVRRALYLDLGVPFPGIHLRFNEGMGEGEYIISLQEVVPVARGELKAGYLLVRESVS YpLcrD
 378 QLAERLRSQFFIDYGVRLPEVLLRDGEGLDNNSIVLLINEIRVEQFTVYFD--LMRVVNY StInvA
 359 GLIERIRSQFFIDYGVRLPTILYRTSNEKVDIVLLINEVRADSFNIYFDKVCITDENG SfmXia
 * * * * *
 479 VNKEIEGIPTKEPAF--GMDALWIETKNKEEAIIOGYTIIDPSTVIATHTSELVKKYAED HpFlba
 471 ITEEIEGIATKEPAF--NSDALWIDANLKDEATLNGYIVIDPASVISTHMSSELIKAHASE CjFlba
 451 GQVELPGEHVREPAF--GLPATWIADDLREEATFRGYTVVDPATVLTTHLTELKENMAD CcFlbF
 452 QLELLGIPYEKGEHLLPDQEAFFVSVVEEERLEKSQLEFFSHSQVLTWHLSHVLREYAED YpLcrD
 436 SDEVVSFGINPTIHQOGSSQYFWVTHEEGEKLRELGYVLRNALDELYHCLAVTVARNVNE StInvA
 419 DIDALGIPVVSTS--YNERVISWVDVSYTENLTNIDAKIKSAQDEFYHQLSQALLNNINE SfmXia
 * * * * *
 537 FITKDEVKSLLERLAKDYPTIVEESK-KI-PTGAIRSVLQALLHEKIPKDMLTILETIT HpFlba
 529 LLTRQEVQNLLDKVKNDYPIIVEGAL-GVAPVSLIQKILKDLLKHHIPIKDMLTILESVS CjFlba
 509 LLSYAEVQKLLKELPETQKQLVDDLIPGTVTATTVQVRLQSLLRERSIRDLPQILEGVG CcFlbF
 512 FIGIQETRYLLEQMEGGYGEELIKEVQR-IVPLQRMTEILQRLVGEDISIRNMRSILEAMV YpLcrD
 496 YFGIQETKHMLDQLEAKFPDLLKEVLRH-ATVQRISEVLQRLLSERVSVRNMKLIMEALA StInvA
 477 IFGIQETKNMLDQFENRYPDLLKEVFRHV-TIQRISEVLQRLLGGENISVRNLKLIMESLA SfmXia
 * * * * *
 595 DIAPLVQNDVNILTEQVRARLSRVITNAFKSEDGRLKFLTFSTDSEQFLLNKLRENGTSK HpFlba
 588 DIAE-VSKSFDMIIEHVRAVLARMITNMYLDDKGNLDIFILDSASSAVLMENVQFRDGSY CjFlba
 569 EAAPHTA-SVTQVLEQVRARLARQLCWANRGDDGALPIITLSADWEQAFAEALIGPGDDK CcFlbF
 571 EWGQK-EKDVVQLTEYIRSSLKRYICYKYANGNNILPAYLFDQEVVEEKIRSGVRQTSAGS YpLcrD
 555 LWAPR-EKDVINLVEHIRGAMARYICHKF-ANGGELRAVMVSAEVEDVIRKGIROTSGST StInvA
 536 LWAPR-EKDVITLVEHVRASLSRYICKS-IAVSGEIKVVMLSGYIEDAIRKGIROTSGGS SfmXia
 * * * * *
 655 SLLLNVGELQKLIEAVSEEAMKVLOKGIAPVILIVEPNLRKALSNOEQARIDVIVLSHA HpFlba
 647 HLPLSVAQTGTLVDTLRAEVA AVANGRIKPFILCPEPQLRKFIADICYNFSINIVVLSFA CjFlba
 628 QLALPPSRLQDFIRGVRDSFERAALAGEAPVLL-TSPGVRPYVRSIIERFRGQTVVMSQN CcFlbF
 630 YLALEPAVTESLLEQVRKTIGDLSQIQSKP-VLIVSMDIRRYVRKLIIESEYYGLPVLSYQ YpLcrD
 613 FLSLDPEASANLMDLITLKLDDLLIAH-KDLVLLTSVDVRRFIKKMIEGRFPDLEVLSFG StInvA
 594 FLNMDIEVSDEVMTLAHALREL-RNAKKNFVLLVSVDIRRFVKRLIDNRFKSILVISYA SfmXia
 * * * * *
 715 ELDPNSNFALGTIHF
 707 EIAENTNFNTTEGIIRIEL HpFlba
 687 EIHPRARLKTVMV---- CjFlba
 689 ELTQQINIQLGRICL-- CcFlbF
 672 EIADSKSVNVIKTI---- YpLcrD
 653 EIDEAYTINVLTIKTI---- StInvA
 * SfmXia

