

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES  
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT



CENTRE FOR RESEARCH AND  
TRAINING IN GRADUATE STUDIES IN  
LIFE, HEALTH AND ENVIRONMENTAL  
SCIENCES

UNITE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES  
DE LA VIE

RESEARCH AND DOCTORATE  
TRAINING UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET DE TOXICOLOGIE  
LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

# Etude bio-guidée de quelques plantes médicinales du Cameroun sur quelques facteurs de pathogénicité de *Helicobacter pylori*

THESE

Présentée et soutenue comme requis partiel en vue de l'obtention du Doctorat/PhD  
en Biochimie

Spécialité: Pharmacologie Moléculaire

Par

**NGNAMEKO Corinne Raïssa**

Matricule 08R0656  
Master en Biochimie

Devant le Jury composé de

Président : **PENLAP BENG Véronique**, Professeur, Université de Yaoundé I  
Rapporteurs: **MOUNDIPA FEWOU Paul**, Professeur, Université de Yaoundé I  
**NJAYOU Frédéric Nico**, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I  
**STELLA SMITH**, Directrice de Recherche, Nigerian Institute of Medical  
Research  
Membres : **FEKAM BOYOM Fabrice**, Professeur, Université de Yaoundé I  
**KORO KORO Francioli**, Maître de Conférences, Université de Douala  
**MEZUI Christophe**, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I



Année Académique: 2019-2020

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCE DE  
LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT



CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING  
IN GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH  
AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN SCIENCE DE LA VIE

RESEARCH DOCTORATE TRAINING UNIT  
IN LIFE SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

**Etude bio-guidée de quelques plantes  
médicinales du Cameroun sur quelques  
facteurs de pathogénicité de *Helicobacter  
pylori***

THESE

Présentée et soutenue comme requis partiel en vue de l'obtention du **Doctorat/PhD en  
Biochimie**

Spécialité: **Pharmacologie Moléculaire**

Par

**NGNAMEKO Corinne Raïssa**

Matricule 08R0656

*Master en Biochimie*

Devant le Jury composé de

**Président :** **PENLAP BENG Véronique**, Professeur, Université de Yaoundé I

**Rapporteurs :** **MOUNDIPA FEWOU Paul**, Professeur, Université de Yaoundé I

**NJAYOU Frédéric Nico**, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I

**STELLA SMITH**, Directrice de Recherche, Nigerian Institut of Medical  
Research

**Membres :** **FEKAM BOYOM Fabrice**, Professeur, Université de Yaoundé I

**KORO KORO Francioli**, Maître de Conférences, Université de Douala

**MEZUI Christophe**, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I

**Année Académique: 2019-2020**

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCE DE  
LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN SCIENCE DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING  
IN GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH  
AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

RESEARCH DOCTORATE TRAINING UNIT  
IN LIFE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

## ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, Pr. MEZUI Christophe et Pr. PENLAP Véronique respectivement Examineur et Président du jury de Thèse de Doctorat/PhD en Biochimie, spécialité Pharmacologie Moléculaire, soutenue par Mme NGNAMEKO Corinne Raïssa (matricule: 08R0656) le 18 décembre 2020 à 14h dans la salle S01/02 Extension de la Faculté de Sciences de l'Université de Yaoundé I sur le thème intitulée «Etude bio-guidée de quelques plantes médicinales du Cameroun sur quelques facteurs de pathogénicité de *Helicobacter pylori*» attestons que la candidate a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

En foi de quoi la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le 14 Janvier 2021

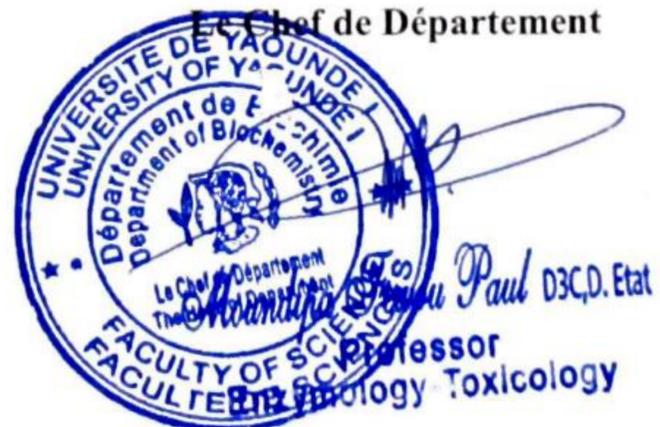
Examineur

  
Pr MEZUI  
CHRISTOPHE

Président du Jury

  
Véronique N. Penlap Beng  
Professor

Le Chef de Département



<b>UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I</b> <b>Faculté des Sciences</b> Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		<b>THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I</b> <b>Faculty of Science</b> Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>		<b>LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF</b>

**ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 12 Juin 2020**

**ADMINISTRATION**

**DOYE:** TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA:** ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DSSE:** AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC:** ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière:** NDOYE FOE Marie C. F., *Maître de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR:**  
 MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

**1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)**

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste

12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
22	EWANE Cécile Anne	Maître de Conférences	En poste

23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
25	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
26	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
27	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

**2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)**

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>
14	DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En poste
15	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste

16	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLETT EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste

28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste

44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

### 3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
---	------------------	-----------------------	----------

8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
17	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste

18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOULO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHOU Louis-Paul- Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

**4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (34)**

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé deMiss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
8	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
9	NENWA Justin	Professeur	En poste
10	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>

11	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
12	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUNBI Georges	Maître de Conférences	En poste
15	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
16	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
19	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste

20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste

27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
31	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
32	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
33	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
34	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

#### 5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NKENGFAK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste

20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste

25	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
33	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste

34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

### **6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)**

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
5	DJAM XAVIERA YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste

10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
2 5	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

### 7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>
---	---------------------	------------	---------------------------

2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes &amp; Diplômes</i>
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule
---	-------------------------------	-----------------	--------------

			MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

#### 8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	<i>En poste</i>
3	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>En poste</i>

4	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste

6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
---	---------------------------	-----------------------	----------

7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

### 9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Chef Division. UN</i>
3	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
4	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
7	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
9	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
10	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
11	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
12	WOAFO Paul	Professeur	En poste
13	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
14	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste

15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
----	----------------------	------------	----------

16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
19	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
20	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
21	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
22	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
23	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
24	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
25	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
26	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
27	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>

28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

38	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

**10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)**

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOLOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance &amp; du Matériel</i>
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste

27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

**Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I**

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (06)	3 (2)	<b>39 (18)</b>
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	<b>46 (14)</b>
BPV	06 (0)	11 (02)	9 (06)	07 (01)	<b>33 (9)</b>
CI	10 (1)	9 (02)	12 (02)	03 (0)	<b>34 (5)</b>
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	02 (0)	<b>35(7)</b>
IN	2 (0)	1 (0)	13 (01)	09 (01)	<b>25 (2)</b>
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	05 (02)	<b>30 (3)</b>
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	<b>18 (5)</b>

PHY	12 (0)	15 (02)	10 (03)	03 (0)	<b>40 (5)</b>
ST	8 (1)	14 (01)	19 (05)	02 (0)	<b>43(7)</b>
<b>Total</b>	<b>69 (4)</b>	<b>99 (28)</b>	<b>130 (33)</b>	<b>45 (10)</b>	<b>343 (75)</b>

---

Soit un total de **344 (75)** dont :

- Professeurs **68 (4)**
- Maîtres de Conférences **99 (28)**
- Chargés de Cours **130 (33)**
- Assistants **46 (10)**

( ) = Nombre de Femmes **75**

## **DEDICACE**



**Je dédie ce travail**

***A DIEU TOUT-PUISSANT***

## REMERCIEMENTS

Cette thèse constitue le couronnement d'un long processus mené par plusieurs personnes. C'est le lieu pour moi, à travers ces quelques lignes, d'exprimer ma profonde reconnaissance.

- ☞ Au **Pr MOUNDIPA FEWOU Paul**, superviseur de cette thèse, Chef de Département de Biochimie et Chef du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de l'Université de Yaoundé I. Vous m'avez accueilli dans votre équipe de recherche depuis 2012. Merci pour toute la formation scientifique reçue tout au long de ces années. Malgré vos lourdes responsabilités, vous avez suivi avec grande attention et rigueur ce travail. Recevez ici Professeur, l'expression de mes sincères remerciements.
- ☞ Au **Pr NJAYOU Frédéric Nico**, directeur de cette thèse, qui m'a donné l'opportunité de réaliser ce travail. En me faisant confiance sur ce sujet de thèse, vous m'avez donné la possibilité de développer de nombreuses collaborations et d'étendre mes capacités en recherche. Votre vision, votre esprit critique et votre rigueur ont été déterminants pour l'aboutissement de ce travail. Je vous prie de trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.
- ☞ Au **Dr Stella SMITH**, co-directeur de cette thèse, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et mis à ma disposition son énergie, sa rigueur, ses connaissances et son expérience. Je vous remercie pour vos critiques et votre savoir-faire qui ont été déterminants dans le déroulement et la finalisation de cette thèse.
- ☞ Au **Dr FOWORA** de *Nigerian Institute of Medical Research* au Nigéria pour l'accueil au sein du laboratoire et pour le soutien multiforme au cours de la réalisation d'une majeure partie de ce travail.
- ☞ Aux **Pr Maria Paola COSTI** de *l'Università degli di Modena e Reggio Emilia* en Italie,  **Davide RONCARATI et Barbara ZAMBELLI** de *l'Università di Bologna* en Italie pour l'accueil et la réalisation dans leurs différents laboratoires d'une partie de ce travail.
- ☞ Au **Pr Rainer HAAS** de *Ludwig-Maximilians University/ Max Von pettenkofer-institute for Hygiene and Medical of Munich* pour les anticorps mis à ma disposition.
- ☞ Aux **Pr NKENFACK Augustin et Pr. MKOUNGA Pierre** du Laboratoire de Substances Naturelles et de Synthèses Organiques de l'Université de Yaoundé 1 pour l'assistance et le matériel mis à ma disposition au cours de la réalisation de la partie chimique de ce travail.
- ☞ Au **Pr TCHANA Angèle** pour ses multiples conseils.

- ☞ A **tous les Enseignants** du Département de Biochimie pour la formation académique reçue.
- ☞ A **tous mes aînés de laboratoire** pour leur assistance et pour tous les conseils qu'ils m'ont prodigués pendant la réalisation de ce travail.
- ☞ A **ma mère TCHATO Julienne** pour les moyens misent à ma disposition, son amour, son soutien multiforme et ses encouragements.
- ☞ A **mon petit-frère PINDJOU Virgil Hisquia** pour son soutien et ses encouragements.
- ☞ A **tous les membres** du Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie pour les multiples conseils prodigués pendant la réalisation de ce travail et lors des séminaires de laboratoire.
- ☞ A **mon oncle Mr NOUNDJA Robert** et ma **tante Mme YOMBUEN Miliador** pour leur soutien et encouragements.
- ☞ A **Mr ZEMO NANA Flavien** pour son amour et son soutien multiforme.
- ☞ A mes amis et camarades: **SIMO Fredy, TAKUISSU Guy, TCHINDA Cédric, YOUVOP Janvier, KEUMOE Rodrigue, WAFANG Géraldine** pour les moments inoubliables partagés ensemble et tous mes camarades de promotions.
- ☞ A **tous les moniteurs de la Paroisse de Melen** pour le soutien et la prière à mon endroit.
- ☞ A **toutes les personnes** qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail et dont les noms n'ont pas été cités. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

## ORGANISMES DE FINANCEMENT

Je remercie:



- L'*International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology* (ICGEB), pour la bourse d'étude de 6 mois (N° S/CMR 16-03) qu'elle m'a octroyée dans le cadre du programme *The Arturo Falaschi Fellowship Programme*.



*Molecular biology & biotechnology laboratory of the Nigerian Institute of Medical Research* qui a bien voulu supporter les coûts liés aux manipulations lors de mon séjour au Nigéria.



**UNIMORE**  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI  
MODENA E REGGIO EMILIA

*Drugs & Disvoxy laboratory in University of Modena and Reggio Emilia, Molecular biology laboratory in University of Bologna*, qui a bien voulu m'accepter dans leur différent laboratoire pour les manipulations lors de mon séjour en Italie.

## TABLES DE MATIERES

DEDICACE.....	xvi
REMERCIEMENTS .....	xvii
ORGANISMES DE FINANCEMENT .....	xviii
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES .....	xxv
LISTE DES FIGURES .....	xxvii
LISTE DES TABLEAUX .....	xxix
RESUME.....	xxx
ABSTRACT .....	xxxii
INTRODUCTION GENERALE.....	1
1. Introduction.....	1
2. Hypothèse de recherche .....	3
3. Objectifs .....	3
3.1. Objectif général .....	3
3.2. Objectifs spécifiques .....	3
Chapitre I: Revue de la Litterature .....	4
I. Historique.....	4
II. Généralités sur l'estomac .....	5
II.1. Anatomie de l'estomac .....	5
II.2. Histologie.....	6
II.2.1. Paroi gastrique .....	7
II.2.2. Organisation générale de la muqueuse gastrique.....	8
II.3. Fonction de l'estomac.....	8
II.3.1. Protection extrinsèque .....	8
II.3.2. Protection intrinsèque .....	9
II.3.3. Facteurs de régulation de la barrière de la muqueuse.....	9
II.4. Maladies de l'estomac .....	10
II.4.1. Gastrite aiguë.....	11
II.4.2. Gastrite chronique.....	11
II.4.3. Ulcère gastroduodéal (UGD).....	11
II.4.4. Adénocarcinome gastrique .....	12
II.4.5. Lymphome du MALT .....	13
III. <i>Helicobacter pylori</i> ( <i>H. pylori</i> ) .....	13
III.1. Description de <i>H. pylori</i> .....	13

III.2. Prévalence et variabilité génétique de <i>H. pylori</i> .....	14
III.3. Facteurs de virulence majeurs de <i>H. pylori</i> .....	16
III.3.1. Adhésines de <i>H. pylori</i> .....	19
III.3.1.1. Adhésion de liaison à l'antigène de groupe sanguin A (BabA) .....	19
III.3.1.2. Système de liaison acide sialique (SabA).....	19
III.3.1.3. Adhérence associée à la lipoprotéine A et B (AlpA/B).....	20
III.3.1.4. Protéine de la membrane externe de <i>H. pylori</i> (HopZ) .....	20
III.3.1.5. Protéine inflammatoire externe (Oip A).....	21
III.3.1.6. Gène favorisant l'ulcère duodénal (Dup A) .....	21
III.3.2. Cytotoxine vacuolisante (VacA) .....	21
III.3.3. Ilot de pathogénicité Cag (Cag PAI) .....	22
III.3.4. Cytotoxine associée au gène A (Cag A).....	23
III.3.5. Peptidoglycane (PG) .....	24
III.3.6. Flagelles et chimiotactisme .....	25
III.3.7. Lipopolysaccharide (LPS).....	26
III.3.8. Uréase ou urée aminohydrolase .....	26
III.3.9. Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT).....	28
IV. Transmission de l'infection à <i>H. pylori</i> .....	29
IV.1. Transmission gastro-orale .....	29
IV.2. Transmission oro-orale .....	29
IV.3. Transmission féco-orale .....	30
IV.4. Modes de transmission de l'infection .....	30
IV.5. Facteurs influençant la transmission de <i>H. pylori</i> .....	32
V. Traitement de l'infection à <i>H. pylori</i> .....	32
V.1. Traitement utilisant les produits pharmaceutiques .....	32
V.2. Recherche et alternative de traitement à base de plantes médicinales .....	33
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	38
II.1. Matériel.....	38
II.1.1 Matériel végétal .....	38
II.1.2. Souches bactériennes .....	38
II.1.3. La bactérie <i>Escherichia coli</i> TOP10.....	38
II.1.4. Tissus gastriques utilisés .....	38
II.1.5. Réactifs et appareils.....	38
II.1.5.1. Réactifs .....	38

II.1.5.2. Appareils.....	39
II.2. Méthodes .....	39
II.2.1. Sélection sur la base d'un criblage anti <i>H. pylori</i> et anti adhérence, l'extrait de plante médicinale ayant la meilleure activité .....	39
II.2.1.1. Enquête ethnopharmacologique auprès des tradipraticiens.....	39
II.2.1.1.1. Site de l'étude .....	39
II.2.1.1.2. Identification des tradipraticiens.....	42
II.2.1.1.3. Réalisation de l'enquête ethnopharmacologique.....	42
II.2.1.2. Préparation des extraits bruts, fractions et sous-fractions de l'extrait de plante active .....	42
II.2.1.2.1. Préparation des extraits bruts de plantes étudiées .....	42
II.2.1.2.2. Préparation des fractions de la plante active ( <i>Spathodea campanulata</i> ).....	43
II.2.1.2.3. Préparation des sous-fractions des fractions sélectionnées de <i>S. campanulata</i> .....	43
II.2.1.3. Sélection de la plante la plus active inhibant la croissance de <i>Helicobacter pylori</i> ...	44
II.2.1.3.1. Conditions de croissance de <i>H. pylori</i> P12.....	44
II.2.1.3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de microdilution des extraits bruts de plante .....	45
II.2.1.4. Evaluation de l'effet des extraits de plantes sur l'adhérence de <i>H. pylori</i> .....	46
II.2.1.4.1. Evaluation de l'effet des extraits de plantes sur l'adhérence de <i>H. pylori</i> aux coupes de tissus gastriques de souris.....	46
II.2.1.4.2. Analyse de l'expression des gènes d'adhérence ( <i>babA</i> et <i>hopZ</i> ) par transcription reverse en chaîne de polymérase (RT-PCR) .....	47
II.2.1.4.3. Evaluation de l'effet des extraits de plantes sur l'expression des protéines d'adhérence: <i>BabA</i> et <i>HopZ</i> .....	50
II.2.1.4.4. Analyse de la synthèse des protéines codée par des gènes d'adhérence par <i>Western</i> <i>Blot</i> .....	50
II.2.1.4.4.1. Définition.....	50
II.2.1.4.4.2. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE) .....	51
II.2.1.4.4.3. Transfert et détection des protéines sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'anticorps.....	53
II.2.2. Détermination par fractionnement bioguidé de l'effet de l'extrait de <i>S. campanulata</i> sur la croissance et l'adhérence de <i>H. pylori</i> .....	54

II.2.2.1. Détermination de l'effet des fractions de l'extrait de <i>S. campanulata</i> sur la croissance de <i>H. pylori</i> .....	54
II.2.2.2. Evaluation de l'effet des fractions de l'extrait de <i>S. campanulata</i> sur l'expression des protéines d'adhérence: BabA et HopZ .....	55
II.2.2.3. Evaluation de l'effet des sous-fractions de l'extrait de <i>S. campanulata</i> sur la croissance et l'expression des protéines d'adhérence: BabA et HopZ.....	55
II.2.2.4. Détermination du profil phytochimique des fractions de la plante active .....	56
II.2.2.4.1. Mise en évidence des polyphénols et flavonoïdes totaux .....	56
II.2.2.4.1.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux de l'extrait actif et ses fractions .....	56
II.2.2.4.1.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes de l'extrait actif et ses fractions.....	56
II.2.2.4.2. Détermination du profil phytochimique de la fraction la plus active par Chromatographie en phase Liquide à Ultra Haute Pression (CLUHP) couplée à la spectrométrie de masse.....	57
II.2.3. Evaluation de l'effet des fractions et sous-fractions de l'extrait de <i>S. campanulata</i> sur les facteurs de virulence CagA et uréase de <i>H. pylori</i> .....	59
II.2.3.1. Evaluation de l'effet des fractions et sous fractions de la plante active sur l'expression de la cytotoxine CagA .....	59
II.2.3.2. Evaluation de l'effet des sous-fractions sur l'activité de l'uréase .....	59
II.2.4. Analyses statistiques.....	60
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION .....	61
III.1. RESULTATS .....	61
III.1.1. Plantes utilisées par les tradipraticiens contre les affections gastriques et effets de ces plantes sur la croissance et l'adhérence de <i>H. pylori</i> .....	61
III.1.1.1. Plantes utilisées par les tradipraticiens pour soigner les affections gastriques .....	61
III.1.1.2. Inhibition de la croissance de <i>H. pylori</i> par les extraits bruts de plante.....	66
III.1.1.3. Effet des extraits bruts de plantes sur l'adhérence de <i>H. pylori</i> .....	69
III.1.1.3.1. Inhibition de l'adhérence de <i>H. pylori</i> au tissu d'estomac de Souris par les extraits bruts de plante .....	69
III.1.1.3.2. Inhibition de l'expression des gènes d'adhérence par les extraits de plante .....	73
III.1.1.3.3. Inhibition de l'expression des protéines d'adhérence par les extraits bruts de plante .....	73
Conclusion partielle 1.....	79
III.1.2. Effet des fractions de l'extrait actif sur la croissance, l'adhérence de <i>H. pylori</i> .....	80

III.1.2.1. Inhibition de la croissance de <i>H. pylori</i> par les fractions de <i>S. campanulata</i> .....	80
III.1.2.2. Inhibition de l'expression des protéines d'adhérence BabA et HopZ par les fractions de <i>S. campanulata</i> .....	80
III.1.2.3. Effet des sous-fractions de <i>S. campanulata</i> sur la croissance de <i>H. pylori</i> .....	81
III.1.2.4. Effet des sous-fractions de l'extrait de <i>S. campanulata</i> sur l'adhérence de <i>H. pylori</i> .....	82
III.1.2.5. Profil phytochimique de l'extrait actif .....	83
III.1.2.5.1. Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes de l'extrait brut et des fractions de <i>S. campanulata</i> .....	83
III.1.2.5.2. Structures des composés présents dans la fraction E et la sous-fraction SE3 .....	84
Conclusion partielle 2.....	92
III.1.3. Effet des sous-fractions de <i>S. campanulata</i> sur les facteurs de virulence CagA et uréase de <i>H. pylori</i> .....	93
III.1.3.1. Inhibition de l'expression de la cytotoxine CagA par les fractions et sous-fractions de <i>S. campanulata</i> .....	93
III.1.3.2. Inhibition de l'activité de l'uréase de <i>H. pylori</i> par les sous-fractions de <i>S. campanulata</i> .....	95
Conclusion partielle 3.....	97
III.2. Discussion générale.....	98
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	104
1. Conclusion générale.....	104
2. Perspectives.....	105
REFERENCES.....	106
Bibliographie .....	106
Webographie .....	126
ANNEXES .....	a

## **LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES**

**ADN:** Acide désoxyribonucleique

**ADNc:** Acide Désoxyribonucleique complémentaire

**ARN:** Acide Ribonucleique

**ARNm:** Acide Ribonucleique messenger

**BabA:** *Blood group antigen binding Adhesion*

**Cag A:** *Cytotoxin associated gene A*

**Cag PAI:** Ilot de Pathogenicité cag

**CCM:** Chromatographie sur Couche Mince

**CG:** Cancer Gastrique

**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH:** Chlorure de méthylène/ méthanol

**CI<sub>50</sub>:** Concentration Inhibitrice 50

**CMI:** Concentration Minimale Inhibitrice

**DMSO:** Dimethyl sulfoxide

**FITC:** *Fluorescein – IsoThioCyanate*

**GGT:** Gamma-Glutamyl Transpeptidase

***H. pylori:*** *Helicobacter pylori*

**HopZ:** *Helicobacter pylori outer membrane protein*

**HPLC:** *High Pression Liquid Chromatography*

**LPS:** LipoPolySaccharides

**MALT:** *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*

**PG:** PeptidoGlycane

**RT-PCR:** *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

***S. campanulata:*** *Spathodea campanulata*

**SabA:** *Sialic acid-binding system*

**SDS-PAGE:** *Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*

**SS4T:** *Système de Sécrétion de type IV*

**UGD:** *Ulcère GastroDuodenal*

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Anatomie interne et externe de l'estomac.....	5
<b>Figure 2:</b> Histologie de l'estomac .....	7
<b>Figure 3:</b> Pathologies gastriques induites par l'infection à <i>H. pylori</i> .....	10
<b>Figure 4:</b> Systématisation des pertes des substances gastriques.....	12
<b>Figure 5:</b> Photos de <i>H. pylori</i> prises en microscopie électronique .....	14
<b>Figure 6:</b> Prévalence de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> dans le monde .....	15
<b>Figure 7:</b> Colonisation de la muqueuse gastrique et genèse des lésions par <i>H. pylori</i> .....	17
<b>Figure 8:</b> Effets pathologiques de Vac A sur les cellules de l'hôte.....	22
<b>Figure 9:</b> Représentation schématique simplifiée des conséquences de la signalisation induite par le SST4 de <i>H. pylori</i> dans les cellules épithéliales gastriques .....	23
<b>Figure 10:</b> Représentation schématique du rôle du système de sécrétion de type IV dans les changements morphologiques, prolifération cellulaire et l'immunomodulation au cours de l'infection à <i>H. pylori</i> .....	25
<b>Figure 11:</b> Hydrolyse de l'urée.....	28
<b>Figure 12:</b> Sites d'étude; Bafia (Région du Centre), Bazou et Foubot (Région de l'Ouest)	41
<b>Figure 13:</b> Diagramme de fractionnement de la plante active.....	43
<b>Figure 14:</b> Diagramme de fractionnement des fractions B et E .....	44
<b>Figure 15:</b> Montage du transfert des protéines du gel sur la membrane .....	53
<b>Figure 16:</b> Photographie de la plaque pour le test de croissance de <i>H. pylori</i> par activité uréasique.....	66
<b>Figure 17:</b> Photographie de la boîte de pétri pour la culture de <i>H. pylori</i> sur milieu gélosé...	67
<b>Figure 18:</b> Coupes d'estomac de souris montrant la fixation ou non de <i>H. pylori</i> marqué au FITC .....	70
<b>Figure 19:</b> Effet des extraits de plante sur l'expression du gène <i>babA</i> par RT-PCR .....	74
<b>Figure 20:</b> Effet des extraits de plante sur l'expression du gène <i>hopZ</i> par RT-PCR .....	75
<b>Figure 21:</b> Effet des extraits de plante sur l'adhésine BabA de <i>H. pylori</i> P12 par Western blot .....	76
<b>Figure 22:</b> Effet des extraits de plante sur l'adhésine HopZ de <i>H. pylori</i> P12 par Western blot .....	77
<b>Figure 23:</b> Effet des fractions de <i>S. campanulata</i> sur la molécule d'adhésine BabA et HopZ de <i>H. pylori</i> (souche Hp G27).....	81

<b>Figure 24:</b> Effet des sous-fractions de <i>S. campanulata</i> sur la molécule d'adhésine BabA de <i>H. pylori</i> .....	83
<b>Figure 25:</b> Effet des sous-fractions de <i>S. campanulata</i> sur la molécule d'adhésine HopZ de <i>H. pylori</i> .....	84
<b>Figure 26:</b> Le chromatogramme total de la fraction E .....	85
<b>Figure 27:</b> Chromatogramme de la sous-fraction SE3 .....	86
<b>Figure 28:</b> Chromatogramme des différents composés détectés avec leur temps de retention pour la fraction E.....	87
<b>Figure 29:</b> Effet des fractions et sous-fractions de l'extrait de <i>S. campanulata</i> sur l'expression du gène codant pour la cytotoxine CagA de <i>H. pylori</i> .....	94
<b>Figure 30:</b> Activité inhibitrice de l'uréase par les sous-fractions SE3 et SB2.....	95
<b>Figure 31:</b> Représentation des pourcentages d'inhibition des différentes sous fractions SE3 et SB2 .....	96

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b> Facteurs de virulence de <i>H. pylori</i> et fonctions .....	18
<b>Tableau II:</b> Extrait de plantes anti-ulcère et éradication de <i>Helicobacter pylori</i> .....	34
<b>Tableau III:</b> Noms et structures de quelques composés anti- <i>Helicobacter pylori</i> et anti-adhérence.....	35
<b>Tableau IV:</b> Préparation de la solution d’amplification pour RT-PCR .....	48
<b>Tableau V:</b> Préparation des tubes pour PCR.....	49
<b>Tableau VI:</b> Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR .....	50
<b>Tableau VII:</b> Composition des gels pour SDS-PAGE.....	52
<b>Tableau VIII:</b> Plantes médicinales utilisées par le tradipraticien pour le traitement du mal gastrique et des troubles digestives .....	62
<b>Tableau IX:</b> Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la croissance de <i>H. pylori</i> en culture des extraits de plantes.....	68
<b>Tableau X:</b> Effet d'un prétraitement de 1 heure des coupes de tissu gastrique de souris avec l'extrait de plante sur l'adhérence de <i>H. pylori</i> marqué au FITC .....	71
<b>Tableau XI:</b> Récapitulatif de l'effet des extraits de plantes sur l'expression des gènes et protéines BabA et HopZ chez <i>H. pylori</i> .....	78
<b>Tableau XII:</b> Diamètres d'inhibition et quantités minimales actives (mg) des fractions de <i>S. campanulata</i> .....	80
<b>Tableau XIII:</b> Diamètres d'inhibition et quantités minimales actives (mg) des sous-fractions des fractions actives de <i>Spathodea campanulata</i> .....	82
<b>Tableau XIV:</b> La Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes de l'extrait et des fractions d'écorces de <i>S. campanulata</i> .....	85
<b>Tableau XV:</b> Temps de rétention, formule brute et noms des composés.....	89

## RESUME

Le traitement de l'infection à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) constitue une préoccupation majeure de Santé Publique du fait de la résistance aux antibiotiques. Parmi les solutions envisagées, les substances naturelles issues des plantes médicinales pourraient constituer une réponse à la lutte contre la résistance aux antibiotiques. L'objectif de notre travail était d'étudier les propriétés des extraits de quelques plantes médicinales du Cameroun sur la croissance et les facteurs de pathogénicité de *H. pylori* (adhérence et virulence). Une enquête ethnopharmacologique a permis de repertorier 41 plantes utilisées par les populations de la ville de Bafia (region du Centre), Bazou et Foubot (region de l'Ouest) pour lutter contre le mal gastrique et les troubles digestifs. Les activités anti-*Helicobacter pylori*, anti-uréasique et anti-adhérence des extraits au mélange chlorure de méthylène/méthanol (1:1 v/v) des 41 plantes ont été étudiées, en utilisant les souches *Hp12* et *HpG27* de *H. pylori*. La méthode de microdilution en milieu liquide et en milieu solide pour l'activité anti-*Helicobacter pylori*. La plante sélectionnée sur la base de l'activité inhibitrice la plus forte et anti-adhésive de *H. pylori* a été soumise à un fractionnement bioguidé. L'activité anti-uréasique des sous-fractions a été également déterminée par spectrophotométrie. L'activité anti-adhésive de *H. pylori* marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine sur les coupes de tissus gastriques de souris. Les extraits, fractions et sous fractions isolées des plantes qui ont inhibé *H. pylori* en culture ont été sélectionnés. Les expressions des adhésines *Blood group antigen binding adhesion* (BabA), *H. pylori outer membrane protein* (HopZ) et de la *cytotoxin-associated gene A* (CagA) ont été évaluées par *western blot*. L'effet de ces extraits a été évalué par *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) sur les gènes *babA* et *hopZ*. De plus, les fractions et sous-fractions actives de l'extrait de *Spathodea campanulata* ont été caractérisées par Chromatographie en Phase Liquide à Ultrahaute Pression (CLUHP) couplée à la spectrométrie de masse. Comme résultat, les extraits bruts de plante ont tous inhibé *H. pylori* en culture avec des concentrations minimales (CMI) inhibitrices comprises entre 0,125 et 100 mg/mL. L'extrait de *S. campanulata* a inhibé *H. pylori* avec une CMI de 0,125 mg/mL. A cette concentration, cet extrait a inhibé l'expression des protéines et des gènes BabA et HopZ. Sur la base de ses activités anti-*H. pylori* et anti-adhérence, l'extrait de *S. campanulata* a été fractionné et les fractions testées contre *H. pylori*. Les fractions B et E à l'hexane/acétate d'éthyle 25% et à l'acétate d'éthyle respectivement ont inhibé la culture de *H. pylori* avec les diamètres d'inhibition de 11,3 et 12 mm à la concentration de 0,1 mg/mL. Les fractions B et E ont été sous-fractionnées en (SB1 et SB2) et (SE1 et SE3) puis testées et la sous fraction SB2 a présenté l'activité anti-uréasique la plus élevée avec une concentration inhibitrice 50 (CI<sub>50</sub>) de 5,83 mg/mL. Par ailleurs la fraction E et sa sous-fraction SE3 ont inhibé l'expression des gènes des adhésines BabA et HopZ, et du gène CagA. Six composés cités dans la littérature: acide ursolique, kaempférol, acide spathodique, spathodol, acide tomentosolique, kaempferol-3-glucoside ont été identifiés dans la fraction E. Ces résultats confirment l'importance de l'utilisation de ces plantes dans la médecine traditionnelle locale et contribuent à la valorisation de ces plantes comme source de potentiels pour le traitement des infections à *H. pylori*.

**Mots clés:** *Helicobacter pylori*, Adhésine BabA et HopZ, Uréase, CagA, Plantes médicinales, SC

## ABSTRACT

The treatment of *H. pylori* infection is of major Public Health problem, mainly because of multi-bacterial resistance. Among the solutions considered, natural substances from medicinal plants could therefore constitute a source of potential response to the fight against antibiotic resistance. The objective of our work was to study the properties of extracts of some medicinal plants from Cameroon on the growth and pathogenicity factors of *H. pylori* (adhesion and virulence). The ethnopharmacological survey identified 41 plants used by the populations of Bafia (Center region), Bazou and Foubot (West region) against gastric pain and digestive disorders. The anti-*Helicobacter pylori*, anti-ureasic and anti-adhesion activities of crude extracts obtained from a mixture of methylene chloride-methanol (1: 1 v / v) was studied, using the *Hp12* and *HpG27* strains of *H. pylori*. , the method of microdilution in liquid medium and the method of dilution on agar for the anti-*Helicobacter pylori* activity. The selected plant was subjected to bioguided fractionation. The anti-ureasic activity of the sub-fractions was also determined by spectrophotometry. The anti-adhesion activity was determined by the adhesion of *H. pylori* labelled with fluorescein isothiocyanate on sections of mouse gastric tissue. The extracts, fractions and subfractions which inhibited the culture of *H. pylori* were selected. The expression of the adhesins Blood group antigen binding adhesion (BabA), *H. pylori* outer membrane protein (HopZ) and the cytotoxin-associated gene A (CagA) were evaluated by western blot. The effect of these extracts was analyzed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) on the *babA* and *hopZ* genes. In addition, the active fractions and subfractions of this extract were characterized by ultrahigh pressure liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. It emerges from these experiments that all the plants inhibited the culture of *H. pylori* with the minimum inhibitory concentration values of between 0.125 and 100 mg / ml. Extracts of *Spathodea campanulata* and *Nicotina tabacum* significantly inhibited *H. pylori* with MICs of 0.125 and 1 mg/mL, respectively. At these concentrations, these two extracts inhibited the expression of the BabA and HopZ proteins and genes. Based on its anti-*H. pylori* and anti-adhesion activities, the extract of *S. campanulata* was divided into 6 fractions and 11 sub-fractions. Fractions B and C with hexane / ethyl acetate 25% and 70% respectively and fraction E with ethyl acetate inhibited the culture of *H. pylori* with the inhibition diameters of 11.3; 10 and 12 mm at a concentration of 0.1 mg / mL. The subfractions SB1, SB2, SE1 and SE3 inhibited the culture of *H. pylori* with the inhibition diameters between 8 and 13 mm. The SB2 sub-fraction exhibited the highest anti-ureasic activity with an inhibitory concentration 50 (IC<sub>50</sub>) of 5.83 mg / ml. Furthermore, the fraction E and its sub-fraction SE3 inhibited the expression of the adhesins BabA and HopZ, and the cytotoxin CagA. We have identified 6 compounds cited in the literature, namely: ursolic acid, kaempferol, spathodic acid, spathodol, tomentosolic acid, kaempferol-3-glucoside in fraction E. These results confirm the importance of the use of these plants in local traditional medicine and contribute to the promotion of these plants as a potential source for the treatment of *H. pylori* infections.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, BabA and HopZ adhesin, Urease, CagA, medicinal plants, SC.

# **INTRODUCTION GENERALE**

## 1. Introduction

Les ulcères peptiques sont des pathologies qui affectent l'estomac (ulcères gastriques) et l'intestin grêle (ulcères duodénaux) (**Amandeep et al., 2012**). L'ulcère peut être causé par des facteurs non biologiques comme les médicaments, l'alcool et le tabac; et les facteurs biologiques dont *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (**Søreide et al., 2015**).

*H. pylori* est une bactérie flagellée gram-négative, non commensale, mobile, à spirale et microaérophile (**Marshall et Warren, 1984**). Elle infecte l'estomac humain et joue un rôle central dans le développement du cancer de cet organe (**Shin et al., 2005; Chu et al., 2003; Uemura et al., 2001**). *H. pylori* possède un arsenal de facteurs de virulence parmi lesquels nous pouvons citer: l'uréase, les flagelles et les adhésines qui jouent un rôle important dans la pathogenèse et l'évolution de la maladie car permettent à la bactérie de résister à l'acidité gastrique, se déplacer dans le mucus gastrique, se fixer à l'épithélium gastrique et d'échapper au système immunitaire de l'hôte (**Clyne et al., 2007**).

*H. pylori* comporte plusieurs adhésines dont les plus étudiées sont les protéines *blood-antigen binding protein A* (BabA), *sialic acid binding adhesin* (SabA), *H. pylori outer membrane protein* (HopZ) et *adherence-associated lipoproteins A and B* (AlpA and B) qui permettent les interactions entre la bactérie et les récepteurs cellulaires. Par ces interactions, *H. pylori* tire les nutriments utiles à sa croissance et sécrète en retour des toxines: *cytotoxin-associated gene A* (Cag A) et *vacuolating cytotoxin A* (Vac A) qui endommagent les cellules de l'hôte (**Kao et al., 2016; Evans et Evans, 2000**). En outre, pour survivre dans les conditions acides de la lumière de la muqueuse gastrique, *H. pylori* produit l'enzyme uréase présente dans le cytoplasme et/ou liée à la surface de la bactérie (**Sachs et al., 2005; Israel et Peek, 2001**). L'enzyme hydrolyse l'urée présente dans l'estomac de l'organisme hôte et produit de l'ammoniac ainsi que du gaz carbonique, ce qui augmente le pH du milieu (**Rutherford, 2014a; Konieczna et al., 2012a**) et le rend plus basique.

La transmission de *H. pylori* se fait par voies gastro-orale, oro-orale et fécale (**Kivi et Tindberg, 2006**). On estime qu'environ 50 % de la population mondiale est infecté par *H. pylori* et plus de 80 % se trouvant dans les pays en développement (**Amin et al., 2013; Azevedo et al., 2009**). Au Cameroun, une étude récente dans la ville de Douala, a révélé une prévalence de 17,1% pour les ulcères gastroduodénaux et de 7,2% pour les ulcères gastriques (**Eloumou et al., 2016**). De même, une étude menée auprès de 171 patients atteints d'un ulcère gastrique au Centre Hospitalier Universitaire de Yaoundé et au Centre Médical de la

Cathédrale a montré que 72,5% de ces patients étaient infectés par *H. pylori* (**Andoulo et al., 2013**).

Jusqu'à ce jour, la trithérapie comprenant un inhibiteur de pompe à protons et deux antibiotiques (Amoxicilline, Clarithromycine ou Métronidazole) est la première ligne de traitement de l'infection à *H. pylori* (**Safavi et al., 2015; Yang, 2014**). Ces antibiotiques sont utilisés en association pour attaquer la bactérie sur plusieurs cibles, chacun selon un mécanisme différent. L'amoxicilline inhibe la synthèse de la paroi bactérienne tandis que la Clarithromycine et le Métronidazole, la synthèse protéique. Récemment, l'utilisation d'une tétrathérapie composée d'un inhibiteur de la pompe à protons, du sel de bismuth et deux antibiotiques pour l'éradication de *H. pylori* a été considérée comme un modèle de référence très efficace (**Malfertheiner et al., 2007**). En fait, les antibiotiques inhibent la croissance bactérienne ou tuent la bactérie sans influence sur d'autres facteurs de pathogénicité. Des études suggèrent que la trithérapie est associée à une augmentation des complications et des effets indésirables (**Selgrad et Malfertheiner, 2011; Malfertheiner et al., 2007**) et, le taux satisfaisant du traitement a montré une baisse considérable de 25 - 60% (**Chuah et al., 2011; Gumurdulu et al., 2004**). Les causes de cette baisse de traitement sont nombreuses et incluent entre autres une charge bactérienne élevée, un polymorphisme (**Malfertheiner et al., 2007**) et une résistance élevée aux antibiotiques utilisés à savoir 85,6; 44,7 et 95,5 % respectivement pour l'Amoxicilline, la Clarithromycine, et le Métronidazole (**Al-Eraky et al., 2018; Harrison et al., 2017; Ndip et al., 2008**).

Le nombre croissant d'infections à *H. pylori* et de résistance aux antibiotiques actuels sont devenus un problème mondial, en raison de la corrélation directe entre les infections à *H. pylori* et la gastrite, les ulcères gastriques et le cancer (**Kafarski et Talma, 2018**). Cette situation interpelle la communauté scientifique à rechercher constamment des alternatives de traitement innovant. Dans ce sens, une thérapie inhibant à la fois la croissance de *H. pylori* et les facteurs de virulence de la bactérie permettrait de mieux éradiquer l'infection.

Les plantes médicinales ont toujours été utilisées pour le traitement des maladies gastriques en Afrique et plus particulièrement au Cameroun. **Tan et al. (2006)** ont démontré qu'un extrait de *Pleiocarpa sp.* inhibe le développement de *H. pylori*. De même, l'extrait d'*Eryngium foetidum* a montré des effets inhibiteurs sur la culture d'isolat de *H. pylori* (**Kouitchou et al., 2016**). En outre, les travaux de **Tharmalingam et al., (2014)** ont montré que le composé pipérine a des activités anti-*H. pylori*.

Cependant, à notre connaissance, aucune investigation scientifique n'a été menée dans le sens d'analyser la capacité des plantes médicinales du Cameroun à inhiber les facteurs de virulence de *H. pylori*. Ainsi, la présente étude a été pensée pour étudier l'effet de quelques plantes médicinales du Cameroun sur la croissance de *H. pylori* et l'expression de certains facteurs de virulence.

## **2. Hypothèse de recherche**

Les plantes utilisées en médecine traditionnelle pour soigner les affections gastriques et digestives inhibent la croissance de *H. pylori* en agissant sur les facteurs de pathogénicité.

## **3. Objectifs**

### **3.1. Objectif général**

L'objectif général de ce travail a été d'étudier les propriétés des extraits de quelques plantes médicinales du Cameroun sur la croissance et les facteurs de pathogénicité de *H. pylori* (adhérence et virulence).

### **3.2. Objectifs spécifiques**

Le travail a spécifiquement consisté à:

- Sélectionner sur la base d'un criblage anti *H. pylori* et anti adhérence, l'extrait de plante médicinale ayant la meilleure activité,
- Déterminer par fractionnement bioguidé l'effet de l'extrait sélectionné sur la croissance et l'adhérence de *H. pylori*.
- Evaluer l'effet des fractions et sous-fractions de l'extrait de la plante sélectionné sur les facteurs de virulence CagA et uréase de *H. pylori*.

## **CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE**

## I. Historique

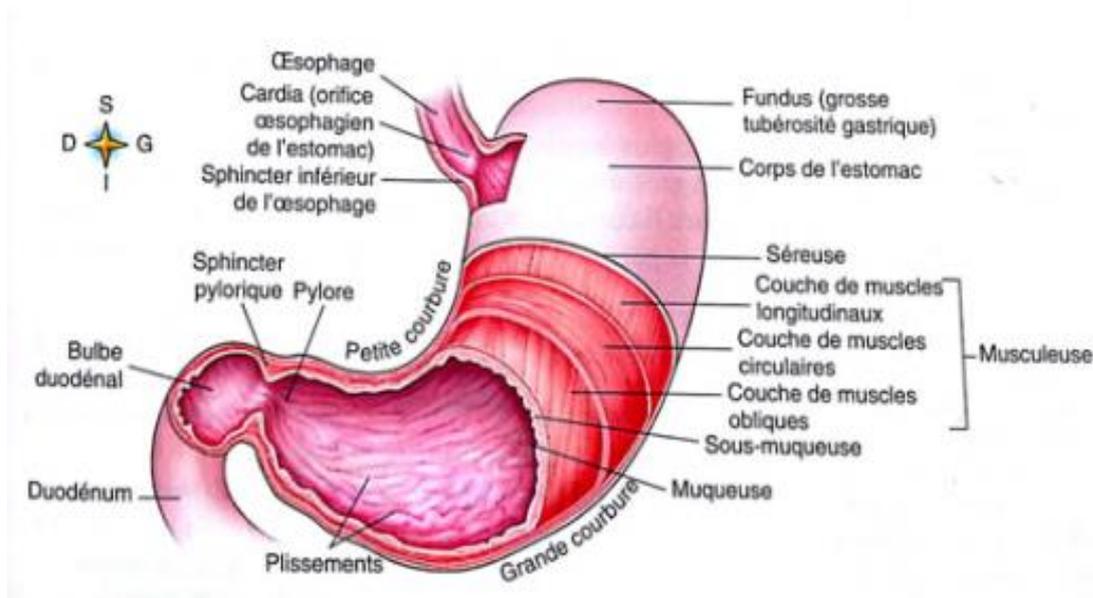
En 1875, des scientifiques allemands découvrirent une bactérie hélicoïdale dans des estomacs humains. Celle-ci ne pouvant être cultivée, les recherches la concernant furent finalement abandonnées. Ce n'est qu'en 1982 que deux médecins australiens, J. Robin Warren (pathologiste) et Barry J. Marshall (gastroentérologue), ont isolé et réussi à cultiver pour la première fois *Helicobacter pylori*.

L'intérêt des médecins pour l'infection à *H. pylori* a connu un développement majeur dans les années suivantes, après la démonstration par Barry Marshall du rôle direct de cette infection dans l'apparition d'une gastrite (**Marshall et Warren, 1984**). Dans les années 1970-1980, Robin Warren utilisant la coloration de Warthin et Starry, observe la présence de bactéries spiralées au niveau de la muqueuse gastrique de patients bénéficiant d'une endoscopie gastrique. Il remarqua également que la muqueuse sous-jacente présente toujours des signes d'inflammation quand la bactérie est présente et suggéra que ces bactéries étaient à l'origine d'une gastrite. Barry Marshall proposa alors à Robin Warren de cultiver cette bactérie et, après de nombreux essais infructueux, y parvint en 1982 en appliquant la méthode utilisée pour les *Campylobacters* (**Chaput et Boneca, 2006**). Cette bactérie a d'abord été appelée *Campylobacter pyloridis* (**Marshall et Warren, 1984**). Par la suite, des différences ont été observées entre cette bactérie et les bactéries du genre *Campylobacter* telles que la morphologie des flagelles, la composition en lipides, en ménaquinones, et la séquence du gène de l'ARNr 16S. Ceci a conduit à renommer cette bactérie « *Helicobacter pylori* », chef de file d'un nouveau genre (**Goodwin et al., 1989**). Afin de prouver que *H. pylori* est l'agent causal de l'ulcère gastrique, Marshall ingéra une suspension bactérienne provoquant une inflammation gastrique aiguë (**Chaput et Boneca, 2006**). Ainsi, dans leur publication originelle, Warren et Marshall soutiennent que la plupart des ulcères gastriques et duodénaux sont causés par une infection avec cette bactérie, et non pas le stress ou la nourriture épicée, comme on le pensait auparavant. Pour l'ensemble de leurs travaux, le Prix Nobel de Médecine 2005 a été attribué à Warren et Marshall.

## II. Généralités sur l'estomac

### II.1. Anatomie de l'estomac

L'estomac (du latin *stomachus* signifiant « œsophage » et par extension « estomac ») est la portion du tube digestif en forme de poche, située entre l'œsophage et le duodénum. Chez l'adulte, il mesure 20 cm de long et se trouve en rapport avec le foie, la rate, le pancréas, le diaphragme et les intestins. L'estomac permet d'assurer une partie de la digestion par des fonctions mécaniques (brassage) et chimiques, et par mélange des aliments au suc gastrique. Le pH de l'estomac varie entre 1,5 et 5 (Mustapha, 2011).



**Figure 1: Anatomie interne et externe de l'estomac (Rami et Therond, 2006)**

L'estomac se caractérise de face par sa forme en « J ». C'est la première poche du tube digestif. Il est délimité par 2 systèmes sphinctériens: à son entrée, le Sphincter Oesophagien Inférieur (SOI) et le cardia qui permettent la jonction avec l'œsophage et à sa sortie, le pylore qui fait la jonction avec l'intestin grêle (duodénum) (Figure 1). Il présente deux courbures: la petite courbure, courte, siège sur la face postérieure de l'estomac et est la continuation vers le bas de la paroi postérieure de l'œsophage et juste avant le sphincter pylorique, elle s'incurve vers la droite et le haut pour réaliser la forme de J; la grande courbure, constituée de

l'oesophage qui rejoint l'estomac, la région antérieure formant un angle aigu vers le haut puis s'incurvant vers le bas, se dirige vers le sphincter pylorique.

Grâce à sa musculature, l'estomac malaxe les aliments et les transforme en substances semi-fluides constituées d'aliments partiellement digérés, d'eau, de diverses enzymes digestives et d'acide chlorhydrique et le chyme. Ce dernier est éjecté dans le duodénum par relâchement du pylore. Le pylore a pour fonction essentielle la formation d'un réservoir assurant la continence gastrique. Les replis gastriques sont des plissements de la muqueuse permettant d'offrir une plus grande surface de contact avec les aliments. Ces replis agissent mécaniquement sur la dégradation des aliments au cours du processus de brassage assuré par les contractions musculaires.

L'estomac humain est ainsi divisé en trois régions anatomiques: la grosse tubérosité appelée fundus, la partie moyenne appelée le corps de l'estomac et l'antrum à sa partie inférieure.

## **II.2. Histologie (Mustapha, 2011)**

Sur le plan histologique, la paroi interne de l'estomac est constituée de différentes couches (Figure 2):

- la muqueuse: c'est la première couche en contact avec le bol alimentaire. Elle est constituée par l'épithélium (composé de cellules épithéliales), la *lamina propria* (composée de tissu conjonctif lâche) et une fine couche de muscles lisses la séparant de la sous-muqueuse. Elle est recouverte de mucus.
- la sous-muqueuse: constituée d'une couche de tissu conjonctif fibreux et vascularisé assurant l'irrigation des cellules gastriques.
- la couche musculaire elle-même constituée de 3 couches de fibres musculaires:
  - ✓ la couche musculaire oblique interne : elle est responsable du mouvement de brassage mécanique des aliments. Cette couche est spécifique à l'estomac et n'est présente dans aucun autre organe du système digestif. La paroi musculaire interne de l'antrum est plus épaisse que celle du fundus assurant des contractions plus forcées.
  - ✓ la couche musculaire circulaire qui est également plus forte au niveau de l'antrum. Cette couche est concentrique à l'axe longitudinal de l'estomac.

- ✓ la couche musculaire longitudinale externe.