FIGURE 3B

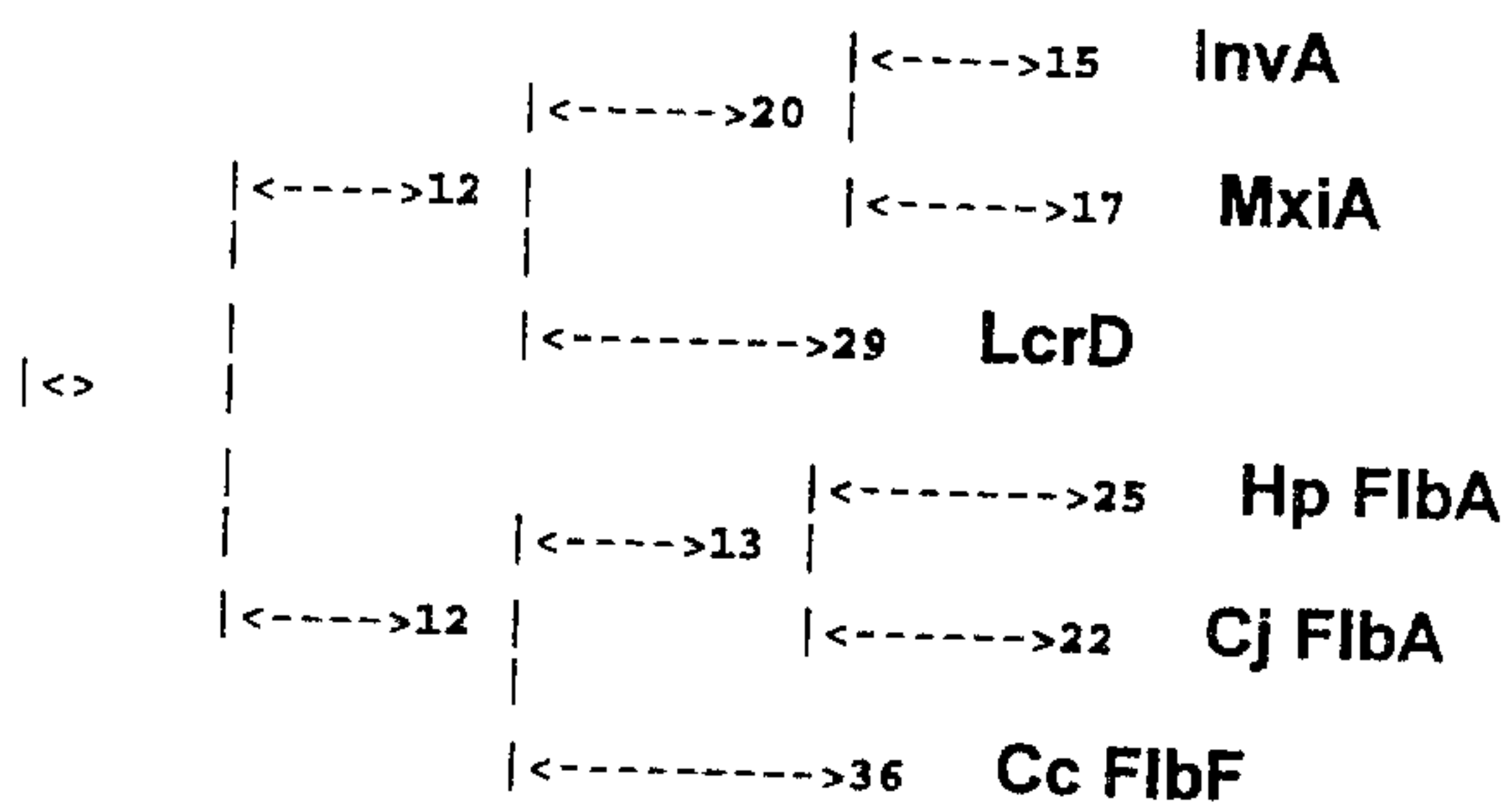


FIGURE 4

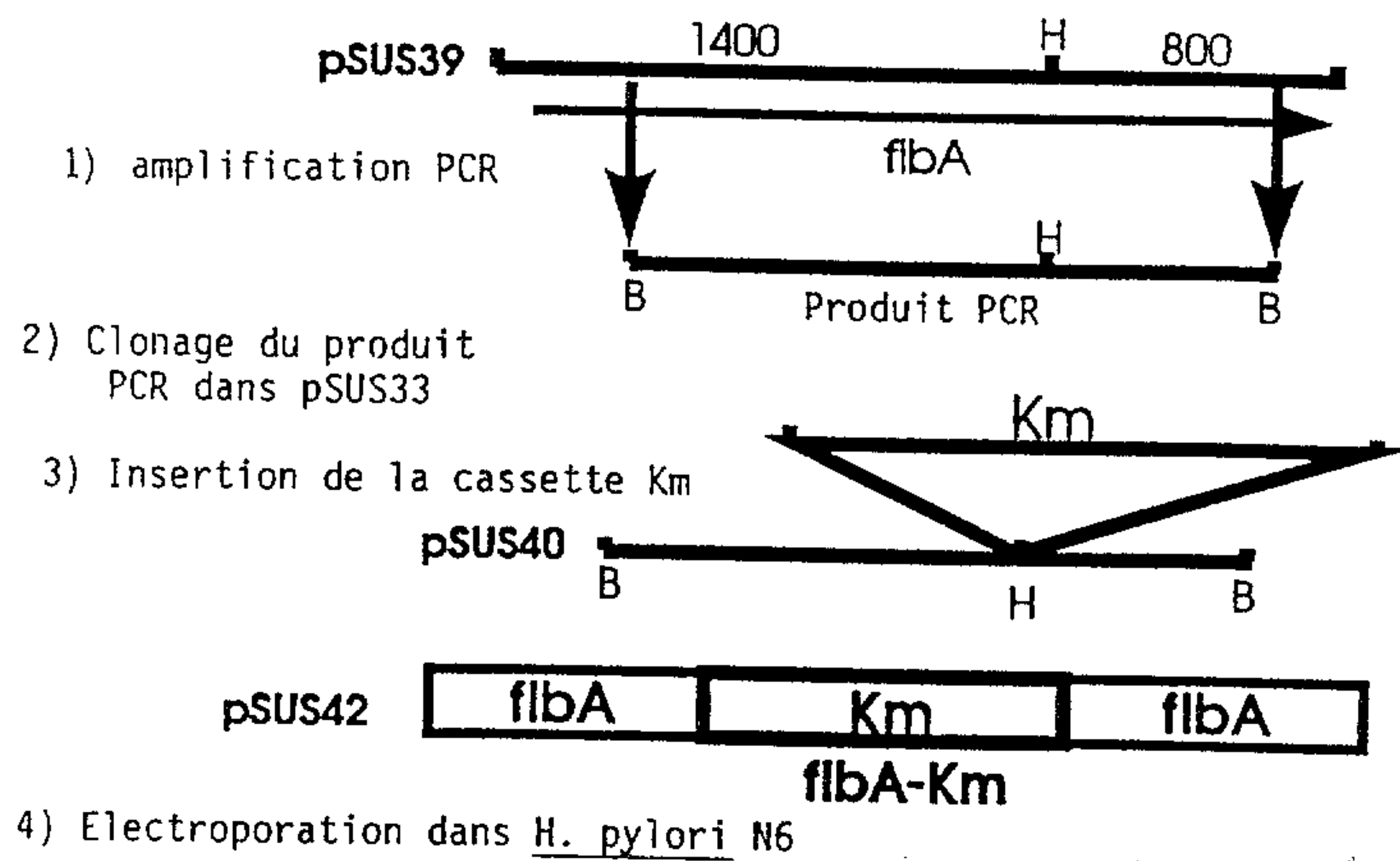


FIGURE 5

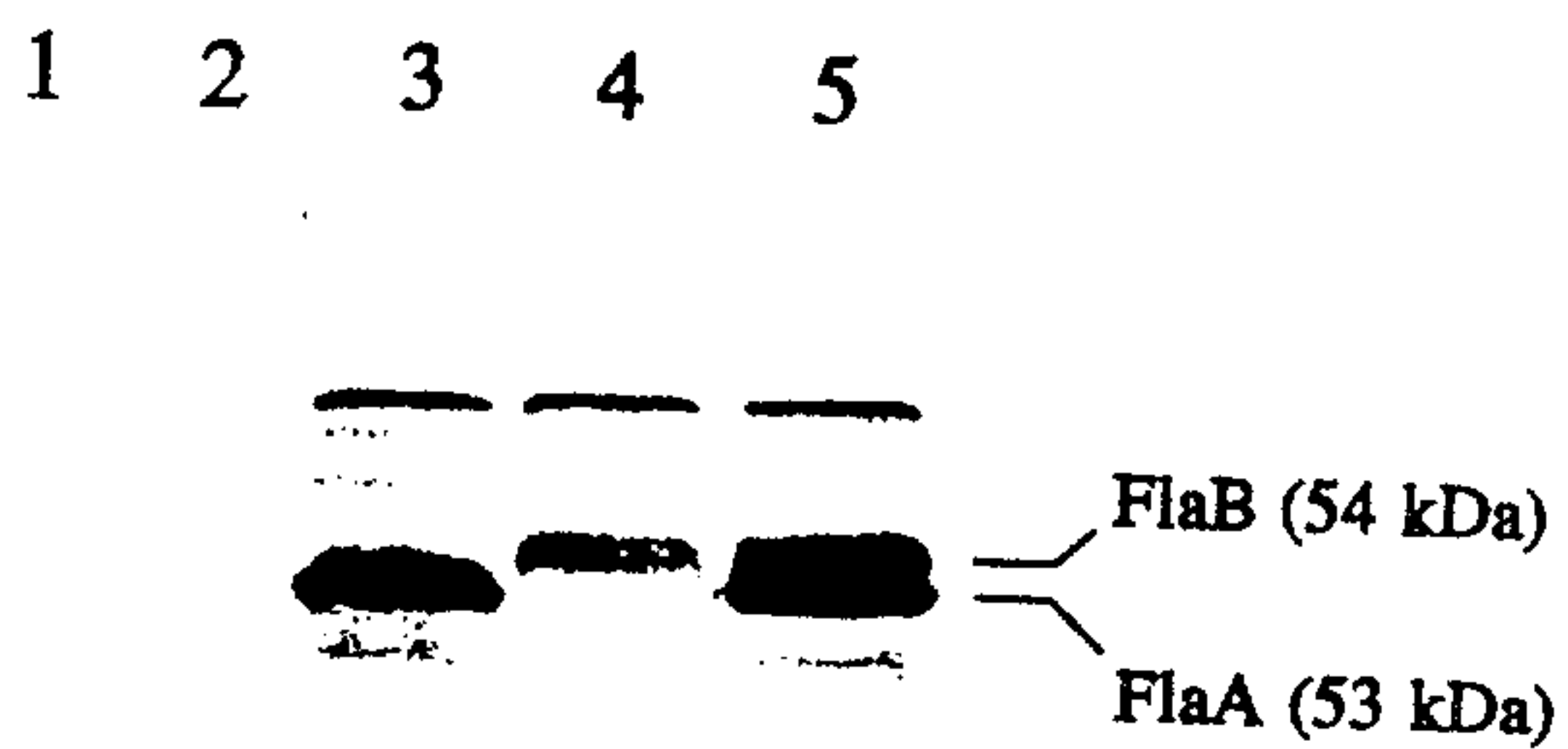


FIGURE 6

Répartition des 300 sérums FNTS vis à vis de la souche aflagellée N6f1BA-
Extraction par le N-Octyl Glucoside