### II.2.1. Paroi gastrique

Elle est constituée d'un épithélium monostratifié glandulaire contenant une seule couche de cellules. L'invagination donne lieu à la glande gastrique. On observe plusieurs couches:

- la sous-muqueuse;
- la musculuse de l'estomac, constituée de muscles lisses organisés en 3 couches: la couche oblique plus profonde, la couche circulaire intermédiaire et la couche longitudinale plus externe;
- la séreuse qui enveloppe l'organe, composée de plusieurs couches de tissu conjonctif en continuité avec le péritoine qui recouvre la totalité de la paroi externe de l'estomac.

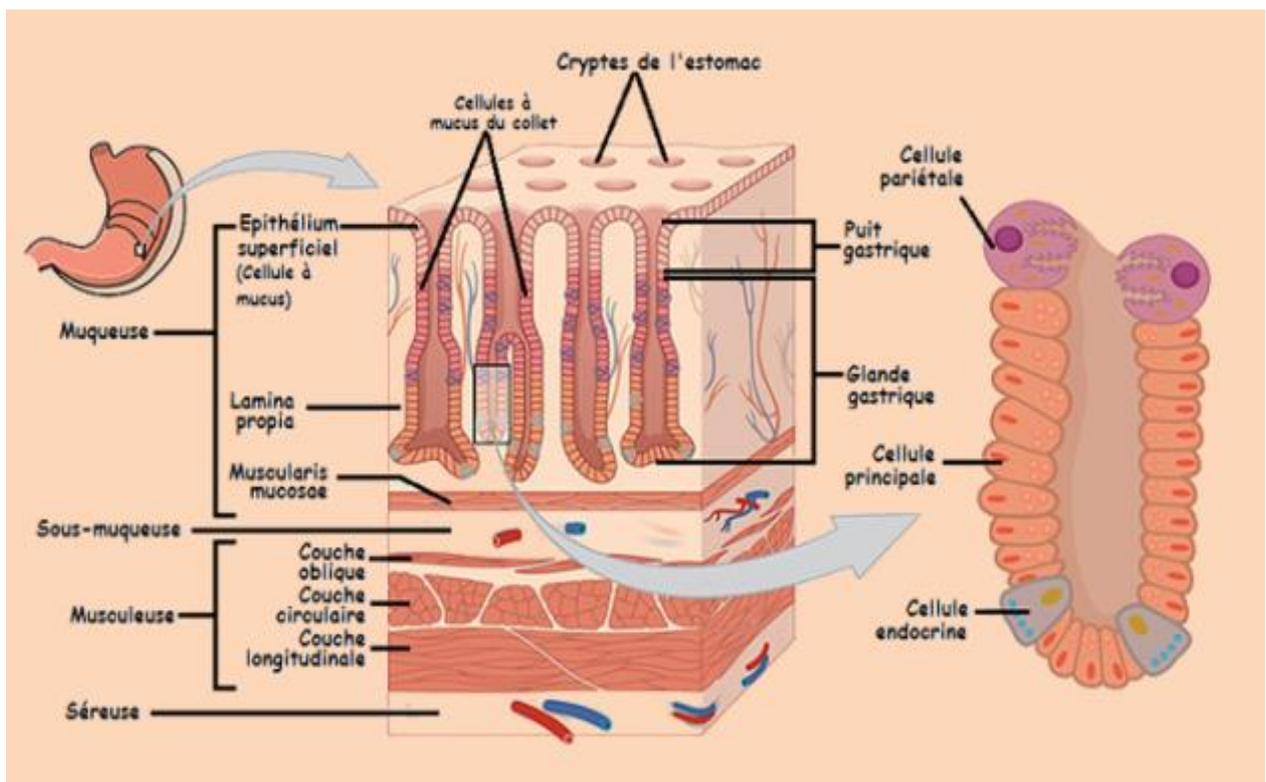


Figure 2: Histologie de l'estomac

Source: <http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/grain6d.html>

## **II.2.2. Organisation générale de la muqueuse gastrique**

La muqueuse, responsable de la sécrétion gastrique est constituée d'un épithélium reposant sur un chorion. Dans le chorion se trouve l'appareil vasculo-nerveux, des cellules lymphoplasmocytaires immunocompétentes et des mastocytes. L'épithélium de la muqueuse gastrique est formé d'une seule couche de cellules présentant de nombreuses invaginations. Les glandes de la zone du cardia font transition entre les glandes de type œsophagien et fundique. Les glandes du fundus comprennent :

- les cellules principales, pyramides tronquées à contours indécis dont le protoplasme est finement granuleux;
- les cellules bordantes ou pariétales, globuleuses, à contours nets, dont le protoplasme granuleux acidophile est parcouru de fins canalicules qui communiquent avec la lumière glandulaire; ces glandes secrètent de l'acide chlorhydrique, le facteur intrinsèque, de la pepsine et du mucus.

La muqueuse gastrique recouvre le corps de l'estomac et s'étend le long de la grande courbure. Les glandes de la région pylorique ne comprennent pas de cellules bordantes ; leur forme est en grappe analogue à celle des glandes duodénales de Brünner. Les glandes de l'antra secrètent du mucus et de la gastrine. Des cellules semblables aux cellules entérochromaffines secrètent la sérotonine et sont aussi présentes dans le fundus et dans l'antra. La gastrine dont la somatostatine inhibe sa libération stimule la sécrétion d'acide chlorhydrique. La muqueuse antrale recouvre la partie horizontale de l'estomac.

## **II.3. Fonction de l'estomac**

La barrière muqueuse intestinale tient compte des concepts anatomiques et physiologiques et de leur importance dans les mécanismes de protection. Elle apparaît comme un système à deux composantes (Ngoyi, 2016):

- une protection extrinsèque, première ligne de défense de la muqueuse ;
- une protection intrinsèque deuxième ligne de défense.

### **II.3.1. Protection extrinsèque**

Au niveau extrinsèque, la barrière de mucus associée aux ions bicarbonates, les immunoglobulines sécrétoires et la flore saprophyte constituent la protection pré-épithéliale. Rappelons que le mucus est un gel formé de polymères de glycoprotéines. Le mucus est une entité sécrétée en permanence sous forme neutre par les cellules épithéliales de surface, sous

forme acide par les cellules à mucus du collet. Il contribue à la formation d'une couche qui adhère fortement à la surface de la muqueuse gastrique. Fortement liées aux glycoprotéines du mucus, les immunoglobulines sécrétées de type IgA1 et IgA2 s'opposent à l'adhérence bactérienne. D'autres composés présents dans le mucus peuvent augmenter la résistance de cette première ligne de défense. C'est le cas du lysozyme qui, par interaction avec les glycoprotéines du mucus, permet la lyse des bactéries, et de la lactoferrine qui, en raison de sa haute affinité pour le fer, aurait un effet bactériostatique. La couche mucus-IgA sécrétée à laquelle s'associe la flore saprophyte qui occupe les niches entérocytaires protège la muqueuse de la déshydratation, de l'absorption des macromolécules, des agresseurs physiques et chimiques, de l'attaque de microorganismes et de leurs toxines ainsi que des parasites. Le flux sanguin constitue la protection post-épithéliale de cette première ligne de défense, le réseau de défense des capillaires joue un rôle majeur dans la trophicité de la muqueuse.

### **II.3.2. Protection intrinsèque**

Au niveau intrinsèque, la deuxième ligne de défense de la muqueuse comprend, le glycocalyx et les cellules épithéliales. Adjacent au gel adhérent de mucus, le surfactant, constitué par une monocouche de phospholipides forme un revêtement hydrophobe qui augmente la résistance de la muqueuse à l'agression chimique ou mécanique. Sous le surfactant, le glycocalyx, situé à la face externe des cellules épithéliales, est essentiellement formé par des complexes d'hydrates de carbone. Très résistant aux enzymes protéolytiques, il renforce la protection des cellules épithéliales. La dernière ligne de défense comprend les cellules épithéliales de surface avec leurs complexes jonctionnels et leur contenu en grains de mucus neutre, dernier obstacle à l'effet des agresseurs sur la muqueuse.

### **II.3.3. Facteurs de régulation de la barrière de la muqueuse**

L'ensemble des mécanismes de défense de la barrière de la muqueuse est renforcé par la présence d'autres facteurs. De nombreux travaux expérimentaux ont montré l'importance des prostaglandines E, F et I. Ces prostaglandines endogènes agissent sur la protection extrinsèque en augmentant la production et la sécrétion du mucus, la sécrétion de bicarbonates et de surfactants et en stimulant le flux sanguin. Par ailleurs, elles interfèrent sur la protection intrinsèque en augmentant le renouvellement cellulaire. Les enképhalines renforcent la protection extrinsèque stimulant la microcirculation par une action sur les sphincters précapillaires. La cholécystokinine, la sécrétine, l'entéroglucagon, la gastrine, les facteurs de

croissance comme *Epidermal Growth Factor* (EGF) renforcent la protection intrinsèque par leur effet trophique sur la muqueuse.

#### II.4. Maladies de l'estomac

L'infection à *H. pylori* induit toujours une inflammation chronique de la muqueuse gastrique, qui bien que dans la plupart des cas asymptomatiques, conduisent dans 5 à 10 % des cas vers la maladie ulcéreuse (Lanas et Chan, 2017). Dans environ 1 % des cas, cette infection conduit également à deux types de cancers de l'estomac, les adénocarcinomes gastriques hors cardia (1 %) et le lymphome gastrique du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) (0,1 %). Les adénocarcinomes gastriques liés à l'infection à *H. pylori* se développent dans le corps ou la partie distale de l'estomac, sur fond de gastrite chronique atrophique avec métaplasie intestinale (Figure 3).

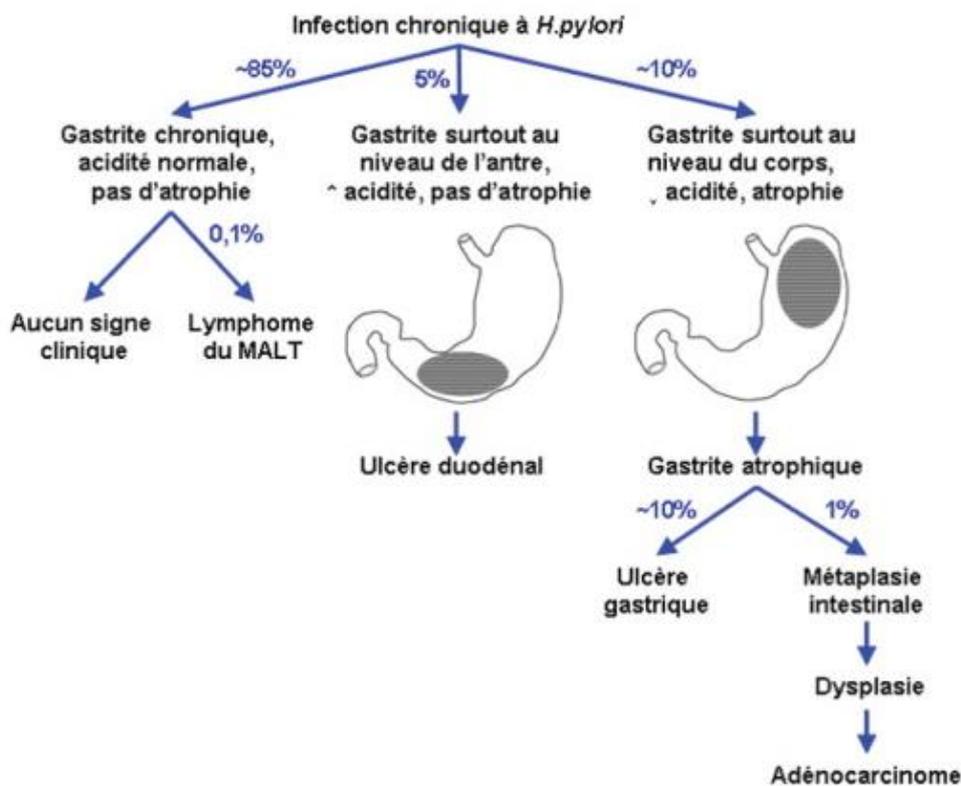


Figure 3: Pathologies gastriques induites par l'infection à *H. pylori* (Varon et Mégraud, 2013)

#### **II.4.1. Gastrite aiguë**

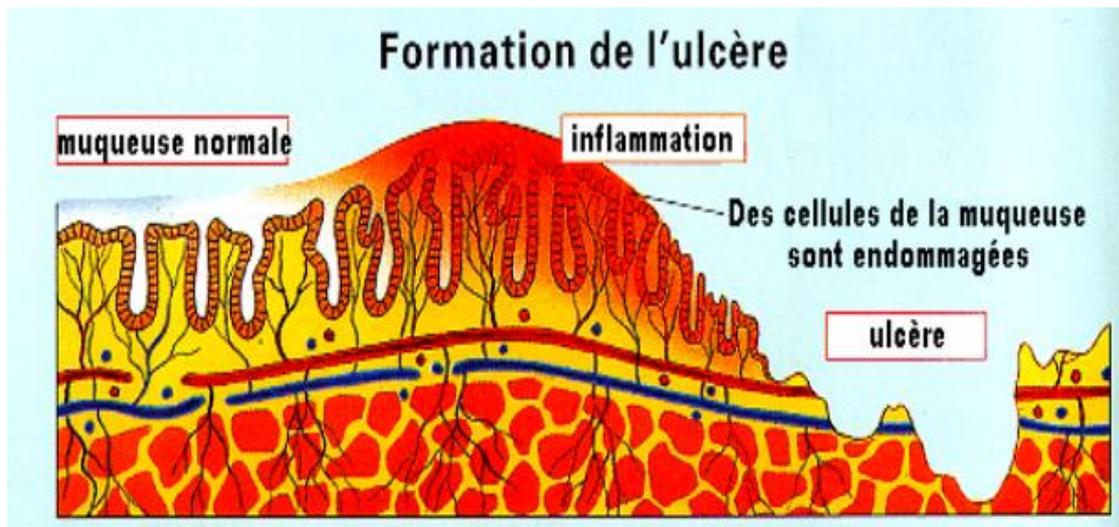
La forme aiguë de la gastrite est asymptomatique chez l'adulte, mais pourrait être symptomatique chez l'enfant. Elle est caractérisée par une infiltration de mono- et polynucléaires neutrophiles, une diminution de la sécrétion gastrique acide et une légère augmentation de la gastrine. La gastrite aiguë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

#### **II.4.2. Gastrite chronique**

La gastrite chronique s'installe généralement en quelques semaines de l'infection. Elle est caractérisée au plan histologique par une infiltration essentiellement mononucléée intéressant l'épithélium de revêtement de la muqueuse gastrique. Son incidence augmente avec l'âge, pour atteindre jusqu'à 60 à 70% des individus de plus de 60 ans dans les pays industrialisés. Plus de 90% des ulcères duodénaux sont associés à une gastrite à *H. pylori*. Par ailleurs, cette forme de gastrite chronique évoluerait naturellement vers une atrophie glandulaire et pourrait favoriser le développement du cancer gastrique (Sobhani *et al.*, 1995).

#### **II.4.3. Ulcère gastroduodéal (UGD)**

L'ulcère, qu'il soit gastrique ou duodéal, est une perte de substance plus ou moins étendue de la paroi digestive qui atteint la couche musculaire (Amandeep *et al.*, 2012). Il guérit en laissant une cicatrice. On le différencie des érosions, abrasions, exulcérations superficielles qui n'atteignent pas la couche musculaire et qui guérissent sans cicatrice. Sur le plan anatomopathologique, l'UGD se traduit par l'interruption de la muqueuse et de la musculature associée à des lésions vasculaires et à une hypertrophie nerveuse (Figure 4). Sur le plan physiologique, les ulcères gastroduodénaux surviennent quand il y a un déséquilibre entre les facteurs de protection de la muqueuse gastrique (mucus, bicarbonates, flux sanguin muqueux, cytoprotection) et les facteurs d'agression chlorhydropeptique de l'estomac (HCl, pepsine, gastrine). Or, un déséquilibre de cette balance envers l'un des plateaux, augmentation de l'agression ou diminution de la résistance de la muqueuse gastrique, pourrait être responsable de l'apparition des ulcères (Bentahar, 2018).



**Figure 4: Systématisation des pertes des substances gastriques**

(<http://www.prevention.ch/ulcere.htm>)

La maladie ulcéreuse gastrique ou duodénale est une affection plurifactorielle évoluant de façon chronique avec des poussées évolutives et répétitives, entrecoupées de périodes de rémission plus ou moins longues. Le lien entre *H. pylori* et la maladie ulcéreuse peptique a été clairement établi. Elle peut être asymptomatique sans manifestations cliniques dans la majorité des cas ou symptomatique caractérisée d'une douleur brûlante qui survient 2 à 3 h après les repas ou le réveil et qui peut être soulagée par la nourriture et des antiacides.

La maladie ulcéreuse gastroduodénale touche presque 10 % de la population mondiale, avec une incidence globale de 3 nouveaux cas pour 100 000 habitants (Lanas *et al.*, 2017). L'ulcère du bulbe est plus fréquent chez l'homme (sex ratio 3/1), la parité est respectée pour l'ulcère gastrique. En détail, la maladie ulcéreuse duodénale a une incidence annuelle de 60 à 80 000 nouveaux cas par an. *H. pylori* est alors retrouvé dans la muqueuse gastrique 9 fois sur 10. L'incidence annuelle de la maladie ulcéreuse gastrique est quatre fois plus rare (jusqu'à 20 000 cas par an), une infection à *H. pylori* est retrouvée sept fois sur dix.

#### **II.4.4. Adénocarcinome gastrique (Varon et Mégraud, 2013)**

L'adénocarcinome gastrique représente la 14<sup>ème</sup> cause de mortalité toute catégorie confondue dans le monde et la 2<sup>ème</sup> cause de mortalité par cancer. En France, il se situe au 5<sup>ème</sup> rang, avec près de 6 000 nouveaux cas par an. Son pronostic est mauvais, avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 20 % et, en dehors de la chirurgie (gastrectomie partielle ou totale),

aucune thérapie spécifique n'est utilisée excepté dans les 10 % des cas présentant une expression du récepteur Her2, traitables par l'herceptine. Les adénocarcinomes gastriques sont histologiquement très hétérogènes (5 catégories principales et de nombreux variants histologiques plus rares selon la dernière classification de l'OMS) et à l'exception de rares cas de cancers familiaux associés à des mutations du gène *cdh1* retrouvés chez les jeunes adultes, les adénocarcinomes gastriques sont sporadiques, apparaissent chez les sujets de plus de 60 ans et se développent presque toujours sur une muqueuse inflammatoire résultant de l'infection chronique à *H. pylori*. L'infection à *H. pylori* est considérée comme la principale cause de l'adénocarcinome gastrique d'après de nombreuses données épidémiologiques et les critères de causalité.

#### **II.4.5. Lymphome du MALT (Varon et Mégraud, 2013)**

Les lymphomes gastriques du MALT de bas grade de malignité correspondent à une hyperprolifération lymphocytaire B entretenue par *H. pylori*. Ces cancers sont moins fréquents que l'adénocarcinome et ont été moins étudiés. Nous avons souligné précédemment l'importance du contexte inflammatoire pour le développement de l'adénocarcinome : de manière similaire, le lymphome du MALT, qui émane d'une prolifération incontrôlée des lymphocytes B, est considéré comme le résultat d'une inflammation qui a dégénéré. En absence d'infection, la muqueuse gastrique est totalement dépourvue de tissu lymphoïde (contrairement à la muqueuse intestinale); mais dans un contexte de lymphome du MALT, les lymphocytes B prolifèrent et s'organisent en structures lymphoïdes similaires aux plaques de Peyer naturellement présentes dans la partie inférieure de l'intestin.

### **III. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)**

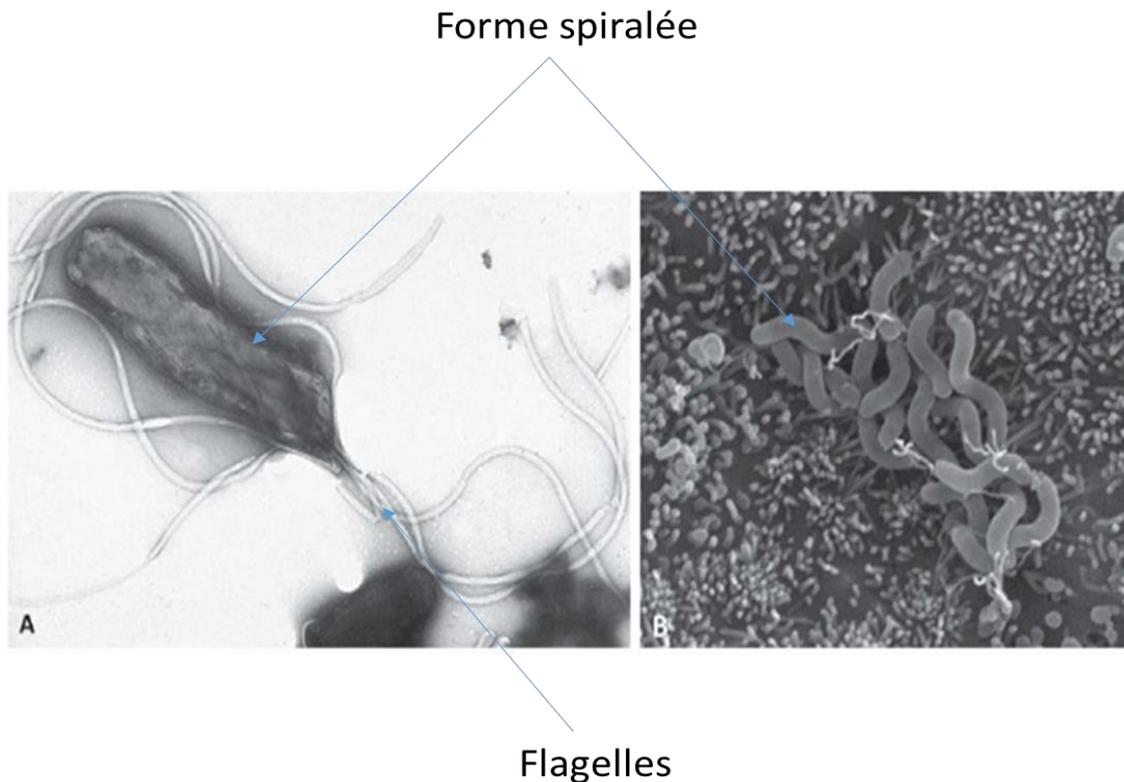
#### **III.1. Description de *H. pylori***

*H. pylori* est un bacille Gram négatif spiralé ou incurvé, bactérie microaérophile qui présente une affinité particulière pour l'épithélium de l'estomac. Elle possède 3 à 5 flagelles polaires et engagés conférant une motilité et permettant un mouvement rapide dans la muqueuse gastrique visqueuse lui assurant ainsi une meilleure colonisation (**Mégraud *et al.*, 1985**) (Figure 5).

Biochimiquement *H. pylori* peut être caractérisée par la présence de différentes enzymes telles que l'uréase, la catalase, la cytochrome oxydase, les phosphatases et la gamma-

glutamyl transpeptidase ainsi que l'absence de capacité à fermenter les sucres et à hydrolyser l'hippurate (Megraud *et al.*, 1985).

Comme son nom l'indique aussi, *H. pylori* est présent au niveau du pyllore, mais aussi dans le reste de l'estomac. La présence de cette bactérie dans l'estomac est toujours pathologique. Son mode d'existence est parasitaire, la bactérie persiste dans l'estomac durant toute la vie si elle n'est pas éliminée.



**Figure 5: Photos de *H. pylori* prises en microscopie électronique**

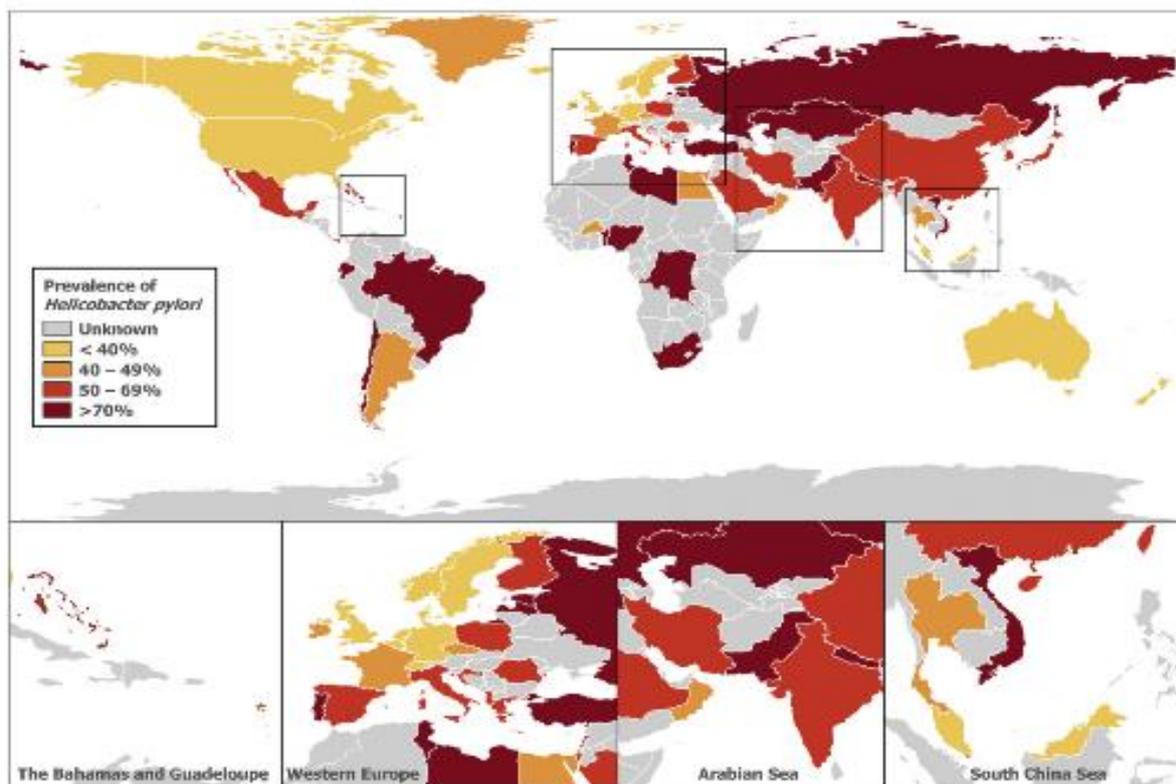
*A. Une bactérie *H. pylori*, B. Amas d'*H. pylori* au niveau des cellules épithéliales gastriques (Marshall et Warren, 1984)*

### III.2. Prévalence et variabilité génétique de *H. pylori*

*H. pylori* est une bactérie ubiquitaire dans l'espèce humaine. L'infection à *H. pylori* est l'infection bactérienne chronique la plus fréquente puisqu'elle touche 50% de la population mondiale (Torres *et al.*, 2000). Cette forte prévalence est très inégalement répartie dans la population (Figure 6). La prévalence de l'infection à *H. pylori* varie à l'échelle mondiale selon les facteurs socioéconomiques et les niveaux d'hygiène. Une étude récente a rapporté que jusqu'en 2015, environ 4,4 milliards de personnes ont été infectés par *H. pylori*, et le taux de

prévalence en Afrique, en Amérique latine et en Asie est en augmentation. Les États-Unis et l'Australie ont une faible prévalence de *H. pylori* (35,6% et 24,6%, respectivement), leurs populations autochtones ont une prévalence élevée (74,8% chez les populations autochtones de l'Alaska et 76,0% chez les populations autochtones de l'Australie occidentale). Les régions où la prévalence est la plus élevée sont l'Afrique (70,1%), l'Amérique du Sud (69,4%) et l'Asie occidentale (66,6%); les régions où la prévalence est la plus faible sont l'Océanie (24,4%), l'Europe occidentale (34,3%) et l'Amérique du Nord (37,1%). Les pays où la prévalence est la plus élevée sont le Nigéria (87,7%), le Portugal (86,4%) et l'Estonie (82,5%); les pays où la prévalence est la plus faible sont la Suisse (18,9%), le Danemark (22,1%) et la Nouvelle-Zélande (24,0%) (Hooi *et al.*, 2017).

Au Cameroun la prévalence de l'infection est d'environ 72,5% dans une étude faite sur 171 des personnes malade d'ulcère gastrique au Centre Hospitalier Universitaire de Yaoundé (Andoulo *et al.*, 2013).



**Figure 6: Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* dans le monde (Hooi *et al.*, 2017)**

### III.3. Facteurs de virulence majeurs de *H. pylori*

*H. pylori* colonise généralement l'hôte pour la vie à moins qu'un traitement spécifique ne soit administré. Cette bactérie a co-évolué avec les humains pendant au moins 58.000 années, et il existe des types de souches qui prédominent dans certaines régions du monde en corrélation avec les schémas de migration humaine (**Suzuki et al., 2012; Linz et al., 2007**). La plupart des personnes infectées ne développent pas de maladie patente, ce qui a conduit à l'hypothèse très controversée selon laquelle certaines souches de *H. pylori* seraient inoffensives voire bénéfiques (**Mishra, 2013**).

*H. pylori* est bien adapté à la colonisation de la muqueuse gastrique grâce à de nombreux facteurs tels que l'uréase et les flagelles. D'autres facteurs sont responsables d'une inflammation locale au site de colonisation tels que le lipopolysaccharide (LPS), les adhésines, le système de sécrétion de type IV (SST4), la cytotoxine associée au gène A (Cag A) et la cytotoxine VacA (Figure 7). Tous les isolats cliniques de *H. pylori* expriment l'uréase. L'uréase convertit l'urée en ammoniac ainsi qu'en dioxyde de carbone et entraîne l'élévation du pH de la zone environnante. Ceci fournit une protection temporaire contre l'acidité gastrique naturellement présente dans l'estomac, mais *H. pylori* n'étant pas une bactérie acidophile. En effet, c'est une bactérie qui nécessite un pH quasi neutre, obtenu dans la couche de mucus directement adjacente à l'épithélium de surface gastrique. La forme hélicoïdale de *H. pylori* permet facilement à son flagelle polaire de propulser la bactérie dans le mucus visqueux. Les systèmes directs de chimiotaxie attirent *H. pylori* vers certains acides aminés, le bicarbonate et le cholestérol, alors que le pH acide sert de répulsif. Ce système maintient les organismes dans un milieu favorable près de l'épithélium de surface. *H. pylori* glycosyle le cholestérol de l'hôte et l'insère dans sa membrane externe. La fonction du cholestérol glycosylé n'est pas entièrement connue, mais lorsque *H. pylori* manque de cholestérol, il est plus sensible au stress environnemental (**Wang et al., 2012; McGee et al., 2011**). Une autre caractéristique intéressante de la membrane est le lipopolysaccharide (LPS) relativement peu toxique trouvé chez *H. pylori*, qui peut contribuer à sa persistance en limitant la réponse inflammatoire de l'hôte. A la différence du LPS provenant d'autres bactéries, le LPS de *H. pylori* est reconnu par les récepteurs analogues (*Toll-like receptors*) TLR-2 et non les TLR-4 (**Backert et Clyne, 2011**). Dans certaines souches, des chaînes latérales sur le LPS miment les antigènes sanguins du groupe Lewis Le<sup>x</sup> et Le<sup>y</sup>. La membrane se prolonge pour former une gaine recouvrant les flagelles. La combinaison de flagelles gainés, de LPS hypo inflammatoires et le mimétisme moléculaire réduit la réponse de l'hôte,

ce qui permet à l'organisme de persister avec une pathologie minime. En outre, *H. pylori* forme au niveau de la membrane externe des extrusions qui apparaissent hors de la surface de la bactérie. Ces vésicules membranaires externes contiennent des composants associés à la membrane cytoplasmique et, notamment CagA et d'autres facteurs de virulence (Olofsson *et al.*, 2010a). En plus d'être un mécanisme de délivrance du facteur de virulence, les vésicules de membrane externe peuvent servir de cibles fictives pour le système immunitaire, ce qui facilite l'évasion immunitaire. *H. pylori* exerce son pouvoir pathogène par l'intermédiaire de plusieurs facteurs de virulence, présentés dans le tableau I.

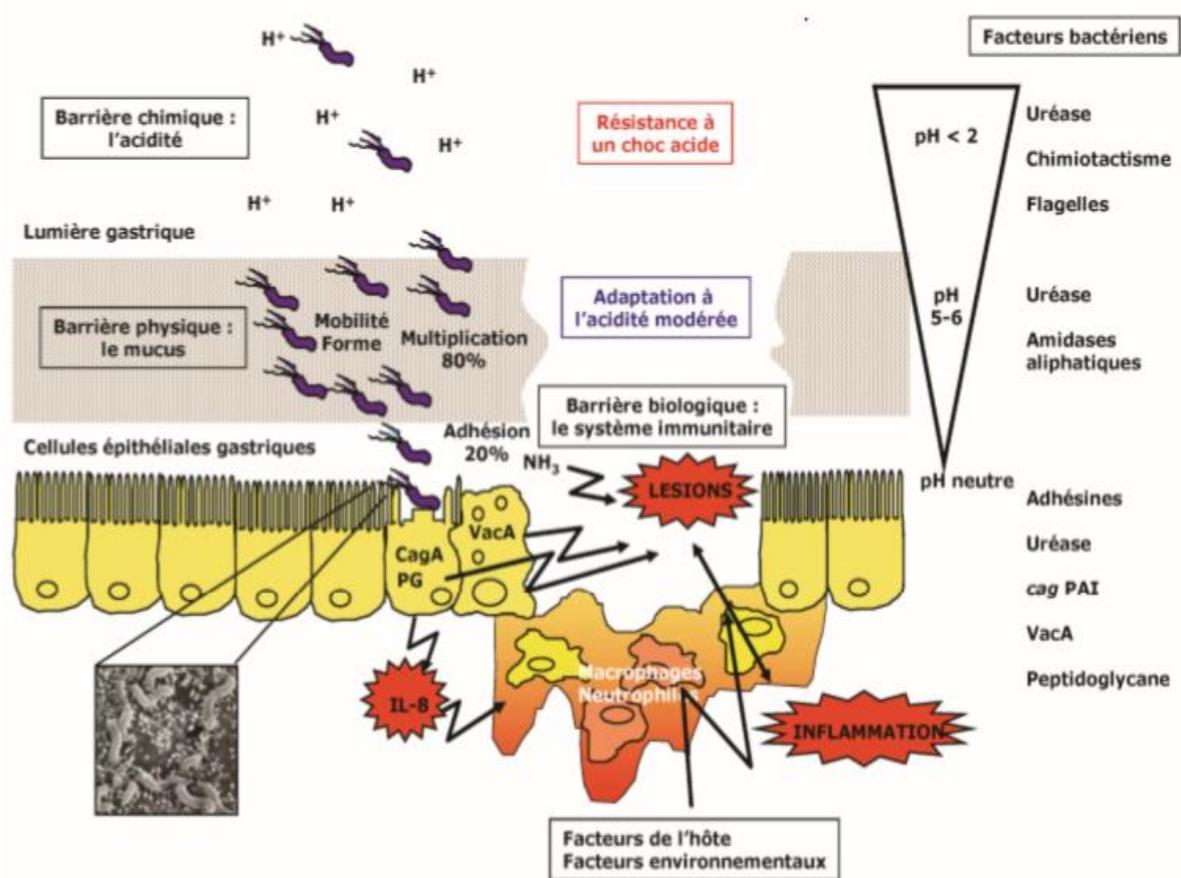


Figure 7: Colonisation de la muqueuse gastrique et genèse des lésions par *H. pylori* (Breurec, 2011)

**Tableau I: Facteurs de virulence de *H. pylori* et fonctions (Wang, 2014)**

<b>Facteurs de virulence</b>	<b>Fonctions</b>
<b>Colonisation de la cellule hôte</b>	
Urease	Tampons d'acide gastrique, effet toxique sur les cellules épithéliales, perturbe les jonctions serrées de la cellule, et antigène de gainage
Flagelle	Mouvements actifs par le biais de la mucine
BabA	Adhésine
SabA	Adhésine
HopZ	Adhésine
AlpA/B	Adhésine
<b>Survie de <i>H. pylori</i></b>	
Nox1	Résistance à la destruction par les phagocytes, inflammation du site infecté
Superoxyde dismutase	Résistance à la destruction par les phagocytes
Catalase	Résistance à la destruction par les phagocytes
Phospholipase A	Digestion des phospholipides dans les membranes cellulaires
Alcool déshydrogénase	Lésion de la muqueuse gastrique
<b>Inflammation et lésions tissulaires</b>	
Vac A	Cytotoxicité
Cag A PAI	31 gènes codant pour le système de sécrétion de type IV
Cag A	Cytotoxicité
Oip A	Provoque l'inflammation, en particulier pour l'IL-8
Dup A	Provoque l'inflammation via CagA, OIPA et / ou VacA
HP-NAD	Activation des neutrophiles
Antigènes Lewis x et y	Mimique moléculaire, autoimmunité
LPS	Faible toxicité
<b>Autre</b>	
Ice A	Homologue du type II de l'endonucléase de restriction

*H. pylori*: *Helicobacter pylori*; *BabA*: Blood-group-antigen-binding adhesion; *SabA*: Sialic acid-binding adhesion; *HopZ*: *H. pylori* outer membrane protein; *Vac A*: Vacuolating cytotoxin A; *CagA*: Cytotoxin associated gene antigen; *DupA*: Duodenal ulcer promoting A; *HP-NAP*: *H. pylori*

*neutrophil activation protein; IceA: Induced by contact with epithelium factor antigen; LPS: Lipopolysaccharide; Nox1: NADPH oxidase 1; OipA: Outer inflammatory protein A; IL: Interleukin.*

### **III.3.1. Adhésines de *H. pylori***

Les adhésines bactériennes sont des protéines de surface cellulaire qui permettent l'adhérence des bactéries aux cellules. L'adhérence des pathogènes aux cellules des muqueuses épithéliales est l'étape importante nécessaire à la fois pour la colonisation et la pathogénèse. L'adhérence de *H. pylori* à la muqueuse gastrique est importante pour la protection des mécanismes tels que le pH acide, le mucus, et l'exfoliation (**Smolka et Backert, 2012**). L'adhérence de *H. pylori* à l'épithélium gastrique facilite la colonisation, la persistance de l'infection et la délivrance des facteurs de virulence à l'intérieur des cellules épithéliales. Environ 4% du génome de *H. pylori* code pour des protéines de la membrane externe dont l'expression est fortement associée aux pathologies gastroduodénales ce qui augmente le risque du cancer (**Dossumbekova et al., 2006**). Les facteurs adhésifs de *H. pylori* appartiennent à la plus grande famille des protéines de la membrane externe (OMP) de la bactérie, nommée, la famille de Hop. La famille Hop est composée des adhésines plus connues de *H. pylori* comme *BabA*, *SabA*, *l'AlpA/B*, *HopZ* et *OipA*.

#### **III.3.1.1. Adhésion de liaison à l'antigène de groupe sanguin A (BabA)**

BabA est la première adhésine de *H. pylori* découverte, elle intervient dans la liaison de la bactérie aux antigènes Lewis<sup>b</sup>. BabA est une protéine à 78 kDa codée par le gène *babA2* et se lie à l'antigène de groupe sanguin Lewis<sup>b</sup> fucosylé situé à la surface des cellules épithéliales (**Ilver et al., 1998**). Il a été démontré que la présence du gène de *babA* est en corrélation avec la présence de la cytotoxine-associée au gène A (*CagA*) et cytotoxine vacuolisante gène A (*VacA*), et la présence de l'ensemble des trois gènes augmente le risque de gastrite, ainsi que la maladie ulcéreuse, un cancer gastrique et un lymphome MALT (**Gerhard et al., 1999**). La liaison BabA/Lewis<sup>b</sup> semble également être impliquée dans l'induction de cassures double brin de l'ADN et par conséquent des dommages de l'ADN dans les cellules hôtes (**Toller et al., 2011**).

#### **III.3.1.2. Système de liaison acide sialique (SabA)**

SabA est une adhésine qui se lie à la structure sialylée de l'antigène Lewis<sup>x</sup> exprimé à la surface des cellules épithéliales, protéine à 70 kDa (**Mahdavi et al., 2002**). Elle est associée au risque de développement de cancer gastrique mais pas au risque d'ulcère duodéal

(Yamaoka *et al.*, 2006). L'expression de l'antigène sialylé Lewis<sup>x</sup> est induite durant l'inflammation gastrique chronique, ce qui indique que *H. pylori* peut moduler les motifs de glycosylation des cellules de l'hôte pour améliorer l'adhérence et la colonisation (Unemo *et al.*, 2005; Mahdavi *et al.*, 2002). SabA est régulée par variation de phase de façon à ce que son expression soit rapidement induite ou désactivée pour s'adapter aux changements de la niche gastrique (Yamaoka *et al.*, 2006).

### III.3.1.3. Adhérence associée à la lipoprotéine A et B (AlpA/B)

Les protéines coproduites AlpA et AlpB sont impliqués dans l'adhésion au tissu gastrique (Odenbreit *et al.*, 1999). Les deux protéines peuvent se lier à la souris laminine *in vitro* (Senkovich *et al.*, 2011) et entraîner l'induction de l'IL-6 et IL-8 dans des lignées de cellules gastriques (Lu *et al.*, 2007). L'absence de l'AlpA ou AlpB réduit non seulement la charge bactérienne dans l'estomac de porc de Guinée et un modèle de gibier d'infection par *H. pylori*, mais aussi conduit à réduire la colonisation bactérienne dans les souris C57BL/6 (Lu *et al.*, 2007).

### III.3.1.4. Protéine de la membrane externe de *H. pylori* (HopZ)

Des études ont montré par immunofluorescence la présence de HopZ (74 kDa) sur des cellules *H. pylori*. De plus, HopZ semble médier l'adhésion à l'épithélium gastrique des lignées cellulaires comme la liaison bactérienne est significativement réduite par HopZ chez les souches knock-out. La fonction exacte de HopZ n'est toutefois pas encore claire. Le récepteur hôte pour HopZ est encore inconnu. Le gène *hopZ* code pour une protéine qui, par immunofluorescence, a été localisée à la surface de la bactérie. Une souche mutante knock-out a montré une liaison significativement réduite à la lignée cellulaire AGS, par rapport à la souche de type sauvage correspondante (Peck *et al.*, 1999). L'absence de production de *HopZ* n'a pas affecté la capacité de la bactérie à coloniser l'estomac des cobayes (de Jonge *et al.*, 2004). Cependant, un rôle pour *HopZ* dans la colonisation *in vivo* a été proposé, car la suppression de *hopZ* réduisait la capacité de *H. pylori* à survivre dans un modèle de souris transgéniques sans germe de gastrite atrophique chronique (Giannakis *et al.*, 2009). En outre, l'une des rares différences identifiées dans les souches de *H. pylori* isolées chez des volontaires infectés était un commutateur OFF/ON dans le gène *hopZ* à phase variable, suggérant une forte sélection *in vivo* de HopZ pendant la colonisation (Kennemann *et al.*, 2011). Semblable à OipA, le récepteur hôte de HopZ n'a pas encore été identifié et constituera un défi majeur pour les recherches futures.

### III.3.1.5. Protéine inflammatoire externe (Oip A)

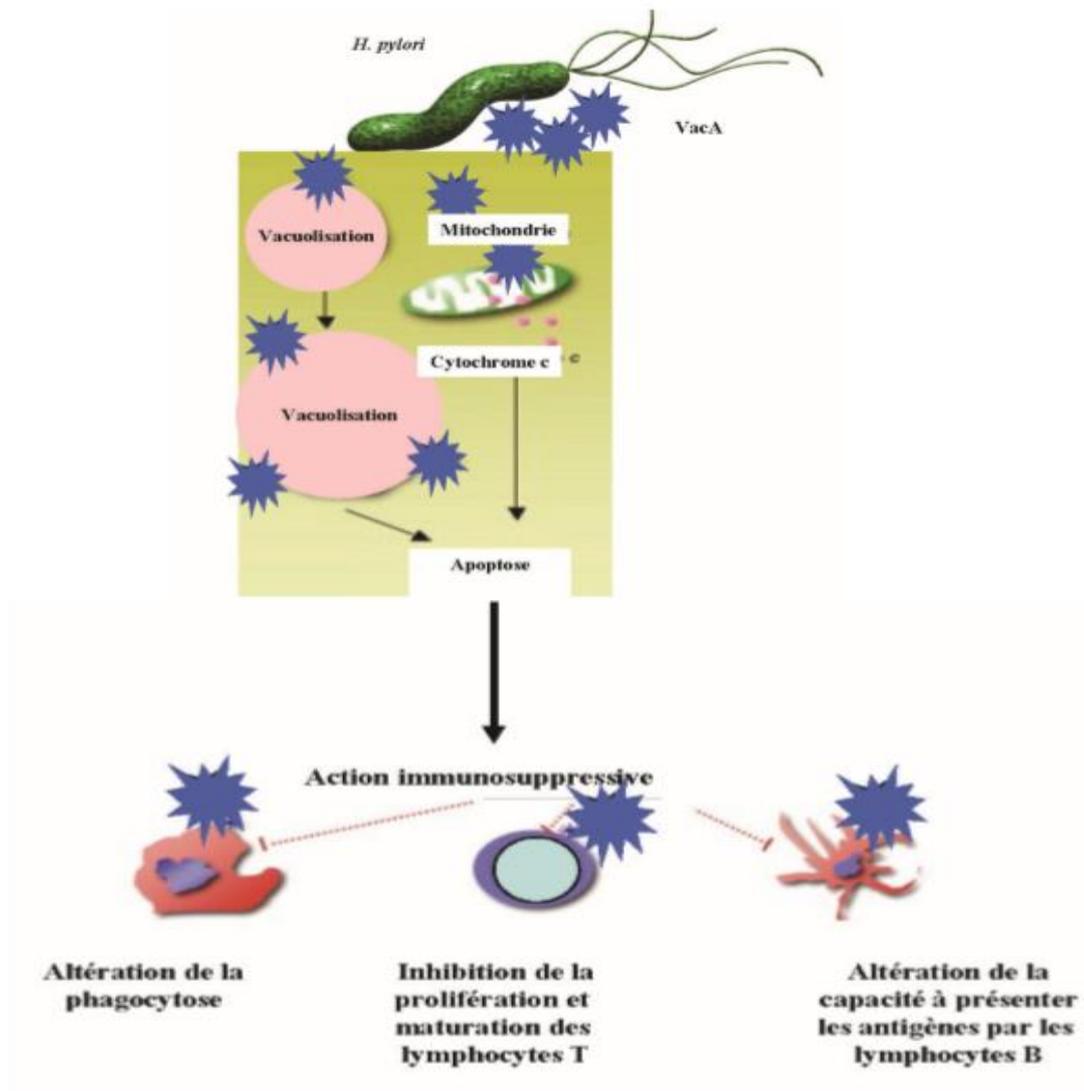
OipA est une protéine membranaire inflammatoire de 35 kDa appartenant à la famille OMP (Yamaoka *et al.*, 2000). La présence chez *H. pylori* du gène OipA fonctionnel est fortement associée aux ulcères duodénaux, au cancer gastrique et à des infiltrations accrues de polynucléaires neutrophiles (Franco *et al.*, 2008; Yamaoka *et al.*, 2006). L'expression de OipA est associée à une production élevée d'IL-8 *in vitro* (Yamaoka *et al.*, 2004). OipA joue un rôle dans l'induction de l'inflammation gastrique et la production des cytokines inflammatoires IL-1, IL-17 et TNF- $\alpha$  chez les gerbilles de Mongolie (Sugimoto *et al.*, 2009). Elle contribue également à l'induction de la métalloprotéase matricielle 1 (MMP-1) fortement associée au cancer gastrique (Wu *et al.*, 2006).

### III.3.1.6. Gène favorisant l'ulcère duodéal (Dup A)

Le gène Dup A est situé dans la zone de plasticité du génome de *H. pylori* et semble être un marqueur de virulence. *In vitro*, Dup A augmente la production d'IL-8 (Lu *et al.*, 2005). L'association entre la présence de Dup A et le risque élevé de développement d'ulcère duodéal et/ou cancer gastrique est très variable d'une population à l'autre (Wroblewski *et al.*, 2010).

### III.3.2. Cytotoxine vacuolisante (VacA)

La majorité des souches de *H. pylori* possèdent un gène VacA fonctionnel qui code pour une cytotoxine de 87 kDa induisant la vacuolisation des cellules épithéliales (Harris *et al.*, 1996; Schmitt et Haas, 1994). Les souches exprimant vacA sont plus fréquemment associées aux patients ayant développé des ulcères et des cancers gastriques (Hou *et al.*, 2000; Atherton *et al.*, 1997). La protéine VacA, assemblée en hexamère, forme des canaux à anions au niveau des endosomes cellulaires. La perturbation de l'homéostasie des endosomes par VacA provoque leur gonflement aboutissant à la vacuolisation des cellules (Iwamoto *et al.*, 1999). VacA perturbe également le fonctionnement de la mitochondrie, et la voie des caspases 3 et 8, participant à l'induction de l'apoptose dans les cellules infectées (Rudi *et al.*, 1998) (Figure 8).

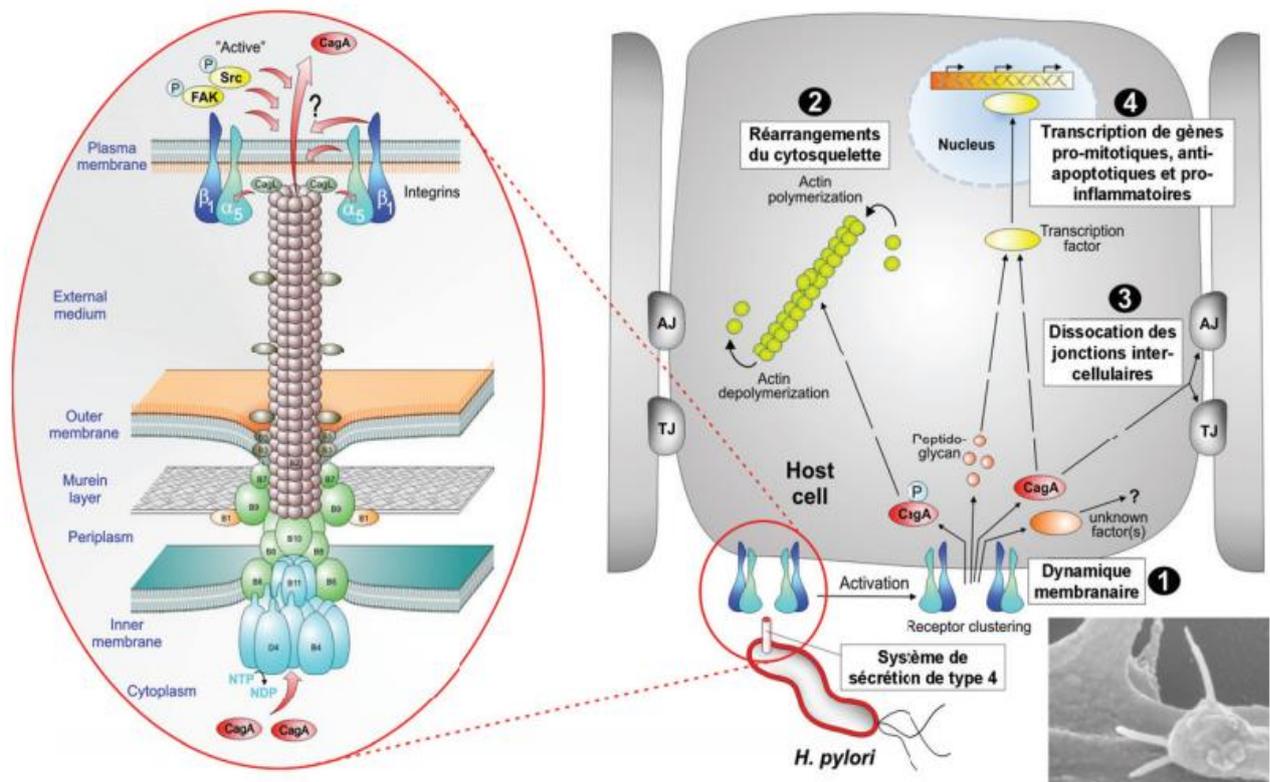


**Figure 8: Effets pathologiques de Vac A sur les cellules de l'hôte (Breurec, 2011)**

### III.3.3. Îlot de pathogénicité Cag (Cag PAI)

L'îlot de pathogénicité *Cag* (Cag PAI) est un fragment d'ADN d'environ 40Kb composé d'environ 27 à 31 gènes. Cet îlot code pour un système de sécrétion type IV (SSTIV) permettant la translocation de la protéine CagA, du peptidoglycane ainsi que d'autres éléments à l'intérieur de la cellule épithéliale (Akopyants *et al.*, 1998; Censini *et al.*, 1996; Covacci *et al.*, 1993). L'appareil consiste en une douzaine de protéines (VirB 1-11 et VirD4) assemblées pour former 3 sous-parties interconnectées : un complexe cytoplasmique/intracellulaire, un canal couvrant la double membrane et un pilus externe (Figure 10). Associé aux pathologies cliniques, Cag PAI est un facteur de virulence déterminant d'*H. pylori* et les souches comportant cet îlot augmentent le risque de

développement de gastrite atrophique et de cancer gastrique par rapport aux souches qui en sont naturellement dépourvues (Figure 9) (Odenbreit *et al.*, 2000).