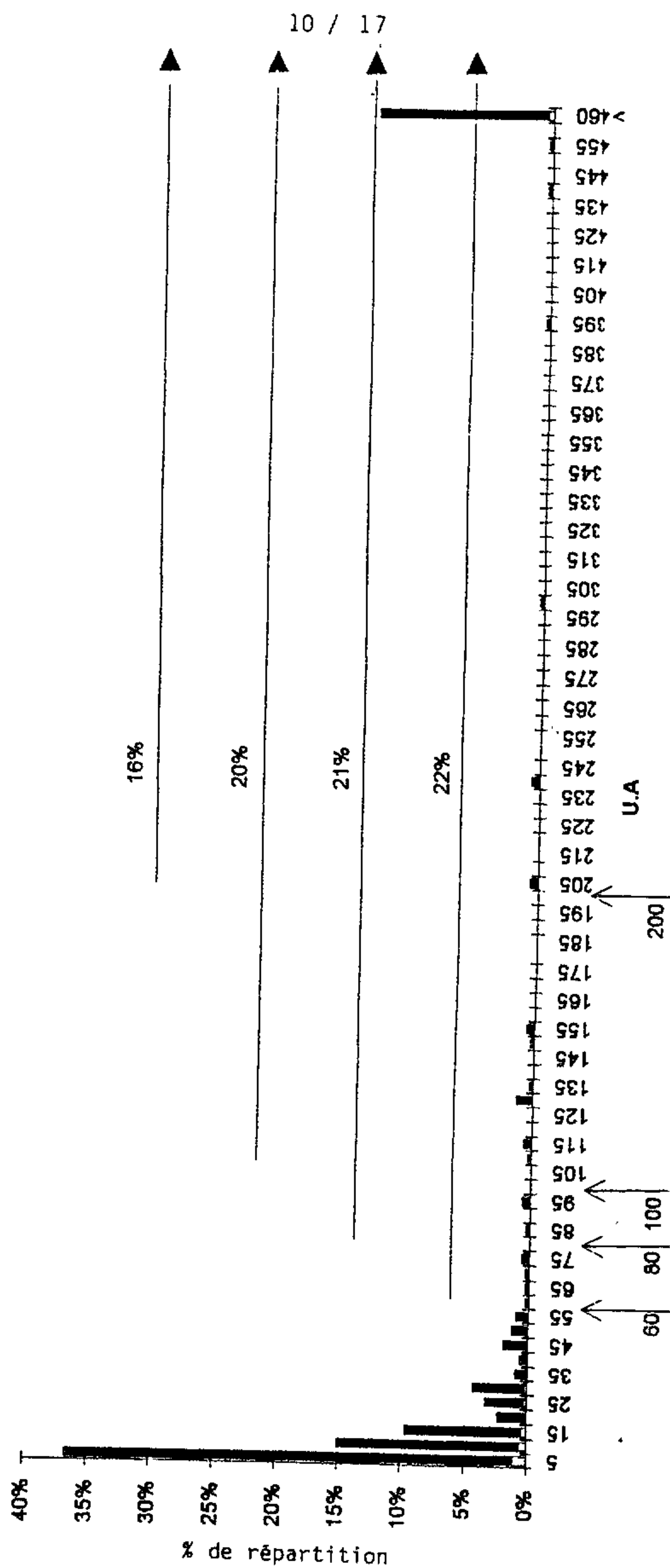


FIGURE 7

Répartition des 300 sérums FNTS vis de la souche flagellée N6
Extraction par le N-Octyl Glucoside