**Figure 9: Représentation schématique simplifiée des conséquences de la signalisation induite par le SST4 de *H. pylori* dans les cellules épithéliales gastriques (Backert et Selbach, 2008)**

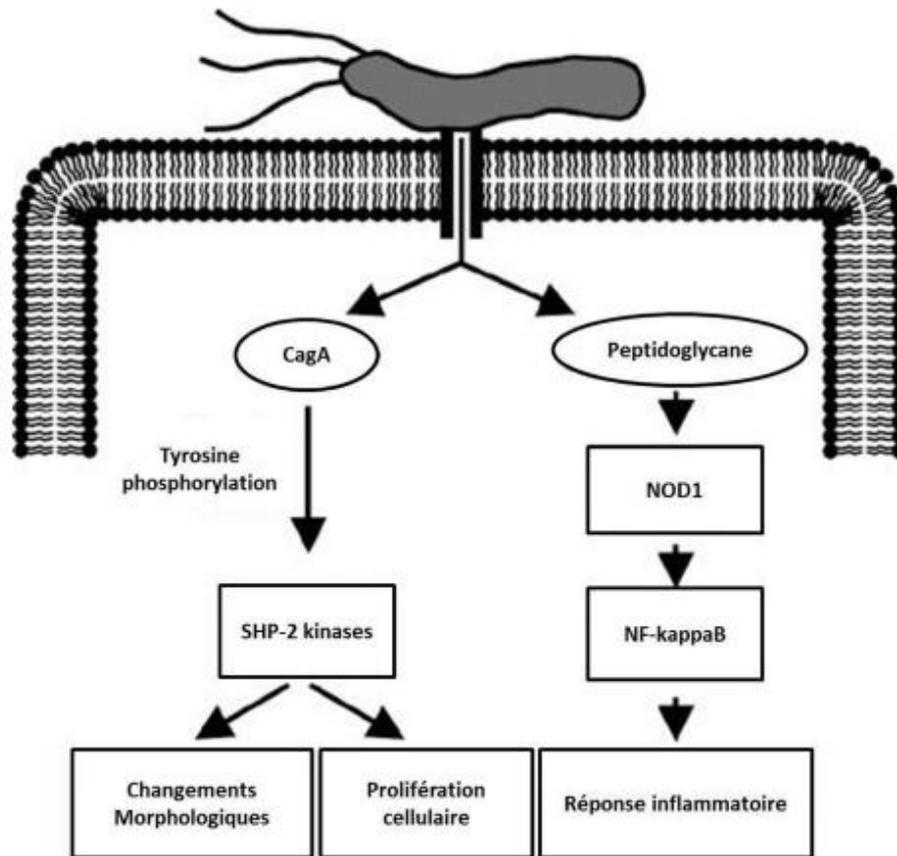
### III.3.4. Cytotoxine associée au gène A (Cag A)

Cag A, cytotoxine associée au gène A (Cag A) est le facteur de virulence le plus important et le mieux étudié; cependant, il ne fonctionne pas isolément. Les souches Cag A positif de *H. pylori* sont associées à une plus grande inflammation et un risque accru d'ulcère et de cancer chez les humains et les animaux en expérience (Blaser, 1994; Tummuru *et al.*, 1993; Marshall et Warren, 1984; Warren et Marshall, 1983). Le gène Cag A fait partie d'un îlot de pathogénicité qui code également pour les composants d'un appareil de sécrétion de type IV (SST4). Des études destinées à identifier des marqueurs associés aux formes les plus virulentes de la bactérie ont conduit à l'identification de la protéine Cag A (Covacci *et al.*, 1993). Le gène codant pour la protéine CagA est compris dans un îlot génomique, dénommé Cag-PAI (*Cag Pathogenicity Island*) (Censini *et al.*, 1996) comprenant de 27 à 31 gènes. Un groupe de gènes présents dans cet îlot possède d'ailleurs des homologies avec le

SST4 (**Akopyants et al., 1998**), rencontrés chez d'autres bactéries. Ces SST4 se comportent comme des « seringues moléculaires », permettant l'injection de matériel bactérien dans des cellules hôtes eucaryotes. L'un des gènes clés de *H. pylori* est le gène A associé à la cytotoxine (Cag A). Son produit, la toxine CagA, est injecté dans les cellules humaines par le SST4, codé par *H. pylori* dans l'îlot de pathogénicité de Cag (Cag-PAI) (Figure 10). À l'intérieur de la cellule hôte, Cag A est phosphorylé par les kinases de la cellule hôte (**Mueller et al., 2012; Selbach et al., 2003**). Un Cag SST4 fonctionnel est non seulement capable d'injecter Cag A dans des cellules hôtes (**Odenbreit et al., 2000**), mais il induit également une forte chimiothérapie pro-inflammatoire qui inclut l'inclusion de IL-8 et de IL-1 $\beta$  (**Lindholm et al., 1998**). La translocation du Cag A est codée par le SST4 et est associée au cancer gastrique ( **Vannini et al., 2014; Busler et al., 2006**). Cette relation entre *H. pylori* et le cancer gastrique a été interprétée par l'injection de la protéine Cag A dans des cellules épithéliales via le système SST4, qui se lie à plusieurs protéines cellulaires et conduit à une dérégulation de la division cellulaire et de la carcinogenèse (**Delgado et al., 2011**).

### III.3.5. Peptidoglycane (PG)

En plus de la protéine CagA, le SSTIV peut délivrer à la cellule épithéliale des composants du PG appartenant à *H. pylori*. Le PG injecté induit l'activation d'une réponse inflammatoire NF-kB dépendante conduisant à la sécrétion de l'IL-8 (Figure 10). La translocation de PG dans la cellule hôte entraîne l'activation d'autres voies de signalisation qui seraient associées à un risque accru de développement de cancer gastrique (**Backert et al., 2011**).



**Figure 10: Représentation schématique du rôle du système de sécrétion de type IV dans les changements morphologiques, prolifération cellulaire et l'immunomodulation au cours de l'infection à *H. pylori* (Kusters *et al.*, 2006)**

Le système de sécrétion de type IV (SST4) permet l'injection de Cag A et de fragments de peptidoglycane (PG) dans la cellule. La reconnaissance du PG par le récepteur cytoplasmique NOD-1 conduit à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, qui déclenche la surexpression de cytokines pro-inflammatoires. Cag A interagit avec plusieurs protéines régulatrices (dont les tyrosine-kinases de la famille src) conduisant à une déstabilisation du cytosquelette d'actine et participe à l'activation de NF- $\kappa$ B.

### III.3.6. Flagelles et chimiotactisme

La colonisation de l'estomac par *H. pylori* dépend également de sa mobilité, conférée par ses 3 à 7 flagelles gainés. Des souches non-mobiles, mutées pour les protéines FlaA et FlaB (constituant le filament flagellaire chez *H. pylori*), ne sont pas capables d'instaurer une colonisation efficace et durable de l'estomac au contraire d'une souche sauvage (Andrutis *et al.*, 1997; Eaton *et al.*, 1996). Par conséquent, les flagelles entièrement fonctionnels semblent être un facteur clé de virulence. A l'instar de nombreuses espèces bactériennes mobiles, la

nage d' *H. pylori* est orientée par des systèmes chimio tactiles capables de percevoir divers stimuli du milieu extérieur, dont le gradient de pH. La capacité de la bactérie à se mouvoir en fonction du gradient de pH (ou pH-tactisme) est dépendante d'un récepteur membranaire appelé TlpB, essentiel pour la colonisation de l'estomac dans un modèle murin (Croxen et al., 2006). Un dernier facteur lié à la mobilité d' *H. pylori* dans le mucus gastrique est sa forme hélicoïdale, qui favoriserait sa pénétration dans la viscosité du mucus gastrique. Cette forme particulière est façonnée par la structure de sa paroi de peptidoglycane.

### III.3.7. Lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS, situé à la surface bactérienne, est uniquement présent chez les bactéries gram négatif. Il se compose d'une chaîne antigénique O exposée à la surface de la bactérie, d'une région polysaccharidique centrale appelée core et d'une région lipidique (lipide A) ancrée dans la membrane externe. Il joue un rôle clé dans l'activation du système immunitaire et la réponse inflammatoire. Il stimule la libération des cytokines notamment IL-8 et active les monocytes. Il inhibe la synthèse de mucine et stimule la sécrétion de pepsinogène, précurseur de la pepsine dans le catabolisme des protéines (**Kusters et al., 2006**). Il a été observé que jusqu'à 85 % des souches de *H. pylori* sont porteuses d'antigènes Lewis qui correspondent à l'antigène O (**Simoons et al., 1996**). Une particularité unique est la présence au niveau de l'antigène O de motifs antigéniques de type Lewis, Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup> dans 80 à 90 % des souches ou plus rarement Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Le<sup>c</sup> ou Le<sup>x</sup>-sialylé. Les antigènes Lewis sont normalement présents au niveau de la surface des cellules eucaryotes telles que les érythrocytes et les cellules épithéliales de la muqueuse gastrique. La synthèse des antigènes Lewis est sous la dépendance de trois fucosyl-transférases, FutA, FutB et FutC, leur expression pouvant être modulée par un mécanisme de variation de phase, créant une population microbienne avec des profils de glycosylation du LPS très divers. De fait, il a été proposé que le LPS de *H. pylori* puisse jouer un rôle dans l'échappement de la bactérie au système immunitaire (**Moran et Prendergast, 2001**).

### III.3.8. Uréase ou urée aminohydrolase

L'uréase est un déterminant crucial de la virulence de *H. pylori*. Elle intervient à la fois dans le mécanisme de colonisation, de survie et de pathogénicité. Elle est commune à toutes les souches de *H. pylori*. Molécule hexamère contenant du nickel, elle catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et dioxyde de carbone. Simultanément, l'acide carbamique se décompose en acide carbonique et en une seconde molécule d'ammoniac (Figure 11). La

molécule d'ammoniac étant une base faible, élève le pH, rendant ainsi l'environnement confortable pour *H. pylori* à coloniser l'estomac (**Rutherford, 2014b; Konieczna et al., 2012b**). Une quantité importante d'ammonium favorise également le développement de produits chimiques cytotoxiques tels que la monochloramine qui endommage les tissus. De plus, l'acide carbonique, autre produit du processus catalytique, diminue l'activité antimicrobienne du peroxydite, un métabolite de l'oxyde nitrique. Ce qui protège par conséquent les bactéries (**Kuwahara et al., 2000**). L'uréase est composée de seulement deux sous-unités protéiques UreA et UreB avec un rapport de 1:1, contrairement aux autres bactéries uréolytiques qui ont en plus une autre sous-unité UreC. Il est à noter que les uréases bactériennes sont activées par les protéines supplémentaires UreD, UreE, UreF, UreG et UreH par un processus complexe (**Konieczna et al., 2012b; Rutherford, 2014b**). Le ciblage de ces protéines ainsi que de leurs gènes respectifs peut conduire à une formulation idéale de médicaments visant à la dérégulation de la colonisation de *H. pylori*.

L'enzyme uréase et son activité par laquelle *H. pylori* colonise l'hôte, serait une cible ultime pour l'éradication de *H. pylori*. Par conséquent, si l'uréase peut être arrêtée, la bactérie n'aurait pas l'avantage d'inhiber les conditions acides de l'estomac. Bien que les médicaments disponibles agissent sur l'ensemble des facteurs de l'uréase, il convient de s'intéresser à ses protéines UreA et UreB, ainsi qu'à UreD, UreE, UreF, UreG et UreH, d'où la possibilité de se concentrer sur leurs gènes respectifs. Par conséquent, le traitement de l'infection à *H. pylori* reste un défi en raison de la résistance aux antibiotiques.

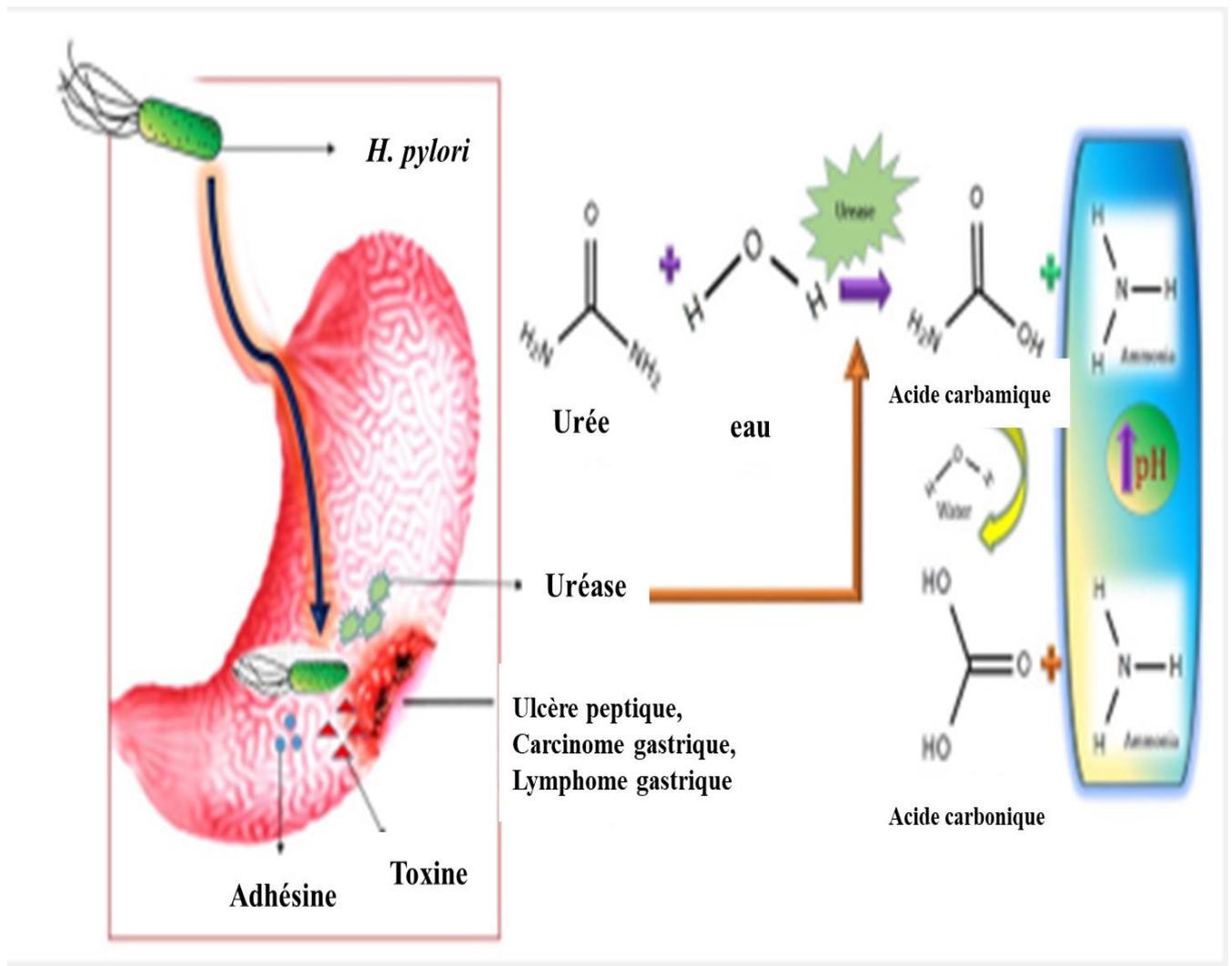


Figure 11: Hydrolyse de l'urée (Keya, 2018)

### III.3.9. Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)

La découverte selon laquelle gamma-glutamyl transférase (GGT) de *H. pylori* fonctionne comme un facteur de virulence est surprenante, étant donné qu'elle n'a pas été identifiée comme un facteur de virulence chez d'autres bactéries (Chevalier *et al.*, 1999). En outre, elle semble être périplasmique plutôt qu'associée à la surface ou sécrétée. Sa présence dans des vésicules de la membrane externe (Olofsson *et al.*, 2010b) peut faciliter les interactions avec les cellules hôtes. La GGT augmente la sécrétion d'IL-8 et la production de peroxyde d'hydrogène dans les cellules épithéliales et est associée au développement de l'ulcère gastro-duodéal (Gong *et al.*, 2010). Elle contribue également à la colonisation, la persistance et la tolérisation des cellules dendritiques (Oertli *et al.*, 2013). La dégradation du glutathion induite par la GGT produit des composés pro-oxydants qui facilitent la formation d'espèces

réactives de l'oxygène. Ce mécanisme pourrait être responsable des dommages du tissu de l'hôte (Flahou *et al.*, 2011).

#### **IV. Transmission de l'infection à *H. pylori***

À partir de l'estomac, *H. pylori* peut être éliminé par vomissement, se retrouver dans la bouche par régurgitation, et être éliminé dans les selles.

##### **IV.1. Transmission gastro-orale**

La prévalence plus élevée de l'infection chez les gastro-entérologues évoque une contamination par des microgouttelettes de jus gastrique lors des endoscopies (Hildebrand *et al.*, 2000). Ce mode de transmission a été évoqué pour les jeunes enfants chez qui le reflux gastro-intestinal et les vomissements sont fréquents (Leung *et al.*, 1999). Un argument indirect a été apporté par une étude épidémiologique qui a montré que la présence d'un individu infecté présentant une gastroentérite avec vomissements était associée à un risque d'infection 6 fois plus élevé pour la communauté habitant sous le même toit (Perry *et al.*, 2006). Dans une étude réalisée par Parsonnet *et al.* (1999) tous les échantillons de vomissements de personnes infectées étaient positifs, ainsi que 37 % des échantillons d'air prélevés lors de l'épisode de vomissement. Deux autres études ont également montré la présence de *H. pylori* par culture à partir des vomissements (Leung *et al.*, 1999). Par ailleurs, il a été montré par biologie moléculaire que la bactérie était 600 fois plus abondante dans les vomissements que dans les selles (Janzon *et al.*, 2009).

##### **IV.2. Transmisssion oro-orale**

*H. pylori* pouvant être présent dans la bouche des mères suite à des régurgitations pourra être transmis aux enfants. La prémastication d'aliments par la maman a été également avancée comme source de contamination de leurs enfants dans différentes populations (Azevedo *et al.*, 2009). Les vomissements sont fréquents dans l'enfance et l'hygiène et les conditions sanitaires des foyers en général déficientes. De ce fait, il est facile de comprendre que les enfants qui portent tout à la bouche puissent se contaminer. De plus, l'étude de Parsonnet *et al.* (1999) a montré que lors du vomissement, il y a aérosolisation de *H. pylori*. Des boîtes de Pétri placées à 30 cm de 6 sujets qui vomissaient ont toutes permies la culture de *H. pylori* (Parsonnet *et al.*, 1999). Après recherche de *H. pylori* dans la cavité buccale par PCR et dans l'estomac par culture chez 94 personnes (Bürgers *et al.*, 2008), 17 % des individus infectés par *H. pylori* présentait également la bactérie au niveau de la cavité

buccale. Cependant, les résultats de la détection de *H. pylori* dans la cavité buccale par PCR restent contradictoires.

### **IV.3. Transmission féco-orale**

À partir des selles, on peut imaginer une transmission, comme elle existe pour les bactéries entéropathogènes. Il y aurait donc une synergie entre l'infection gastrique à *H. pylori* qui, par l'hypochlorhydrie qu'elle provoque dans sa phase initiale, faciliterait le passage des pathogènes entériques et les diarrhées, bien qu'à l'évidence *H. pylori* transite par l'intestin, cette bactérie n'est pas adaptée à ce milieu. Plusieurs auteurs ont suggéré une contamination via l'eau contaminée, la nourriture et les mains non lavées (Aziz et al., 2015; Brown, 2000). L'utilisation d'un « pot de chambre » pour recueillir les selles a été montrée être un facteur de risque dans une communauté indienne du Canada (Sinha et al., 2002). Elle est sensible à la bile et il est peu vraisemblable qu'elle survive au transit intestinal (Azevedo et al., 2007). Des essais de détection de *H. pylori* par PCR ou par méthode immuno-enzymatique (ELISA ou « *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* ») ont identifié la présence de la bactérie dans les selles de populations infectées (Ndip et al., 2004; Russo et al., 1999), mais il est essentiel de se rappeler que le fait de trouver de l'ADN ou un antigène de *H. pylori* n'implique pas forcément que les bactéries soient vivantes.

### **IV.4. Modes de transmission de l'infection**

Plusieurs études de typage génétique ont montré que l'acquisition de l'infection peut survenir à la fois de l'intérieur et de l'extérieur de la famille mais que la transmission intrafamiliale était prédominante (Kivi et al., 2003; Owen et Xerry, 2003; Vincent et al., 1994). Cependant, ces études comportaient un ou plusieurs biais majeurs : i) l'étude du mode de transmission de l'infection est compliquée par la possibilité d'une infection mixte chez un même individu, paramètre qui n'a en général pas été pris en compte, un seul isolat dans une région précise de l'estomac a été le plus souvent investigué, ii) les méthodes utilisées manquaient bien souvent de pouvoir discriminant pour identifier des différences génétiques entre isolats par les méthodes suivantes (ribotypage, *PCR-based restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis*, *random amplified polymorphism DNA (RAPD) analysis*, séquençage d'un nombre limité de gènes de ménage). De plus, ces études ont été réalisées dans des familles vivant dans des pays développés et aucune n'avait été réalisée dans des pays en voie de développement.

Plusieurs études récentes ont essayé de prendre en compte ces paramètres. La diversité génétique de *H. pylori* a été étudiée de façon large au sein de l'estomac d'une famille dont les parents sont nés en Algérie et les quatre enfants en France (**Raymond et al., 2008, 2004**). Pour chaque membre de la famille, 9 à 10 isolats présents au niveau de l'antrum et du fundus ont été caractérisés par séquençage de deux gènes de ménage (*glmM* et *hspA*). Plusieurs clones ont été retrouvés dans l'estomac de chacun des individus. L'étude de la diversité génétique globale montrait une circulation intrafamiliale des clones, entre parents et enfants mais aussi entre frères et sœurs. De façon intéressante, un enfant possédait sa propre souche non retrouvée chez les autres membres de la famille.

Une autre étude a analysé la diversité génétique d'isolats de *H. pylori* dans deux familles de 52 individus vivant en milieu rural en Afrique du Sud et dans 11 familles de 43 individus vivant en milieu urbain au Royaume Uni, aux Etats-Unis, en Corée du Sud et en Colombie (**Schwarz et al., 2008**) par analyse de la diversité de sept gènes de ménage. La circulation intrafamiliale de souches était beaucoup plus fréquente en milieu urbain, suggérant une transmission entre parents et enfants ou entre frères et sœurs. Dans les familles sud-africaines, la diversité génétique était beaucoup plus importante et aucune similitude n'a été retrouvée entre les souches hébergées par les parents et les enfants, ni entre les souches présentes chez les individus vivant sous le même toit. Cependant, un seul isolat de l'antrum et du fundus a été investigué par séquençage chez la presque totalité des membres des familles, impliquant une probable sous-estimation du nombre d'infections mixtes par rapport à l'étude précédente. Le mode de transmission de *H. pylori* dans des zones de forte prévalence de l'infection tel que dans un milieu rural en Afrique du Sud, semblait être différent de celui rencontré dans des zones de faible ou moyenne prévalence de l'infection. La transmission par l'eau et les aliments, la promiscuité pourraient jouer un rôle plus important dans les pays en développement, conséquence probable de différences dans le mode de vie et de culture. Récemment, la diversité génétique de dix isolats de *H. pylori* de l'antrum et du fundus collectés dans trois familles, deux françaises et une algérienne, a été analysée par séquençage de deux gènes de ménage et par étude du contenu génétique à l'aide de membranes d'hybridation à haute densité (**Raymond et al., 2008**). Les infections mixtes étaient rares dans les familles françaises puisque tous les individus n'hébergeaient qu'une souche dans leur estomac. Dans la famille algérienne, plusieurs enfants présentaient des infections mixtes. Deux à cinq souches circulaient à l'intérieur d'une même famille et une même souche était retrouvée au moins chez deux membres d'une même famille, arguments en faveur d'un modèle de transmission

intrafamiliale (notamment entre enfants et parents et entre frères et sœurs). De façon surprenante, la mère n'était pas impliquée dans la transmission dans les deux familles françaises.

Ces trois études ont apporté un éclairage nouveau sur le mode de transmission de l'infection: i) les infections mixtes semblent fréquentes dans les pays en développement, ii) le mode de transmission intrafamiliale semble prépondérant dans les pays développés, notamment entre frères et sœurs, et iii) le mode de transmission horizontale semble prépondérant dans les pays en développement.

#### **IV.5. Facteurs influençant la transmission de *H. pylori***

De nombreuses études à travers le monde ont montré qu'un niveau socio-économique bas est associé à une plus grande prévalence de l'infection à *H. pylori* et que le niveau socioéconomique dans l'enfance est considéré comme déterminant dans le risque d'acquisition de l'infection [pour une revue (**Ford et Axon, 2010; Jafri et al., 2010; Frenck et Clemens, 2003**)]. Un argument fort est une prévalence de l'infection plus forte chez le jumeau homozygote vivant dans le milieu le plus pauvre (**Malaty et al., 1998**). Les principaux facteurs de risque sont la promiscuité, le manque d'hygiène, de l'eau de boisson souillée, un partage du lit pendant l'enfance. D'autres facteurs ont été également identifiés comme un niveau d'éducation bas des parents (en particulier celui de la mère), le fait de ne pas allaiter au sein, des habitudes culturelles telles que la prémastication ou le partage de plats, le nombre de personnes dormant dans la même chambre, le nombre de frères et sœurs, les personnes âgées.

### **V. Traitement de l'infection à *H. pylori***

#### **V.1. Traitement utilisant les produits pharmaceutiques**

Le traitement de première ligne de l'infection par *H. pylori* recommandé par la conférence de consensus de 1999 est l'association aux inhibiteurs de pompes à proton (IPP), des antibiotiques amoxicilline, clarithromycine ou métronidazole chez les sujets allergiques aux bêtalactamines (Cette triple thérapie à base de clarithromycine est administrée pendant 7 jours). Il est admis que le traitement de première ligne doit être une association d'efficacité prouvée afin de réduire les risques d'échec et de résistance des souches. Depuis les années 2000, les taux d'éradication en intention de traiter (ITT) obtenus avec la trithérapie à base de clarithromycine ont diminué pour être actuellement inférieurs à 70 %. Cette diminution est particulièrement nette en Europe du Sud. Cette thérapie est de plus en plus confrontée au

problème de la résistance à la clarithromycine qui hypothèque le succès de l'éradication de *H. pylori*. Plusieurs études ont montré la résistance élevée au métronidazole (95,5%), clarithromycine (44,7%) et amoxicilline (85,6%) (**Al-Eraky et al., 2018; Harrison et al., 2017; Ndip et al., 2008**). Le traitement de seconde intention consiste à remplacer la clarithromycine par le métronidazole ou par une fluoroquinolone durant 10 à 14 jours. La trithérapie à base de fluoroquinolone est recommandée comme traitement de secours standard après un échec thérapeutique de première intention. D'une part, des tests moléculaires permettant de détecter *H. pylori* et sa résistance à la clarithromycine dans les selles sont actuellement proposés. D'autre part, une nouvelle spécialité pharmaceutique comprenant l'association de sels de bismuth et d'antibiotiques (tétracycline et métronidazole) a fait la preuve de son efficacité dans le traitement de première intention de l'éradication de *H. pylori*. Le sauvetage au bismuth est une option de traitement efficace, avec des taux d'éradication jusqu'à 97,6%. Malheureusement les études ont montré que sur un essai de traitement au quintuple concomitant de 7 jours contenant du bismuth, il existe des taux d'éradication efficaces, mais des effets secondaires accrus (**Demir et al., 2010**).

## **V.2. Recherche et alternative de traitement à base de plantes médicinales**

De nombreuses études portées sur les extraits de plantes ont montré les effets bénéfiques de ces extraits sur l'inhibition de la croissance de *H. pylori* (Tableau II) (**Lu et al., 2018; Parreira et al., 2017; Amin et al., 2013; Franklin et al., 2012; Bonacorsi et al., 2009; O'Mahony et al., 2005**); et sur l'inhibition de l'adhérence de *H. pylori* aux tissus d'estomac (**Huang et al., 2014; O'Mahony et al., 2005; Lengsfeld et al., 2004**).

Quelques composés ont montré leur effet dans l'inhibition de *H. pylori* et les adhésines (Tableau III).

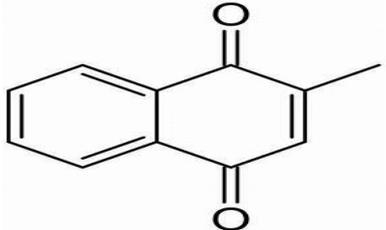
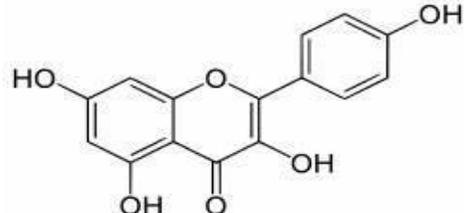
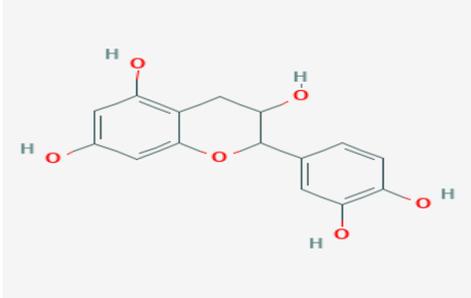
Au Cameroun, de nombreux travaux ont rapporté l'effet des extraits de plantes sur la croissance de *H. pylori*. C'est ainsi que les études de **Tan et al. (2006)** ont montré l'effet de 22 extraits de plantes sur la croissance de *H. pylori* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) comprise entre 0,39 et 12,5 mg/mL. De même, **Ndip et al. (2007)** ont évalué la CMI de 10 extraits méthanoliques de plantes. Dans cette étude, toutes les plantes présentaient une activité inhibitrice de la croissance de *Helicobacter pylori*, avec des diamètres d'inhibition compris entre 0 et 30 mm. La plus récente est l'étude de **Kouitchou et al. (2016)** qui a montré l'effet de trois plantes de la pharmacopée Camerounaise à savoir *Eryngium foetidum*, *Bidens*

*pilosa* et *Galinsoga ciliata* sur les isolats de *H. pylori* issus de l'Hopital Laquintinie de Douala, avec les CMI comprises entre 64 et 1024  $\mu\text{g/mL}$ .

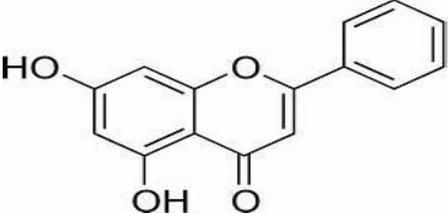
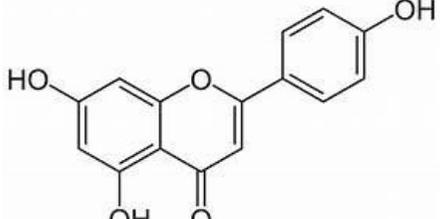
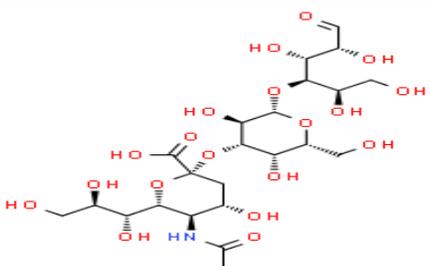
**Tableau II: Extrait de plantes anti-ulcère et éradication de *Helicobacter pylori***

<b>Plantes médicinales</b>	<b>Mode d'action</b>	<b>Propriétés biologiques</b>	<b>References</b>
<b><i>Korean red ginseng</i></b>	Inhibition de l'activité de la 5-lipoxygénase (5-LOX) induite par <i>H. pylori</i> ; prévention pro-inflammatoire d'interleukine (IL) -8 ou 5-LOX ARNm	Effet anti-inflammatoire; augmente l'éradication du taux de <i>H. pylori</i> ; réduction de l'inflammation gastrique et des dommages oxydatifs à l'ADN	Ricci <i>et al.</i> , 2002 ; Meshram <i>et al.</i> , 2015
<b><i>Allium sativum</i></b>	Inhibition de l'oxydation des lipoprotéines et baisse induction du glucose sérique par des enzymes antioxydantes	Antioxydant; effet suppressif de l'inflammation gastrique induite par <i>H. pylori</i> <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	Mital <i>et al.</i> , 2017
<b><i>Curcuma loga</i></b>	Inhibition de l'activité 5-LOX induite par <i>H. pylori</i>	Anti-inflammatoire; antioxydant	Tuorkey et Karolin, 2009
<b><i>Zingiber officinalis</i></b>	Inhibition de la PGE2 et des cellules pariétales H <sup>+</sup> ; K <sup>++</sup> - ATPase	Effet anti-inflammatoire; antioxydant	Pan <i>et al.</i> , 2008; Siddaraju et Dharmesh, 2007; Sripramote et Lekhyananda, 2003
<b><i>Zingiber zerumbet</i></b>	Mécanisme gastroprotecteur (augmentation significative du GSH antioxydant endogène, réduction du niveau de peroxydation lipidique)	Antioxydant, antiprolifératif, anti-inflammatoire, effet anti sécrétoire; réduction de la formation de la zone de l'ulcère	Sripramote et Lekhyananda, 2003; Ustün <i>et al.</i> , 2006
<b><i>Camellia sinensis</i></b>	Suppression de l'expression du gène du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF); inhibition de l'uréase	Antioxydant; améliore la fonction de la flore bactérienne intestinale	Asher <i>et al.</i> , 2017; Amber, 2015

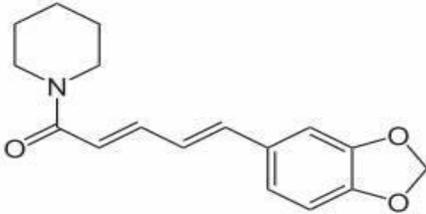
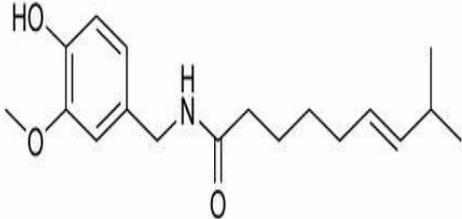
**Tableau III: Noms et structures de quelques composés anti- *Helicobacter pylori* et anti-adhérence**

Noms	Structure	Modèle expérimentale	Effet pharmacologique	Références
<b>Menadione</b>		Cellules adénocarcinome gastrique (AGS)	anti- <i>H. pylori</i> ; CagA; VacA, Il-1 $\beta$ , Il-6; Il-8; TNF- $\alpha$	Lee <i>et al.</i> , 2019
<b>Kaempférol</b>		Cellules cancéreuses gastriques	anti- <i>H. pylori</i> ; anti-inflammatoire	Escandón <i>et al.</i> , 2016; González <i>et al.</i> , 2019
<b>(-) épicatechine</b>		Cellules cancéreuses gastriques	anti- <i>H.pylori</i>	Escandón <i>et al.</i> , 2016

**Tableau III (suite): Noms et structures de quelques composés anti- *Helicobacter pylori* et anti-adhérence**

Noms	Structure	Modèle expérimentale	Effet pharmacologique	Références
<b>Chrysin</b>			Anti-inflammatoire; anti- <i>H. pylori</i>	González <i>et al.</i> , 2019
<b>Apigénine</b>		Muqueuse gastrique humaine	Anti-proliférative; anti-inflammatoire; anti- <i>H. pylori</i>	González <i>et al.</i> , 2019
<b>3-sialyllactose</b>		Cellules adénocarcinome gastriques	Anti-adhérence	Burger <i>et al.</i> , 2000; Lengsfeld <i>et al.</i> , 2004

**Tableau III (suite et fin): Noms et structures de quelques composés anti- *Helicobacter pylori* et anti-adhérence**

Noms	Structure	Modèle expérimentale	Effet pharmacologique	Références
<b>Pipérine</b>		<i>In vitro</i>	anti- <i>H. pylori</i> ; anti-adhérence	Tharmalingam <i>et al.</i> , 2014
<b>Capsaïcine</b>		<i>In vitro</i>	anti- <i>H. pylori</i>	Jones <i>et al.</i> , 1997

## **CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES**

## **II.1. Matériel**

### **II.1.1 Matériel végétal**

Quarante et une (41) plantes utilisées par les populations contre le mal d'estomac et les troubles digestifs ont été récoltées de juillet à septembre 2015 dans les localités de Bafia (Département du Mbam et Inoubou, Centre du Cameroun), Bazou (Département du Ndé, Ouest du Cameroun) et Foubot (Département du Noun, Ouest du Cameroun). L'identification des plantes a été faite à l'Herbier National du Cameroun à Yaoundé, à partir des feuilles, des graines et des fleurs en fonctions des différentes plantes collectées.

### **II.1.2. Souches bactériennes**

Dans le cadre du travail, nous avons utilisé deux (02) souches de *H. pylori* à savoir: la souche P12 de *H. pylori* (VacA et CagA positifs) obtenue de l'Institut Nigérian de Recherche Médicale de Lagos, la souche Hp G27 (VacA et CagA positifs) de *H. pylori* obtenue de l'Université de Bologne (Italie). La souche P12 a été isolée d'un ulcère duodénal chez un patient allemand et G27 chez un patient italien.

### **II.1.3. La bactérie *Escherichia coli* TOP10**

*E. coli* TOP10 a été utilisée pour l'amplification du plasmide pGEM-ureOP portant l'opéron d'uréase de la souche *H. pylori* G27 (Centre National de Biotechnologie NC\_011333.1) ayant servi à la génération de l'uréase produite en culture cellulaire a été offerte par l'Université de Bologne (Italie).

### **II.1.4. Tissus gastriques utilisés**

Les tissus gastriques des souris albinos de sexe male ont été utilisés dans le cadre de ce travail et ont été fournis par l'Hôpital Universitaire de Lagos (LUTH) du Nigéria.

### **II.1.5. Réactifs et appareils**

#### **II.1.5.1. Réactifs**

Fluorescéine-isothiocyanate (*FITC, Sigma*); le diméthylsulfoxyde (DMSO); *vancomycin 5,0 mg, trimethoprim 2,5 mg, cefsulodin 2,5 mg and amphotericin 2,5 mg* (Oxoid, United Kingdom), *silica-gel membrane adsorption for extraction of RNA (DATA SHEET, Jena Bioscience)*, *RT-PCR kit (DATA SHEET, Jena Bioscience)*, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-

phosphate/nitro bleu tétrazolium (BCIP/NBT) (Sigma, Allemagne), Serum de veau foetal; Claritromycine, Kanamycine, Ampicilline, serum fetal bovin ont été obtenu auprès (Oxoid, *United Kingdom*) anticorps primaire *Rabbit BabA* (78 KDa), *HopZ* (74 KDa) et *CagA* (120 KDa) fourni par le prof Haas Rainer (Institut Pettenkoferstr, Allemagne), *Secondary antibody anti-rabbit IgG*; *Polyvinylidene difluoride paper (PVDF)* (GE Healthcare, Allemagne).

### **II.1.5.2. Appareils**

Un Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC (*Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*). Incubateur (*Thermo Scientific, USA*); Spectromètre de masse à haute résolution Q Exactive (*Thermo Scientific, Bremen*); Spectrophotomètre (*Backman, USA*); *Isolera spectra one systems* (Biotage, Charlotte, NC, USA); Centrifugeuse réfrigérée (*Thermo Fischer Scientific*); Vortex; Microscope à fluorescence (*Advance Microscopy Groups*); Thermocycler Eastwin (*Life Science*); Lecteur de plaque (*PerkinElmer, EnSpire*), Balance à précision (*SARTORIUS*); Rotavapore (*HEIDOLPH WB 2000*); Agitateur magnétique (*HEIDOLPH*).

## **II.2. Méthodes**

### **II.2.1. Sélection sur la base d'un criblage anti *H. pylori* et anti adhérence, l'extrait de plante médicinale ayant la meilleure activité**

#### **II.2.1.1. Enquête ethnopharmacologique auprès des tradipraticiens**

##### **II.2.1.1.1. Site de l'étude**

Dans le cadre de cette étude, 3 sites ont été choisis dans les régions du Centre et de l'Ouest du Cameroun par convenance (Figure 12): Bafia (Région du Centre), Bazou et Foubot (Région de l'Ouest).

##### **- Bafia**

Bafia est situé dans le département du Mbam-Inoubou à environ 120 km au nord-ouest de Yaoundé, la capitale politique du Cameroun, situé dans la zone de transition entre la forêt et la savane. La région a un climat de type équatorial avec quatre saisons: deux saisons sèches (décembre à février et juillet) et deux saisons des pluies (mars à juin et août à novembre). Bafia comprend trois communautés rurales: Ikata, Bafia et Munyenge situé entre les longitudes 9,363E et 9,292E et les latitudes 4,329N et 4,401N. L'altitude de la zone varie de 87 à 168 m au-dessus du niveau de la mer. Il a une population hétérogène d'environ 25 018 habitants composée d'individus de plusieurs origines culturelles, y compris des indigènes

d'Oroko, Wimum, Kom, Metta, Ibo, Ngie, Ndop et Isimbi. L'activité principale de la population est l'agriculture, leurs principales cultures commerciales étant le cacao et les plantains. Les habitants pratiquent une agriculture paysanne dominée par le cacao et diverses cultures de subsistance. Ils pratiquent également l'élevage de petits animaux de porcs, moutons et chèvres. Les principaux groupes ethniques sont les Bafia, les Lemandé et les Yambassa. Il est limité au nord par Bafia, au sud par Yambassa, à l'ouest par Bokito et à l'est par Enangana (**Tiogué et al., 2020**).

#### - **Bazou**

Bazou est un village situé dans le département de Ndé (Ouest Cameroun). Il est situé entre 5° 05' 97 " N et 10° 46' 81 " E. La température moyenne dans cette zone est comprise entre 15,8 °C et 24,5 °C avec un pic atteignant 37 °C. Il est caractérisé par un type de climat tropical humide à deux saisons : une saison sèche allant de mi-novembre à Mars et une saison pluvieuse d'Avril à Octobre. La principale activité économique de la population de Bazou est l'agriculture. Le sol du Bazou varie (boueux et sableux), mais la plupart est sablonneux, humide avec une végétation en décomposition. En 2013, la population de bazou était estimée à environ 32000 habitants, d'une superficie 243km. Limité au nord par bangangté, au Sud par le Nord-Makombé à l'Ouest par Bana (Haut Nkam), à l'Est par Tonga (Ndé) et Bassamba. Les habitants sont réparties entre les Bazou, Balengou, Bakong, Bagnoun et Bossinga sont considérés comme les autochtones, et ceux issus des migrations entre autres les bamilékes venus d'autres horizons, les haoussas, les Beti, les Bamoun (**Tchakounté et al., 2018**).

#### - **Foumbot**

Foumbot est situé dans le département du Noun qui est situé entre la longitude 10°30 et 11°40 Est et la latitude 5° et 6° Nord, le Noun est un espace naturel particulier. Le climat qui sévit dans le Noun est de type soudano-guinéen caractérisé par deux saisons : une petite saison sèche de Novembre à mars avec une température moyenne comprise entre 30°-35°C et une grande saison de pluies de Mars à octobre avec une température moyenne comprise entre 27°-28°C. Les précipitations annuelles moyennes sont d'environ 2054 mm par an. Le réseau hydrographique du Département est dominé par quelques grands cours d'eau dont le Noun de l'ouest vers le Sud, la Mapé et le Mvî au Nord, le Nchi au Centre, le Nja et le Mwend au Sud. Ces petits fleuves et rivières sont presque tous des affluents de l'important fleuve Mbam qui porte dans le Noun le nom « Ripâ ». En harmonie avec son climat, son sol et son

hydrographie, le Noun dispose d'une végétation de transition entre la savane et la forêt. Cette végétation est progressivement altérée par la construction de nouvelles habitations, une intense agriculture et le pâturage. Le sol de couleur noire couvre la zone de Foubot et ses environs. A Fouban, et localités voisines, le sol est de couleur rouge. En 2008, la population du département du Noun était estimée à environ 800 000 habitants, avec une densité moyenne de 104 habitants / km<sup>2</sup>. La population, essentiellement rurale est composée de Bamoun en majorité (environ 88% de la population), Bamiléké, Tikar, Bororo, Haoussa et Nso, elle dépend principalement de l'agriculture, qui occupe 60% à 70% de sa population active et contribue à plus de 60% de sa richesse (Njouonkou *et al.*, 2016).

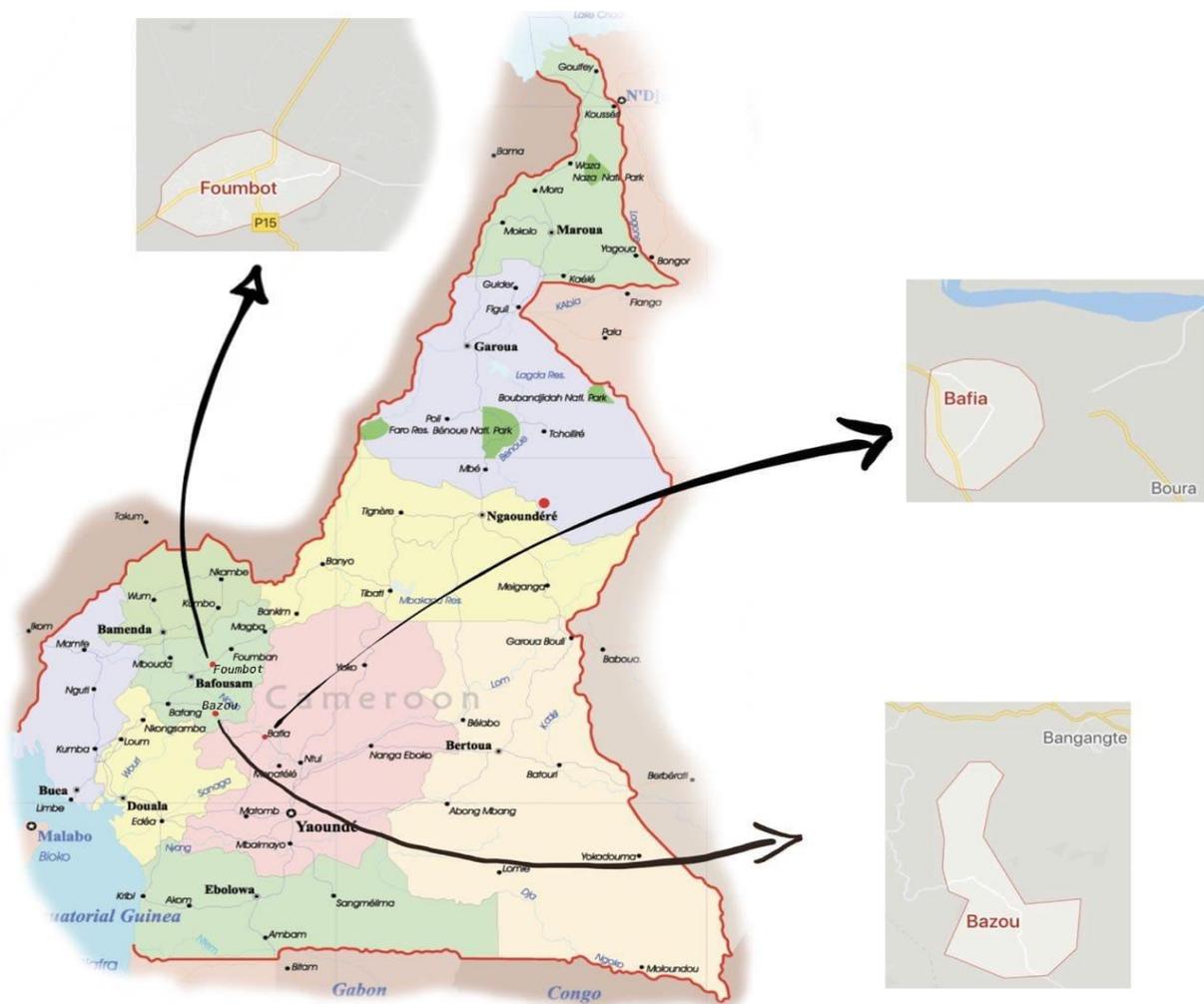


Figure 12: Sites d'étude; Bafia (Région du Centre), Bazou et Foubot (Région de l'Ouest) (Google Map)

### **II.2.1.1.2. Identification des tradipraticiens**

Les tradipraticiens ont été identifiés sur la base de nos connaissances sur les sites ciblés. Pour mener à bien cette enquête, nous avons rencontré directement, dans chaque site, les personnes ayant une connaissance sur le traitement du mal gastrique et les troubles digestifs à base des plantes médicinales. Avant l'entrevue, un accord de participation à l'enquête a été obtenu des tradipraticiens.

### **II.2.1.1.3. Réalisation de l'enquête ethnopharmacologique**

Les tradipraticiens contactés ont répondu à nos questions après s'être rassurés que leurs informations étaient uniquement destinées à des études scientifiques et non à un usage commercial. Le questionnaire (annexe 1) a porté sur les plantes médicinales utilisées par l'herboriste pour le traitement des douleurs d'estomac et troubles digestifs, le mode de préparation, les parties des plantes utilisées et la voie d'administration. Il a également été demandé à chaque herboriste de fournir des échantillons des espèces de plantes provenant de sa propre collection ainsi que du terrain. Les spécimens par plante médicinale ont été collectés sur le terrain, puis identifiés à l'Herbier national du Cameroun (HNC).