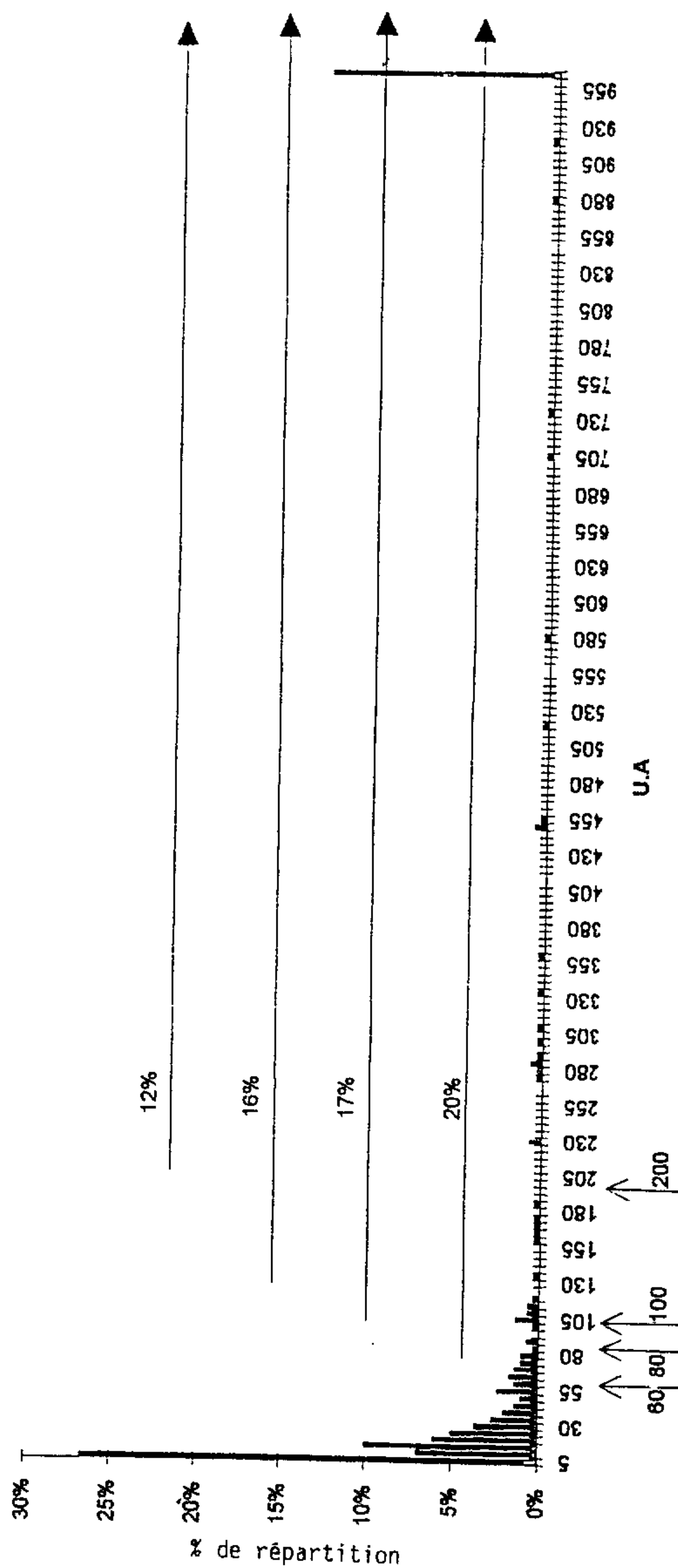


FIGURE 8

Répartition des 300 sérums FNTS vis à vis de la souche aflagellée N6FLBA -
Extraction par le PBS