### **II.2.1.2. Préparation des extraits bruts, fractions et sous-fractions de l'extrait de plante active**

#### **II.2.1.2.1. Préparation des extraits bruts de plantes étudiées**

A cause de la diversité des solvants utilisés par les tradipraticiens pour préparer les extraits de plantes, le système solvant dichlorométhane/méthanol ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ ) (1:1, v/v) a été choisi pour la préparation des extraits afin d'extraire les composés polaire et apolaires.

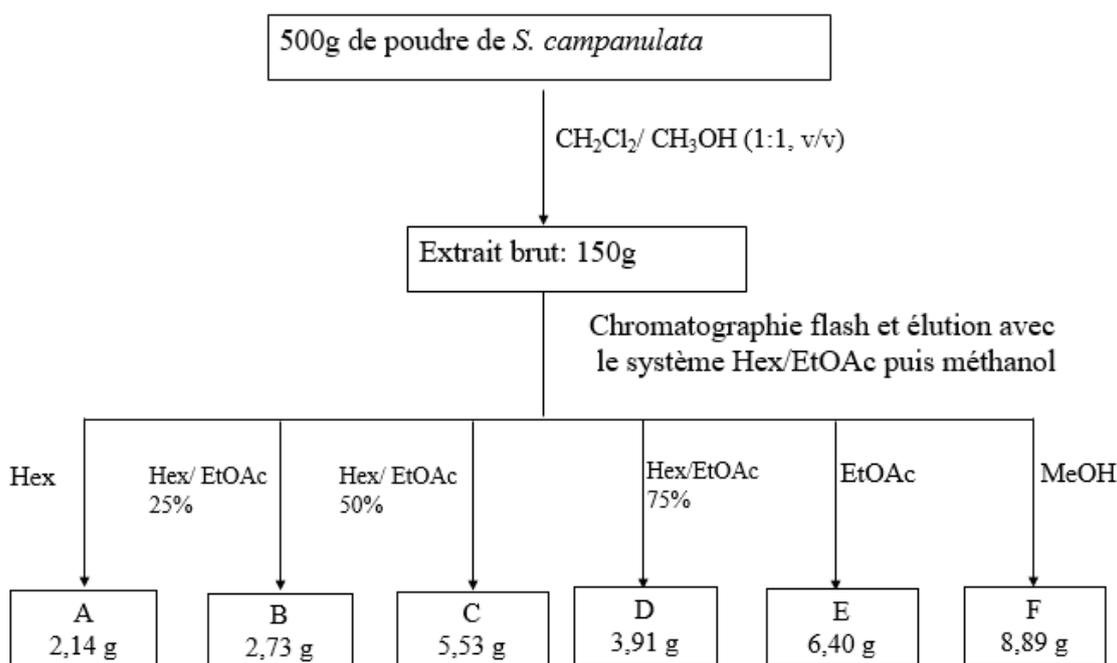
#### **➤ Mode opératoire**

Les feuilles, écorces et plantes entières en fonction des indications du tradipraticiens ont été lavées, séchées à l'air libre et à l'ombre pendant une à 2 semaines (en fonction de la partie de la plante utilisée) et broyées à l'aide d'un moulin électrique. Deux cent grammes de la poudre de chaque partie de plante obtenue ont été extraits, par macération dans 800 mL du système solvant dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )/méthanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (1:1, v/v) pendant 48 h et le processus répété deux fois. Les mélanges ont été agités régulièrement à l'aide d'une baguette de verre au cours de l'extraction. Les macérâts collectés ont été filtrés sur papier whatman N°1 et les filtrats concentrés sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait final obtenu de chaque plante a été séché à température ambiante et conservé à 20°C.

### II.2.1.2.2. Préparation des fractions de la plante active (*Spathodea campanulata*)

#### ➤ Mode opératoire

L'extrait au chlorure de méthylène/méthanol de *S. campanulata* a été fractionné sur gel de silice par Chromatographie flash en utilisant successivement l'hexane (Hex), l'acétate d'éthyle (AcEt) et le méthanol (MeOH). Huit stades de polarité ont été utilisés: Hex (Fraction A); Hex/AcEt 25% (fraction B); Hex/AcEt 50% (fraction C); Hex/AcEt 75% (fraction D); AcEt (fraction E); MeOH (fraction F). Pour toutes les fractions, le solvant a été éliminé au moyen d'un évaporateur rotatif et l'extrait conservé comme précédemment décrit (Figure 13).



**Figure 13: Diagramme de fractionnement de la plante active**

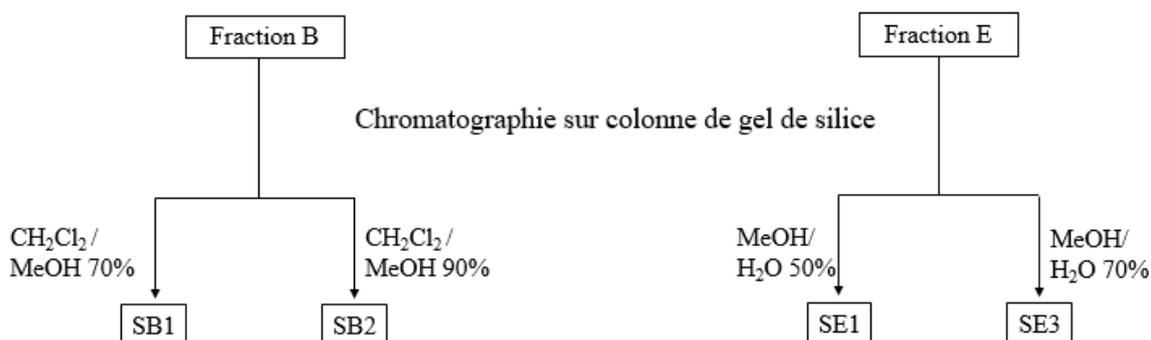
*Hex*: Hexane, *EtoAc*: Acétate d'éthyle, *MeOH*: Méthanol,  $CH_2Cl_2$ : Dichlorométhane, **A**: Fraction à l'hexane, **B**: Fraction à l'hexane/Acétate d'ethyle 25%, **C**: Fraction à l'hexane/Acétate d'ethyle 50%, **D**: Fraction à l'hexane/Acétate d'ethyle 75%, **E**: Fraction à l'Acétate d'ethyle, **F**: Fraction au méthanol

### II.2.1.2.3. Préparation des sous-fractions des fractions sélectionnées de *S. campanulata*

#### ➤ Mode opératoire

Les fractions ayant une meilleure activité, la B (Acétate d'éthyle 25%) et la E (Acétate d'éthyle) de *S. campanulata* ont ensuite été séparées par chromatographie sur colonne de gel de silice (*Biotage isolera one*) avec un solvant différent en fonction du résultat de la

chromatographie sur couche mince (CCM). Nous avons obtenu 4 sous-fractions selon leur profil chimique analysé par chromatographie sur couche mince, sous-fraction B1 et B2 (hex/AcEt à 70 et 90%); sous-fraction E1 et E3 (MeOH/H<sub>2</sub>O à 50 et 70%). Pour tout le fractionnement, le solvant a été éliminé des échantillons recueillis en utilisant un évaporateur rotatif (Figure 14).



**Figure 14: Diagramme de fractionnement des fractions B et E**

**B:** Fraction à l'hexane/Acétate d'éthyle 25%, **E:** Fraction à l'Acétate d'éthyle, **SB1:** sous-fraction à l'hexane/Acétate d'éthyle 70%, **SB2:** sous-fraction à l'hexane/Acétate d'éthyle 90%, **SE1 :** sous-fraction au méthanol/H<sub>2</sub>O 50%, **SE3:** sous-fraction au méthanol/H<sub>2</sub>O 70%

### II.2.1.3. Sélection de la plante la plus active inhibant la croissance de *Helicobacter pylori*

Dans le processus de l'infection à *H. pylori*, la fixation via les adhésines et la croissance de la bactérie sont les éléments à inhiber, afin de lutter contre cette infection. La plante qui démontrera à la fois une inhibition de la croissance et des adhésines (BabA et HopZ) de *H. pylori* sera considérée comme possédant un potentiel anti-*H. pylori* et anti-adhérence pour la suite des expériences.

#### II.2.1.3.1. Conditions de croissance de *H. pylori* P12

La souche a été cultivée sur gélose additionnée de sérum de cheval, de vitamines et d'un supplément sélectif (vancomycine à 5,0 mg, triméthoprime 2,5 mg, céfésulodine 2,5 mg et amphotéricine 2,5 mg). La souche de *H. pylori* a été cultivée à 37 °C pendant 72 h dans des conditions microaérophiles (10% CO<sub>2</sub> et 15 % O<sub>2</sub>).

Une subculture de la souche *Hp 12* a été fait afin de confirmer que se sont les souches de *H. pylori* et un test sur l'uréase et la catalase ont été fait pour cette confirmation.

### **II.2.1.3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de microdilution des extraits bruts de plante**

Les CMI ont été déterminées par la méthode de microdilution (Sgouras *et al.*, 2004)

#### **➤ Principe**

Il repose sur la présence de turbidité dans les microplaques, représentant la croissance d'une espèce bactérienne cultivée dans le milieu de culture liquide en présence de différentes concentrations de la substance à tester.

#### **➤ Mode opératoire**

L'isolat *Hp 12* de *H. pylori* a été utilisé. Simultanément, l'inoculum bactérien  $6 \times 10^8$  *H. pylori* (turbidité McFarland 2) a été préparé dans un Bouillon de Mueller Hinton (BMH) à partir d'une préculture de 72 heures. Une série de dilution nous a permis d'obtenir une gamme de concentration de 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 10; 20; 50 et 100 mg/mL en extrait et la clarithromycine (10 mg/mL) a été utilisée comme contrôle pour valider le test. Cent microlitres de l'inoculum bactérien et 100  $\mu$ L d'extraits introduits dans une plaque de 96 puits ont été incubés à 37 °C dans des conditions microaérophiles pendant 72 heures dans un incubateur. Pour chaque extrait, deux témoins ont été réalisés; un témoin positif (bouillon nutritif + *H. pylori*) et un témoin négatif (bouillon nutritif + extrait).

Après l'incubation pendant 72h une partie de l'échantillon a servi à la culture sur milieu solide dans les boîtes de pétri et une autre pour l'activité de l'uréase.

L'activité de l'uréase a été déterminée par la méthode du rouge phénol (Sgouras *et al.*, 2004). Brièvement, 5 $\mu$ L d'inoculum de *H. pylori* additionnés de 150  $\mu$ L d'urée (urée (20% p/v) et de rouge phénol (0,012%) dans le tampon phosphate) ont été introduits dans une plaque de 96 puits, puis la plaque a été incubée pendant 1h à 37°C dans les conditions microaérophiles. Après incubation, la persistance de la coloration rouge indiquait la croissance visible des bactéries, tandis que le virage du rouge phénol au jaune impliquait l'effet antibactérien des substances testées.

A différentes concentrations en extrait de plantes, la culture sur milieu solide dans les boîtes de pétries avec un générateur d'atmosphère microaérobie 'Gaspack' condition (10% CO<sub>2</sub>, 15% O<sub>2</sub>) pendant 48 heures a été faite.

La CMI a été déterminée comme étant la plus petite concentration d'extrait ayant inhibé toute croissance visible de la bactérie.

#### **II.2.1.4. Evaluation de l'effet des extraits de plantes sur l'adhérence de *H. pylori***

Cette partie du travail a été menée en évaluant la fixation de la bactérie sur les coupes de tissus gastriques de souris, en étudiant l'expression des gènes de deux adhésines babA et hopZ en quantifiant l'ARN par RT-PCR et les protéines par Western blot. Chaque extrait de plante a été utilisé à sa concentration minimale inhibitrice obtenue sur la croissance de *H. pylori*.

##### **II.2.1.4.1. Evaluation de l'effet des extraits de plantes sur l'adhérence de *H. pylori* aux coupes de tissus gastriques de souris**

Ce test a été effectué selon la méthode décrite par **Lengsfeld *et al.* (2004)**.

###### **➤ Principe**

L'isothiocyanate de fluoresceine (FITC) est une molécule fluorescente, réactive qui se fixe vis-à-vis des nucléophiles, notamment des groupes amines et sulfhydryle sur les protéines. Le FITC est un marqueur des cellules vivantes qui absorbe à 495 nm et émet une fluorescence verte à 520 nm. Ainsi tous les microtubules apparaîtront en vert au microscope à fluorescence. Les bactéries ayant adhéré aux tissus gastriques apparaîtront vertes au microscope à fluorescence et pourront être comptées.

###### **➤ Mode opératoire**

Les bactéries ont été récoltées à partir de plaques d'agar en utilisant une boucle stérile et remises en suspension dans 1,0 mL de NaCl (0,15 M) et Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 9,0. Les titres bactériens ont été ajustés à 3,0 x 10<sup>7</sup> UFC / mL en mesurant la densité optique à 550 nm. Les bactéries ont été marquées en incubant dix microlitres de fluoresceine d'isothiocyanate (1%) fraîchement préparée dans du DMSO à la suspension bactérienne, pendant 1 heure à température ambiante. Les bactéries ont été récupérées par centrifugation (3000 g, 5 min), lavées avec 1 mL de PBS, remises en suspension en les pipetant doucement dans 1 mL de PBS-Tween 20 (0,05% v/v), et sédimentées par centrifugation. Le cycle de lavage a été répété trois fois. Des aliquotes de *H. pylori* marquées (100 µL) ont été prélevées de la suspension finale et utilisées immédiatement. Les tissus gastriques des souris ont été sectionnés et les coupes réalisées et montées sur lames. Les sections de tissu ont été déparaffinées dans du xylène et du 2-propanol, rincées dans de l'eau puis dans du PBS, et incubées pendant 15 minutes à température ambiante dans du tampon de blocage (0,2% de BSA, 0,05% de Tween 20 dans du PBS). Les bactéries marquées au FITC ont été diluées 20 fois dans un tampon de

blocage et des aliquotes (200 µL) ont été placées sur les lames qui ont été incubées pendant 1 heure à la température ambiante dans une chambre humidifiée à l'obscurité. Les lames ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS avant l'observation au microscope à fluorescence.

Pour analyser l'activité anti-adhésive de l'extrait de plante à tester, des aliquotes (100 µL) de bactéries marquées au FITC ont été pré-incubées avec un extrait de plante (0,1% dans du tampon de blocage) pendant 2 h à température ambiante à l'obscurité. Les bactéries ont été lavées une fois dans du tampon de blocage avant que des aliquotes (200 µL) soient ajoutées aux sections gastriques et incubées comme précédemment. Après, les coupes ont été rincées 3 fois avec du PBS, le contrôle constitué des bactéries non traitées marquées au FITC ont été ajoutées et le lavage a été exécuté comme décrit ci-dessus.

#### ➤ **Validation de l'adhérence bactérienne.**

La validation de l'adhérence bactérienne a été réalisée par microscopie à fluorescence en utilisant une échelle de classement allant de zéro à 25 bactéries. Cinq champs microscopiques de coupes gastriques ont été examinés et le nombre de bactéries présentes compté manuellement et les moyennes calculées et classées. Zéro (0), pas de fixation bactérienne; [1 à 6], faible fixation bactérienne; [7 à 24] fixation bactérienne moyenne; >25 forte fixation bactérienne. La présence d'aucune bactérie, montre l'efficacité de l'extrait à pouvoir inhiber la fixation des bactéries.

#### **II.2.1.4.2. Analyse de l'expression des gènes d'adhérence (*babA* et *hopZ*) par transcription reverse en chaîne de polymérase (RT-PCR)**

##### ➤ **Protocole expérimental**

Un inoculum bactérien de *H. pylori* P12 ayant une turbidité comparable à celle d'un étalon de 0,5 McFarland ( $1 \times 10^8$  cellules/mL) a été cultivé dans un bouillon de *Brucella* additionné de FBS à 10% en présence ou en l'absence d'extrait de plante pendant trois jours à 37 °C dans une chambre humide dans un incubateur à CO<sub>2</sub>. Après cette période, l'extrait de plante a été ajouté à l'incubation des bactéries et le témoin a reçu l'ajout du véhicule (DMSO). Les plaques ont été incubées à 37 °C dans des conditions microaérophiles pendant 4 heures. A l'issue de ce temps d'incubation les ARN totaux ont été extraits et analysés par RT-PCR.

### ➤ **Extraction des ARNs totaux**

Les ARNs totaux sont extraits en utilisant le kit par adsorption sur membrane de gel de silice (DATA SHEET, Jena Bioscience) conformément aux instructions du fabricant selon le mode opératoire ci-dessous.

Cinq cent microlitres de solution de lyse ont été ajoutés au culot de cellules et le culot de cellules a été complètement ré-suspendu en pipetant la solution à plusieurs reprises. Un tube de filtration a été introduit dans un tube receveur. Trois cents millilitres d'isopropanol ont été ajoutés à l'échantillon lysé et le mélange a été introduit dans un tube de filtration. L'échantillon a été centrifugé (10000g, 30 secondes, 4°C) et le filtrat éliminé. Le lavage a été fait en ajoutant 700µL d'éthanol et centrifugé (10000g, 30 secondes, 4°C) puis le filtrat a de nouveau été éliminé, ce lavage a été répété deux fois. Puis une dernière centrifugation a été faite (10000g, 2 min, 4°C) pour éliminer les traces d'éthanol. Le tube de filtration a été placé dans un tube d'élution de 1,5mL, puis ouvert avec précaution et 30 µL de RNase-free tampon de décrochage y ont été enfin introduits. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 1 min puis centrifugé (10000g, 1 min, 4°C). Le filtrat représentait les ARN totaux.

### ➤ **RT-PCR des ARNm**

Cette technique permet une rétrotranscription et une amplification de l'ADNc un grand nombre de fois.

#### ➤ **Principe**

En présence de la transcriptase reverse, l'ensemble des ARNm poly (A) est transcrit en ADN complémentaires (ADNc). L'initiation de la transcription et la sélection des messages se font à l'aide d'une amorce oligo dT s'hybridant à la queue poly (A) de ses messagers.

#### ➤ **Mode opératoire**

**Tableau IV: Préparation de la solution d'amplification pour RT-PCR**

<b>Produits</b>	<b>Volume pour 1 tube (µL)</b>
ARN (µL)	2,5
Amorces	1
dH <sub>2</sub> O	1,5
	Volume total par tube: 5µL

Les tubes contenant les différentes solutions sont introduits dans l'appareil de PCR pendant 5 min à 70°C (Tableau V et VI).

**Tableau V: Préparation des tubes pour PCR**

Produits	Volume pour 1 tube (µL)	Volume pour 32 tubes (µL)
Tampon	5	160
dNTP	2,5	80
Inhibiteur RNase (40µg/mL)	0,6	19,2
RT (200U)	1	32
H <sub>2</sub> O	0,9	28,8

Les différents réactifs ont été introduits dans des tubes (10 µL pour chaque tube), puis mélangés au vortex et introduits dans le Thermocycleur. La réaction a eu lieu à 37°C pendant 1h (synthèse de l'ADNc) puis à 94°C pendant 2 min (dénaturation de la transcriptase reverse). Les ADNc ont été conservés à -20°C ou directement utilisés pour l'amplification en chaîne (PCR).

Les séquences d'amorces sont présentées dans le Tableau VI ci-dessous.

#### ➤ **PCR des ADNc**

Cette méthode permet l'amplification d'un brin d'ADN par l'action d'une polymérase, la Taq polymérase. La réaction est subdivisée en trois principales étapes:

- Redénaturation
- Dénaturation: séparation des brins d'ADN à 90°C
- Hybridation: fixation des amorces spécifiques au gène d'intérêt à leur région complémentaire sur chaque brin d'ADN à 60°C.
- Polymérisation: synthèse à partir de chaque amorce d'un nouveau brin d'ADN en utilisant le brin complémentaire comme matrice à 72°C, 30 cycles.

#### ➤ **Produits d'analyse**

Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2,0% contenant 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium. Après coulage du gel dans le barc à électrophorèse, les puits ont été faits grâce à un peigne. Par la suite, le remplissage des puits par échantillons et le marqueur. En fin, le démarrage de l'électrophorèse a été fait pour la migration du gel et des images sur gel ont été capturées.

**Tableau VI: Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR**

Gènes	Séquence d'oligonucléotides ou amorces (5' ____ 3')	
	Sens	Anti-sens
<i>babA</i>	AATCCAAAAAGGAGAAAAAGTATGAAA	ACAGGATGTGGCTTTAGTGATTGT
<i>hopZ</i>	TTTTGAGCCGGTGGATATATTAG	CGCTAGGTGATTTCTCGTATCCGCCGGCGTAA

*babA*, blood group antigen binding A; *hopZ*, *H. pylori* outer membrane

#### **II.2.1.4.3. Evaluation de l'effet des extraits de plantes sur l'expression des protéines d'adhérence: *BabA* et *HopZ***

##### **➤ Extraction des protéines totales**

La souche P12 de *H. pylori* a été utilisée dans cette étude. Une culture âgée de trois jours de l'isolat P12 de *H. pylori* a été récoltée dans du milieu *Brucella* additionné de 10% de sérum fœtal bovin pour un étalon McFarland de 2. Cent vingt µL de l'inoculum ont été ajoutés à chaque puits d'une plaque de 96 puits et 125 µL d'extraits de plante à la concentration minimale inhibitrice (CMI) et deux concentrations inférieures à la CMI ont été utilisées pour cet essai. Le témoin était constitué de l'inoculum et le DMSO. Les plaques ont été incubées à 37 °C dans des conditions microaérophiles pendant 4 heures. Après incubation, 250 µL du mélange ont été transférés dans un tube et centrifugés (12 000 g, 5 minutes, 4 °C). Le culot contenant les bactéries a été récupéré et lavé avec du tampon phosphate salin (PBS).

#### **II.2.1.4.4. Analyse de la synthèse des protéines codée par des gènes d'adhérence par *Western Blot***

##### **II.2.1.4.4.1. Définition**

Le *Western Blot* également appelé transfert de protéines, est une technique de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification des protéines dans un échantillon biologique (sérum, homogénat tissulaire, lysat cellulaire) à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines que l'on souhaite détecter. Il permet ainsi de visualiser des protéines particulières dans un mélange complexe (**Renart et al., 1979**).

Le *Western blot* utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer les protéines préalablement dénaturées selon leur taille. Ces protéines sont ensuite transférées sur une membrane où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Il est possible grâce à cette technique de détecter la présence d'une protéine dans un tissu, d'évaluer

sa taille, sa concentration, les variations de cette concentration, d'effectuer des comparaisons de concentrations entre différents groupes (Towbin *et al.*, 1979).

#### **II.2.1.4.4.2. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE)**

Cette séparation a été faite selon la méthode décrite par Laemmli. (1970).

##### **➤ Principe**

L'électrophorèse est une technique de séparation fondée sur le déplacement à travers un support (matrice de polymère ou gel de polyacrylamide ou d'agarose) des molécules chargées positivement ou négativement sous l'effet d'un champ électrique.

En biochimie ou en biologie moléculaire, l'électrophorèse sur gel est utilisée pour la séparation des protéines ou des acides nucléiques en fonction de leur taille et de leur charge électrique. Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur. Deux principaux polymères sont utilisés: l'agarose et le polyacrylamide dont on peut faire varier la concentration. Ainsi pour l'électrophorèse sur gel d'agarose, l'agarose est utilisé à des concentrations de 0,5 à 2% (masse/volume) et permet de séparer des molécules de très grande taille, principalement l'ADN ou l'ARN. Quant à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, sa concentration peut varier de 4 à 20% (masse/volume) et permet de séparer les molécules plus petites: protéines, peptides et fragments d'acide nucléiques.

##### **❖ Electrophorèse sur gel de poly-acrylamide en présence du dodécylsulfate de soduim (SDS-PAGE)**

La technique du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes consiste à dénaturer à chaud un mélange de protéines en présence d'un agent réducteur: le  $\beta$ -mercapto-éthanol ou le dithiothréitol (DTT) qui réduit les ponts disulfures; et d'un détergent anionique fort: le SDS qui confère à toutes les protéines du mélange une charge négative. Les protéines de l'échantillon sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS.

##### **➤ Procédure**

La première étape consiste à couler le gel de séparation (12%) et le gel de concentration (5%) entre deux plaques de verre. La composition des différents gels est présentée dans le tableau VII ci-dessous.

**Tableau VII: Composition des gels pour SDS-PAGE**

Réactifs	Gel de séparation (12% Acrylamide) Vf=50 mL	Gel de concentration (5% Acrylamide) Vf=10 mL
Eau distillée	16,5	6,8
Acrylamide (30%)	20	1,7
Tampon Tris-HCl (1,5M pH 8,8)	12,5	/
Tampon Tris-HCl (1M pH 6,8)	/	1,25
SDS (10%)	0,5	0,1
Persulfate d'ammonium (10%)	0,5	0,1
TEMED	0,02	0,01

TEMED: *N, N, N', N'-tétraméthyl-1,2-diamino-méthane*; Vf: *volume final*

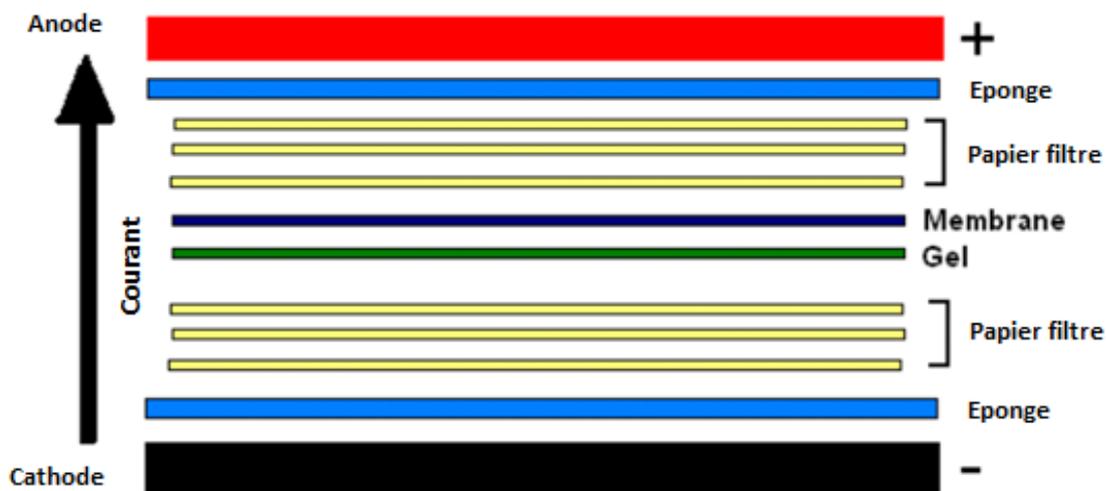
SDS: *Dodécylsulfate de sodium*

Le gel de séparation (12% acrylamide) a été coulé en premier en introduisant environ 6 mL de cette solution entre les plaques de verre. Le gel a ensuite été recouvert avec de l'isopropanol pour permettre une solidification homogène à température ambiante pendant 20 min. Après solidification du gel de séparation, l'isopropanol a été éliminé et remplacé avec environ 2 mL de la solution du gel de concentration et les peignes de 1 mm d'épaisseur ont été introduits afin de former les puits servant pour le dépôt des échantillons.