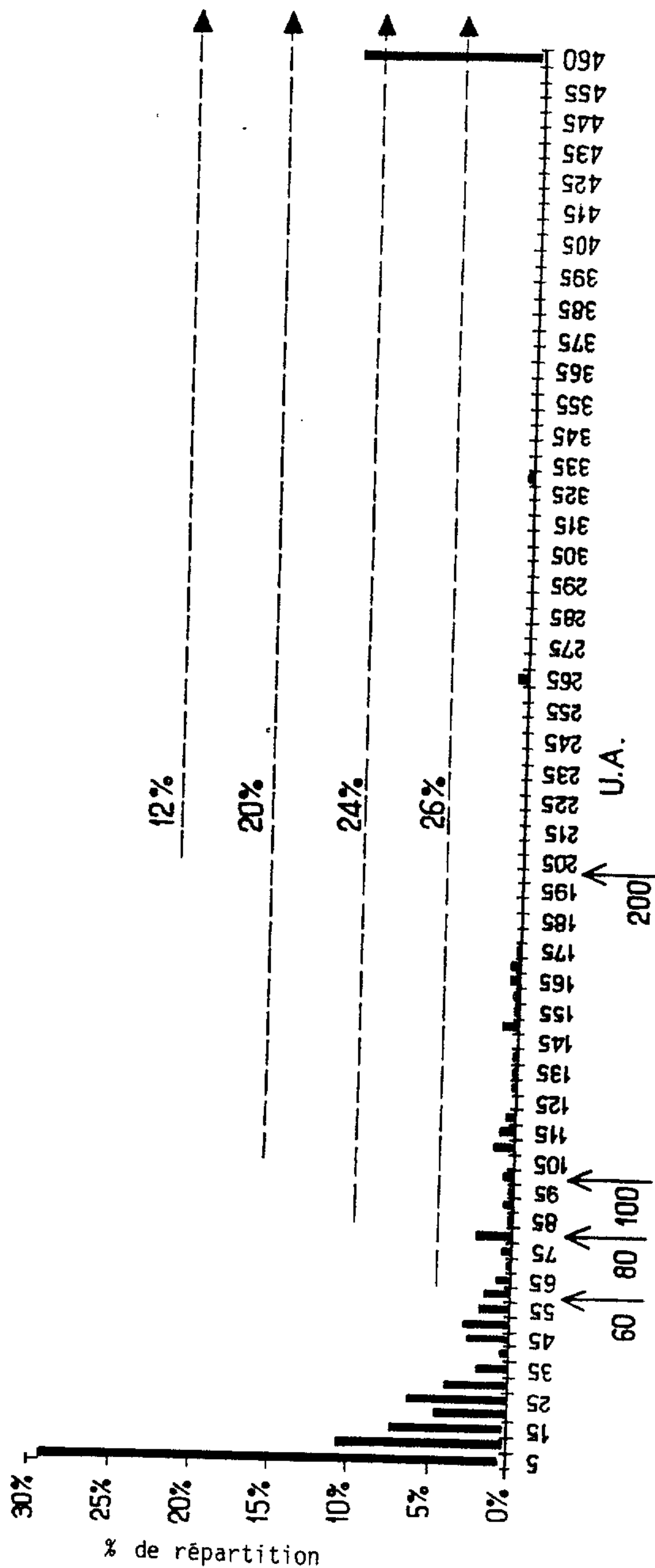


FIGURE 9

Prévalence de positivité sur 43 sérums FNTS

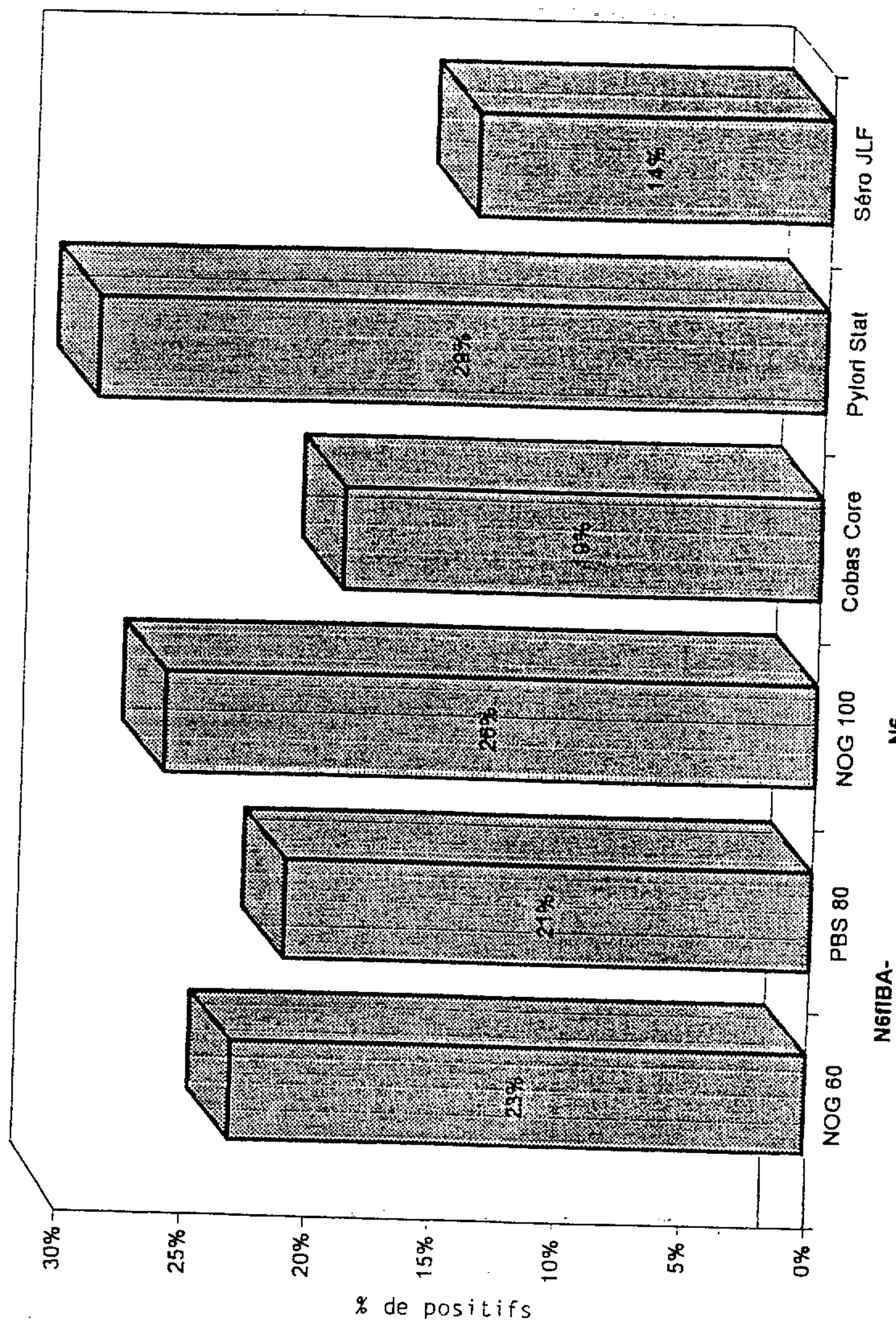


FIGURE 10

Courbe ROC de l'extrait N-Octyl Glucoside de N6fIBA-

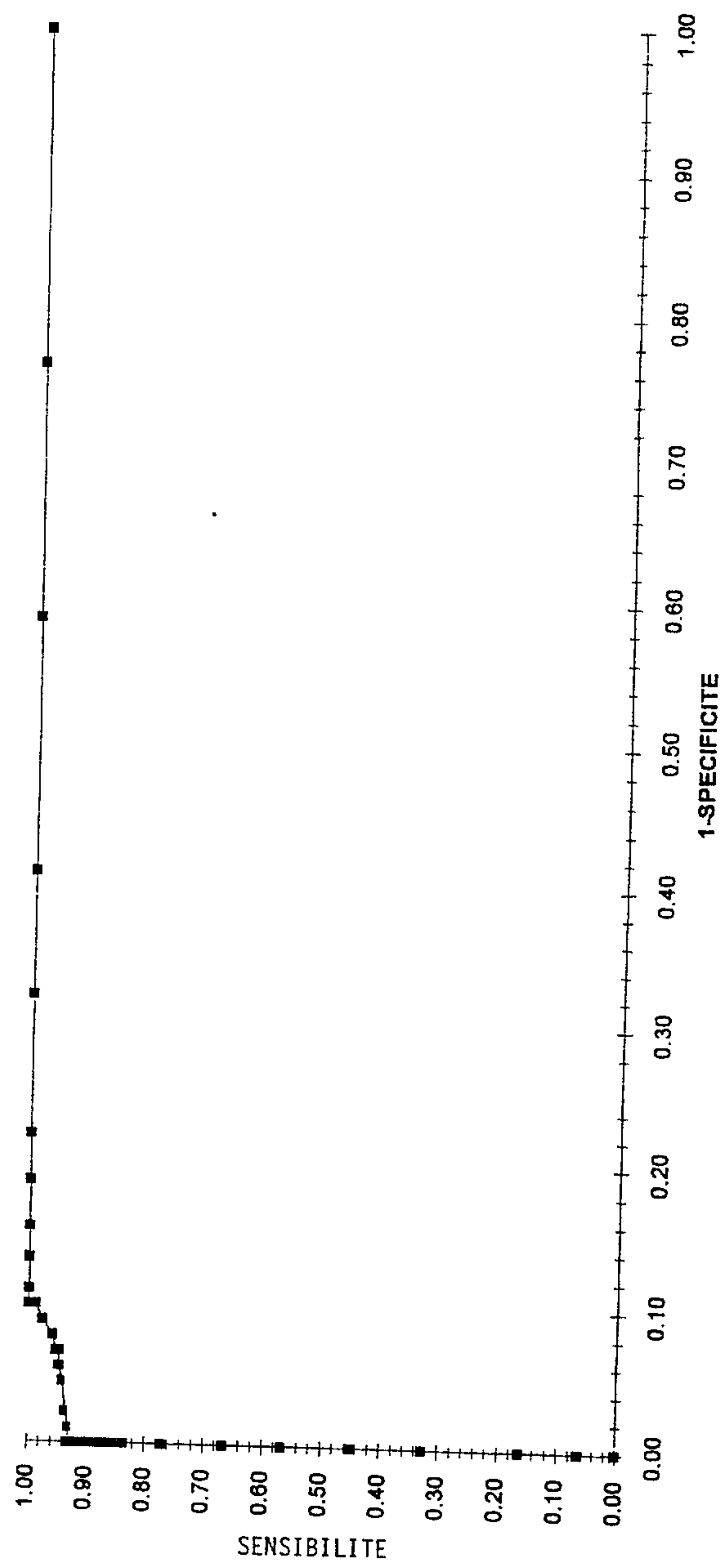
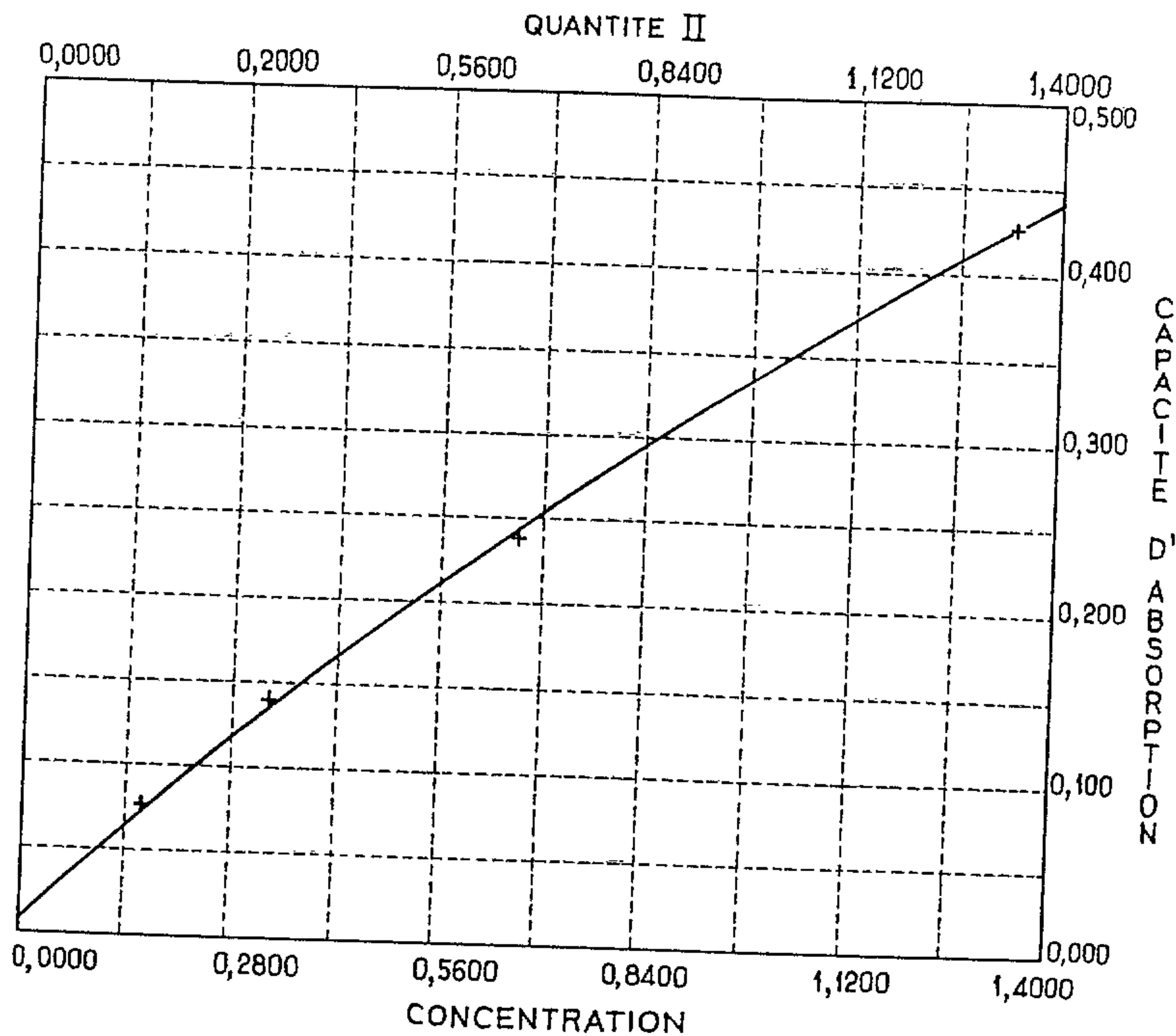
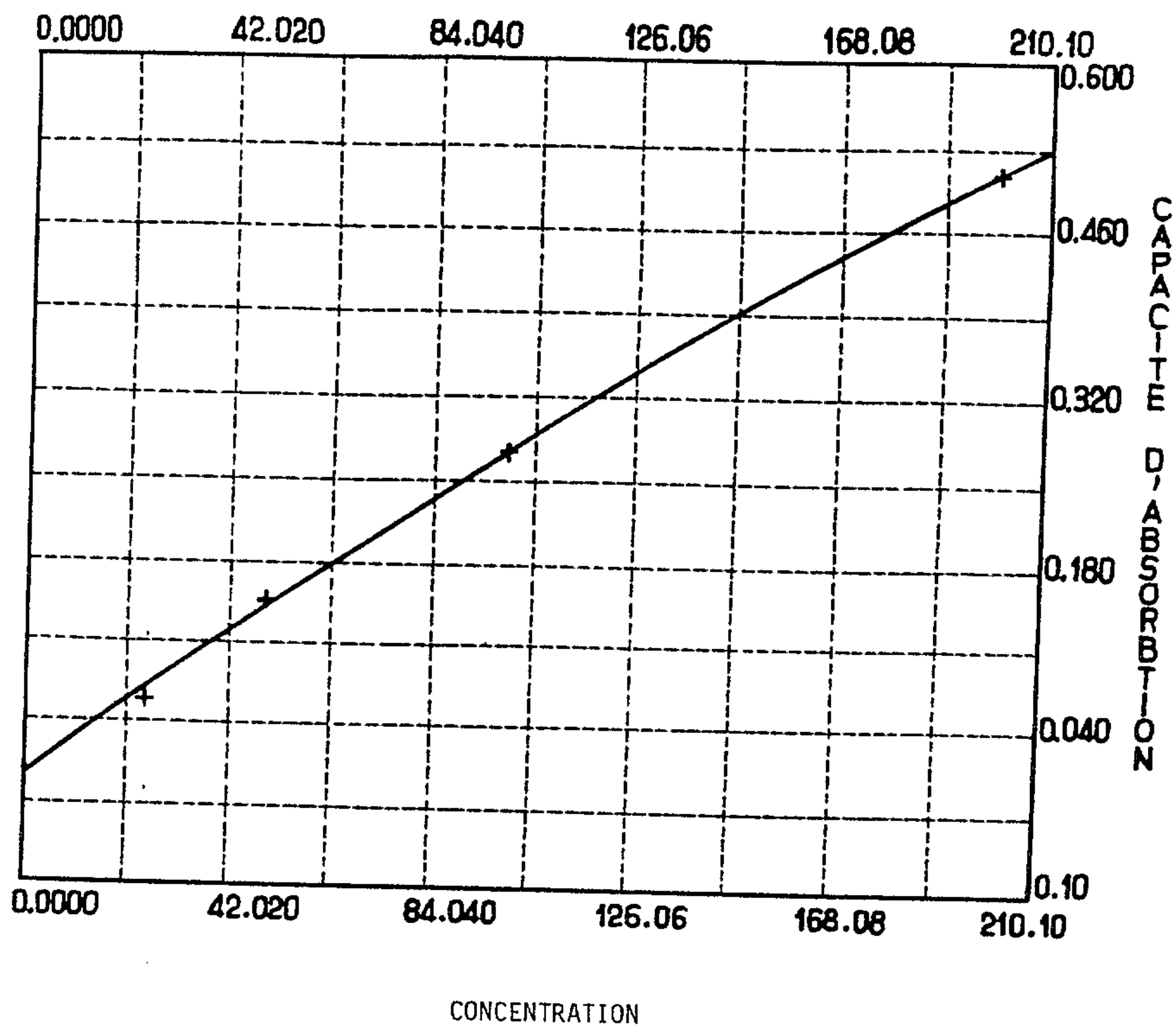


FIGURE 11

FIG. 12



Type d'extrait	DO à 750nm	concentration en mg/ml
<u>Glycine</u> (après centrifugation 15 min. à 3000g)	0,028	0,284
<u>N- Octyl Glycoside</u>	0,087	1,004
<u>Surnageant 1</u> (après 1er lavage PBS)	0,059	0,844
<u>Surnageant 2</u> (après 2ème lavage PBS)	0,015	0,1105

FIG. 13(A)

Type d'extrait	DO à 760 nm	concentration en $\mu\text{g/ml}$
<u>Glycine</u> (après centrifugation 15 min. à 3000g)	0.279	202.86
<u>N-Octyl Glucoside</u>	0.243	873.99
<u>Surnageant 1</u> (après 1er lavage PBS)	0.361	539.2
<u>Surnageant 2</u> (après 2ème lavage PBS)	0.218	77.875

Type d'extrait	DO à 760 nm	concentration en $\mu\text{g/ml}$
<u>culot Glycine</u> (après centrifugation 15 min. à 3000g)	0.099	297.5
<u>culot Glycine</u> (après extraction)	0.093	2778.7
<u>culot N-Octyl Glucoside</u> (après extraction)	0.275	972.0

FIGURE 13B