Après la préparation du gel, les protéines ont été diluées dans le tampon de *Laemmli* 5 fois concentré (tampon Tris-HCl (1 M, pH 6,8) contenant (100 mM) DTT, (12%) SDS, (4%) bleu de bromophénol) et chauffées à 100 °C pendant 10 min dans un block chauffant. Dix microlitres du mélange obtenu contenant 50 µg de protéines (pour tous les échantillons à analyser) ont été introduits dans les puits. L'électrophorèse s'est ensuite déroulée en présence du marqueur de poids moléculaire *pre-stained marker* (Thermo Fisher Scientific, USA) en utilisant le générateur *Biorad Powerpac Universal System* pour générer le courant électrique. La migration s'est effectuée sous un courant de tension 80 V pendant 30 min pour permettre la séparation des protéines suivi d'un courant de tension 120 V pendant 60 min pour la migration dans le gel de séparation à l'aide du tampon d'électrophorèse conducteur: Tris 50 mM – Glycine 0,2 M – SDS 0,1%, pH 8,5.

#### II.2.1.4.4.3. Transfert et détection des protéines sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'anticorps

Après migration, le gel est démoulé et les protéines transférées sur la membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF), (GE Healthcare, Germany) afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps. Le montage du transfert est présenté à la Figure 15 ci-dessous.



**Figure 15: Montage du transfert des protéines du gel sur la membrane**

Le principe du transfert est similaire à celui de la migration dans le SDS-PAGE, à savoir que les protéines chargées négativement migrent vers l'anode sous l'effet du champ électrique. La membrane étant incorporée entre le gel et l'anode, les protéines adhèrent à la membrane selon leur même disposition sur le gel. Le transfert s'est effectué sous un courant d'intensité 200 mA généré par le générateur *Biorad Powerpac Universal System* pendant 90 min en présence de la glace. Le tampon de transfert est constitué de (25 mM) Tris, (190 mM) Glycine et (20%) Méthanol.

Une fois les protéines transférées, les molécules BabA et HopZ sont détectées. La membrane a été bloquée avec 5% (p/v) de lait sans matières grasses dilué dans le tampon Tris-Salin-Tween 20 (TBST: Tris-HCl (10 mM), NaCl (150 mM), Tween 20 (0,05%; pH 7,6) pendant 1h à température ambiante afin de limiter les interactions non-spécifiques entre la membrane et les anticorps. Après le blocage, la membrane a été incubée toute une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire dilué dans le tampon TBST contenant 1,5% de lait sans matières grasses. Les anticorps primaires pour les protéines d'intérêts étaient: [*Rabbit*

*polyclonal anti-BabA antibody (dilution 1:10000); Rabbit polyclonal anti-HopZ antibody (dilution 1:10000)*. La membrane a été lavée 3 fois avec le tampon TBST et incubée pendant 2h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire dilués dans le tampon TBST contenant 1,5 % de lait sans matières grasses. L'anticorps secondaire de cheval couplé à la peroxidase a été utilisé comme l'anticorps secondaire. Après 3 lavages avec le tampon TBST, les transferts ont ensuite été développés en utilisant un tampon de développement 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro bleu tétrazolium (BCIP/NBT) (Sigma, Allemagne). L'analyse densitométrique des bandes de protéines obtenues a été faite à l'aide du logiciel Image J Software.

## **II.2.2. Détermination par fractionnement bioguidé de l'effet de l'extrait de *S. campanulata* sur la croissance et l'adhérence de *H. pylori*.**

Les travaux ci-après se sont déroulées sur les différentes fractions obtenues à partir de *S. campanulata*, plante ayant eu une meilleure activité. Ces différentes fractions ont été obtenues comme décrit dans le paragraphe de fractionnement (II.2.1.2.2.).

### **II.2.2.1. Détermination de l'effet des fractions de l'extrait de *S. campanulata* sur la croissance de *H. pylori***

Cet effet a été évalué par la détermination des diamètres des zones d'inhibition par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé (Cos *et al.*, 2006).

#### **➤ Principe**

La méthode des disques repose sur la diffusion des substances à tester de concentration connue, imprégnées sur les disques de papier filtre en contact avec le milieu de culture solide coulé en boîtes de Pétri, préalablementensemencé d'un inoculum bactérien. Après incubation, si la substance contenue sur les disques de papier a une activité antibactérienne vis-à-vis du germeensemencé, une zone d'inhibition de croissance est observée autour de ces derniers.

#### **➤ Mode opératoire**

La souche *Hp G27* de *H. pylori* a été utilisée. Une colonie de 72 heures de *H. pylori* sujet du test de sensibilité, a été mise en suspension dans 1 mL de bouillon de *Brucella* contenant 5% de sérum fœtal. Afin de favoriser l'obtention d'une nappe de colonies semi-confluente, l'inoculum obtenu précédemment a été dilué afin d'obtenir une DO<sub>600</sub> finale de 0,07 nm. Cet inoculum (6,5 mL) a étéensemencés par étalement sur la gélose *Brucella* avec un bouillon standard stérile, d'épaisseur 4 mm, préalablement coulé et ceci à l'aide d'une

pipette pasteur coudée. Une foisensemencées, les boîtes ont été mises à sécher pendant 15 minutes sous la hotte (**Carbonnelle *et al.*, 1987**).

Les disques de papier filtre stériles de 5 mm de diamètre ont été imprégnés d'un volume de 4 µl des extraits et de la solution de l'antibiotique de référence (la kanamycine), préparés à différentes concentrations (0,1; 1; 10 mg/mL) pour l'extrait et 10 µg/mL pour la kanamycine. Des disques témoins négatifs imbibés de 25% de DMSO ont été également préparés. Les disques ont été délicatement déposés à la surface du milieu géloséensemencé.

Les boîtes de Pétri ont été incubées dans les conditions microaérophiles à 37°C pendant 72 heures. Les diamètres des zones d'inhibition autour des disques ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.

Chaque essai a été réalisé trois fois et les valeurs ont été exprimées sous forme de moyenne ± erreur standard de la moyenne.

Les extraits présentant un diamètre d'inhibition  $\geq 8$  mm ont été considérés comme actifs. La quantité minimale active (QMA) de chaque extrait a été déterminée comme étant la quantité minimale produisant une zone d'inhibition  $\geq 8$  mm à la plus petite concentration en extrait.

#### **II.2.2.2. Evaluation de l'effet des fractions de l'extrait de *S. campanulata* sur l'expression des protéines d'adhérence: BabA et HopZ**

La souche *G27* de *H. pylori* a été utilisée, l'extraction de protéines totales et leurs expressions évalué comme décrit au paragraphe **II.2.1.4.4.3**. Dans cette partie du travail nous avons utilisé un gène de contrôle interne Hp 1043 de poids moléculaire de 30KDa.

#### **II.2.2.3. Evaluation de l'effet des sous-fractions de l'extrait de *S. campanulata* sur la croissance et l'expression des protéines d'adhérence: BabA et HopZ**

A l'issu de l'activité sur la croissance et l'adhérence des différentes fractions de *S. campanulata*, nous avons sélectionné les fractions B et E que nous avons sous fractionné comme décrit dans le paragraphe **II.2.1.2.3**. L'effet des sous-fractions ont été évalué sur la croissance et l'adhérence de *H. pylori* comme précédament décrit dans les paragraphes **II.2.2.1**. et **II.2.2.2**.

## **II.2.2.4. Détermination du profil phytochimique des fractions de la plante active**

### **II.2.2.4.1. Mise en évidence des polyphénols et flavonoïdes totaux**

Afin d'avoir une idée sur la composition phytochimique de l'extrait actif, les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes ont été quantifiées.

#### **II.2.2.4.1.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux de l'extrait actif et ses fractions**

##### **➤ Principe**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui par réduction lors de l'oxydation des phénols, donne un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue obtenue possède une absorption maximale comprise entre 725 et 750 nm et est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques.

##### **➤ Mode opératoire**

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif de Folin-Ciocalteu comme décrit par **Ngoungoure *et al.* (2019)**. Dans chaque tube à essai ont été introduit successivement 50 µL de chaque extrait (dissous dans le méthanol), 2.4 mL d'eau distillée, 0,2 ml de réactif de Folin-Ciocalteu 2N et 0,5 mL de la solution de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%). Le mélange final a été agité vigoureusement incubé pendant 1 heure à l'obscurité à température ambiante et l'absorbance a été lue au spectrophotomètre à 765 nm.

L'échantillon a été testé en triple et l'acide gallique utilisé comme étalon (voir droite d'étalonnage annexe). Les absorbances ont été projetées sur la droite d'étalonnage et la teneur en polyphénols totaux a été exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

#### **II.2.2.4.1.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes de l'extrait actif et ses fractions**

##### **➤ Principe**

La méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) a été utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

##### **➤ Mode opératoire**

A 0,5 mL de chaque fraction de l'extrait préalablement dissout dans le méthanol a été ajouté 1 mL de solution d'AlCl<sub>3</sub> (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement

agité et l'absorbance lue à 430 nm après 1h d'incubation à température ambiante (Ngoungouré *et al.*, 2019). La droite d'étalonnage (voir annexe) a été obtenue en utilisant une solution de quercétine. La teneur en flavonoïdes totaux des échantillons a été exprimée en milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

#### **II.2.4.2. Détermination du profil phytochimique de la fraction la plus active par Chromatographie en phase Liquide à Ultra Haute Pression (CLUHP) couplée à la spectrométrie de masse (Moreno-Rojas *et al.*, 2018).**

Cette partie a été effectuée sur la fraction E et la sous-fraction SE3.

Afin de déterminer les différents composés de la fraction active et leurs structures, la chromatographie liquide à haute pression couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée au *Centre Interdépartementale Grandi Strumenti (CIGS)*, Université de Modena et Reggio Emilia, Italie.

##### **➤ Principe**

La chromatographie liquide à ultra haute pression (CLUHP) est une technique chromatographique utilisée pour séparer un mélange de composés en vue de l'identification, de la quantification ou de la purification des composants individuels d'un mélange. Elle est basée sur la pression exercée par un liquide (phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie. Après injection, le mélange à séparer se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne. En fonction de la phase stationnaire, les composants du mélange sont inégalement retenus lors de la traversée dans la colonne. De ce phénomène appelé rétention, il résulte que les composants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés. Le détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. Le temps de rétention (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté) caractérise qualitativement chaque composante du mélange. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque composé dans le mélange injecté. La spectrométrie de masse quant à elle est une technique très puissante et sensible pour déterminer les structures des composés en analysant le rapport m/z.

### ➤ **Mode opératoire**

Deux milligrammes de chaque fraction de la fraction E et sous-fraction SE3 ont été dissouts dans 1 mL d'acétonitrile et filtrés à l'aide du filtre PTFE, ensuite la solution a été agitée au vortex pendant 20 secondes et centrifugée (3000 g, 5 min) et enfin 5  $\mu$ L du surnageant ont été injectés dans l'appareil HPLC. Le système UHPLC 3000 Series (Thermo Scientific Dionex Ultimate) qui a été utilisé pour nos analyses équipé d'une pompe quaternaire (Series RS), et d'un échantillonneur automatique WPS3000RS Series (Thermo Fisher Scientific Ultimate) contrôlé par le logiciel Chromeleon 7.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA and Dionex Softron GmbH Part of Thermo Fisher Scientific, Germany) relié à un spectromètre de masse de haute résolution (Q Exactive<sup>TM</sup> Thermo, Bremen, Germany).

Le spectromètre de masse (SM) a été au préalable calibré au début de l'analyse. L'azote (pureté > 99,999%) obtenu à partir d'un générateur d'azote Zefiro zero 60 LC-MS (CINEL, Vigonza, Italie), a été utilisé à la fois comme source de gaz et de collision. Le système chromatographique a été couplé à la SM avec une source d'ionisation chauffée par electrospray II (HESI II) opérant en mode négatif et positif avec des méthodes analytiques séparées. La sonde a été chauffée à 290 °C, puis la température capillaire a été réglée à 270 °C et les flux suivants d'azote ont été utilisés pour l'ionisation: Sheat Gas 40, Aux Gas 30, Sweep Gas 3. La tension capillaire a été réglée à 3,5 et 3 kV pour les modes négatif et positif respectivement et le niveau RF de la lentille S a été fixé à 45 (unités arbitraires). La colonne de haute résolution (HT 2.1 i.d. x 50mm Zorbax SBC18 with 1,8 $\mu$  particle size) provenant d'Agilent Technologies (USA) a été maintenue à 25°C et l'élution a été faite en utilisant une phase mobile constituée de l'eau distillée 80% + 0,1% acide formique (A) et de l'acétonitrile 20% (B) avec le débit de 0,3 mL/min. Le gradient suivant a été utilisé lors de l'élution : de 0,1 à 10 % de B pendant 1 minute, puis 20 à 98% de B et enfin B% a été maintenu stable pendant 8,8 minutes, avant l'étape de reconditionnement, pour une durée totale de 25 minutes. Des spectres de masse ont été enregistrés de 100 à 1000 m/z, à des résolutions de 70000 et 17500, respectivement. Les chromatogrammes et les temps de rétention des composés ont été enregistrés. Les trois ions les plus intenses ont été sélectionnés pour la dissociation induite par collision favorisée par l'azote. Une exclusion active du précurseur de 6 secondes a été définie. En parallèle, une expérience de fragmentation entièrement ionique a été programmée pour des analyses post-hoc. L'étalonnage de masse d'Orbitrap a été effectué chaque semaine, en modes négatif et positif, afin d'assurer une précision de masse de  $\leq 2$  ppm. Le logiciel Xcalibur 2.9 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) et FreeStyle (v. 1.3, Thermo Fisher Scientific,

San José, CA, USA) ont été utilisés pour le contrôle UHPLC et le traitement des données, respectivement.

### **II.2.3. Evaluation de l'effet des fractions et sous-fractions de l'extrait de *S. campanulata* sur les facteurs de virulence CagA et uréase de *H. pylori***

Les travaux ci-après se sont déroulées sur les différentes fractions et sous-fractions obtenues à partir de *S. campanulata*, plante ayant eu une meilleure activité.

#### **II.2.3.1. Evaluation de l'effet des fractions et sous fractions de la plante active sur l'expression de la cytotoxine CagA**

Cag A est associée à une grande inflammation et un risque accru d'ulcère et de cancer au cours de l'infection à *H. pylori* (Kim *et al.*, 2011). Donc une inhibition de l'expression de cette protéine conduit à la régularisation de la division cellulaire et de la carcinogénèse.

La souche G27 de *H. pylori* a été utilisée, l'extraction de protéines totales et leurs expressions évalué comme décrit au paragraphe II.2.1.4.3. L'anticorps primaire pour la protéine d'intérêt *Rabbit polyclonal anti-CagA antibody (dilution 1:5000)*

#### **II.2.3.2. Evaluation de l'effet des sous-fractions sur l'activité de l'uréase**

Une augmentation de l'activité de l'uréase qui est un déterminant crucial de la colonisation, la survie et la pathogénicité de *H. pylori* a été observée au cours de l'infection à *H. pylori*. Donc une inhibition de cette enzyme permet la dérégulation de la colonisation de *H. pylori*.

Ce test a été fait selon la méthode décrite par Tarsia *et al.* (2018)

##### **➤ Principe**

Le plasmide pGEM-ureOP de *H. pylori* incorporé dans les cellules *Escherichia coli* TOP10 a été utilisé. La bactérie en présence de l'urée va être hydrolysée par l'uréase en dioxyde de carbone et en ammoniac pour donner une coloration rose qui absorbe à 430 nm.

##### **➤ Mode opératoire**

Deux cents (200) µL de cellules contenant l'opéron pGEM-ureOP ont été introduits dans 10 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) et 10 µL du rouge crésol (10 µg/L), puis incubées à 37°C sous agitation jusqu'à avoir une DO<sub>600</sub> comprise entre 0,7 – 0,9 nm.

Dans les plaques de 96-puits, ont été introduits successivement 1  $\mu$ L de l'urée (80 mM), 10  $\mu$ L d'extrait à différentes concentrations finales: 0,1; 1; 2; 5; 10 mg/mL, 2,5  $\mu$ L de NiSO<sub>4</sub> (250  $\mu$ M), 90  $\mu$ L de cellules et 50  $\mu$ L d'huile minérale. Les absorbances ont été lues à 430 nm /580 nm chaque 10 min pendant 360 min à 37°C au moyen d'un lecteur de plaque afin de calculer les concentrations inhibitrices cinquante ont été calculé en déterminant la pente des graphes Abs 430/580 en fonction du temps.

#### **II.2.4. Analyses statistiques**

Les expériences ont été réalisées en triplicat et les données exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type (ET). L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.03. En ce qui concerne l'expression des gènes et des protéines, Image J a permis de quantifier les bandes. Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances à un facteur (ANOVA), suivie du test post-hoc de Bonferroni. Des comparaisons ont été effectuées entre les groupes traités et les groupes non traités. Le seuil de probabilité  $p < 0,05$  a été considéré comme statistiquement différent.

## **CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION**

### **III.1. RESULTATS**

#### **III.1.1. Plantes utilisées par les tradipraticiens contre les affections gastriques et effets de ces plantes sur la croissance et l'adhérence de *H. pylori***

##### **III.1.1.1. Plantes utilisées par les tradipraticiens pour soigner les affections gastriques**

Au total, 28 tradipraticiens (15 hommes et 13 femmes) ont été interrogés dans le cadre de cette étude. Seize dans la ville de Bafia (10 hommes et 6 femmes), 7 dans les arrondissements de Bazou (2 hommes et 5 femmes) et 5 de Foubot (3 hommes et 2 femmes) respectivement. Les tradipraticiens enquêtés étaient âgés de 30 à 65 ans. Le tableau VIII ci-dessous présente le nom botanique, la famille, le nom local, les parties utilisées, le mode de préparation et la fréquence de citation de toutes les plantes collectées. Quarante et une espèces de plantes appartenant à 27 familles ont été collectées dans la zone d'étude. Le plus grand nombre d'espèces a été observé dans la famille des *Asteraceae* (5 espèces), suivi d'*Euphorbiaceae* (4 espèces). La macération ou la décoction/ aqueuse sont les principaux modes de préparation des potions qui sont généralement des mélanges de plusieurs plantes. Presque toutes les parties des plantes sont utilisées: feuilles, écorces, fruits, rhizomes, bulbes, et partie aérienne. Toutes les potions sont administrées par voie orale.

**Tableau VIII: Plantes médicinales utilisées par le tradipraticien pour le traitement du mal gastrique et des troubles digestives**

Famille	Noms scientifiques/ d'identification	Numéro	Noms locaux	Parties de la plante	Usages Ethnopharmacologiques	Modes de préparation	FC (%)
<i>Acanthaceae</i>	<i>Acanthus montanus</i> T.Anderson. 26004/SRF/Cam	(Nees)	<i>Fozem (Bamoun)</i>	Feuilles	Mal d'estomac, ulcère chronique, gastritis	D	1,22
<i>Anacardiaceae</i>	<i>Mangifera indica</i> Lin. 18646/HNC		<i>Féronneux (Bafia)</i>	Ecorces	Troubles gastrointestinaux	D	4,29
<i>Annonaceae</i>	<i>Annona muricata</i> L. 32879/HNC		<i>Ntuè kaoh (Bamoun)</i>	Feuilles, graines	Mal d'estomac	D	1,84
	<i>Enantia chloranta</i> Oliv. 6420/HNC		<i>Sabasaba</i>	Ecorces	Problèmes d'estomac	D	3,68
<i>Apocynaceae</i>	<i>Voacanga africana</i> 47215/HNC	Stapf.	<i>Bouleu nkan (Bafia)</i>	Ecorces	Problèmes d'estomac, antiulcère	D	4,9
<i>Araliaceae</i>	<i>Polyscias fulva</i> Hiern. 2990/HNC		<i>Pûngûe(Bamoun)</i>	Ecores	Infections véneriennes, mal d'estomac	D	1,84
<i>Asteraceae</i>	<i>Ageratum conyzoides</i> 6575/HNC	Lin.	<i>Kéyayas (Bafia)</i>	Partie aérienne	Mal abdominal, dysenterie, mal gastrointestinal	M	7,36
	<i>Elephantopus mollis</i> 39570/HNC	Kunth.	<i>Akiba (Bafia)</i>	Feuilles	Antibactériens, troubles d'estomac	D	1,22
	<i>Emilia coccinia</i> (Sims.) 29441/HNC	.don.	<i>Shin mû (Bamoun)</i>	Feuilles	ulcère, jaunice, mal abdominal	D	1,22

D: Décoction, M: Macération, FC: fréquence de citation

\*HNC: Herbar National du Cameroun

\*SRF/Cam: Société des Reserves Forestiers

**Tableau VIII (suite): Plantes médicinales utilisées par le tradipraticien pour le traitement du mal gastrique et des troubles digestives**

Famille	Noms scientifiques/ d'identification	Numéro	Noms locaux	Partie de la plante	Usages Ethnopharmacologiques	Modes de préparation	FC (%)
<i>Asteraceae</i>	<i>Spilanthes africana</i> 33075/HNC	D.C.	<i>Mièk gèp</i> ( <i>Bazou</i> )	Fruits	Troubles gastrointestinaux	M	3,68
	<i>Vernonia guineensis</i> 11133/SRF/Cam	Benth.	<i>Mgbùkwet</i> ( <i>Bamoun</i> )	Rhizomes	Troubles gastrointestinaux, jaunice	D	2,45
<i>Biognoniaceae</i>	<i>Spathodea companulata</i> 50085/HNC	P.Beaux.	<i>Vivet</i> ( <i>Bamoun</i> )	Ecorces	Troubles digestifs, ulcère	D	5,52
<i>Burseraceae</i>	<i>Dacryodes edulis</i> (g.don) 18258/HNC	h.lam.	<i>Kéyom</i> ( <i>Bafia</i> )	Ecorces	Dysenterie, antimicrobiens	D	1,84
<i>Caricaceae</i>	<i>Carica papaya</i> Lin. 18647/HNC		<i>Tam mekal</i> ( <i>Bafia</i> )	Feuilles	Troubles gastrointestinaux et d'estomac	D	3,68
<i>Cesalpiniaceae</i>	<i>Piliostigma thonningii</i> (schum.) m.redhead. 2689/HNC		<i>Pien</i> ( <i>Bamoun</i> )	Feuilles	Mal d'estomac, troubles digestifs	D	1,84
	<i>Senna alata</i> (Lin.) 11002/HNC	link.	<i>Fū bibile</i> ( <i>Bazou</i> )	Feuilles	Problèmes gastriques	M	1,22
<i>Clusiaceae</i>	<i>Allanblackia florinbunda</i> 1380/HNC	Oliv.	<i>Nsangomo</i> ( <i>Bafia</i> )	Feuilles	Mal d'estomac et troubles digestifs	D	1,84
	<i>Garcinia kola</i> 9815/SRF/Cam	Heckel.	<i>Nzoè mbeu</i> ( <i>Bazou</i> )	Ecorces	Antiulcère, troubles gastrointestinaux	D	5,52
<i>Commelinaceae</i>	<i>Commelina diffusa</i> 35189/SRF/Cam	Burm.f.	<i>Metit neuron</i> ( <i>Bafia</i> )	Feuilles	Antimicrobiens, fièvre	D	1,84
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Alchornea laxiflora</i> Pax&K.H. 2093/HNC	(benth)	<i>Meshé</i> ( <i>Bamoun</i> )	Feuilles	Mal destomac, dysenterie, jaunice	D	1,22

D: Décoction, M: Macération, FC: fréquence de citation

\*HNC: Herbar National du Cameroun

\*SRF/Cam: Société des Reserves Forestiers

**Tableau VIII (Suite): Plantes médicinales utilisées par le tradipraticien pour le traitement du mal gastrique et des troubles digestives**

Famille	Noms scientifiques/ d'identification	Numéro	Noms locaux	Parties de la plante	Usages ethnopharmacologiques	Modes de préparation	FC (%)
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Croton macrostachyus</i>	Hochst et Del. 17909/SRF/Cam	<i>Kùteshâ</i> ( <i>Bamoun</i> )	Feuilles	Mal d'estomac	D	1,84
	<i>Euphorbia hirta</i> L.	14288/HNC	<i>Bùmou</i> ( <i>Bamoun</i> )	Partie aérienne	Troubles gastrointestinaux	D	1,84
	<i>Macaranga hurifolia</i>	Beille	<i>Assas (Bafia)</i>	Feuilles	Troubles gastrointestinaux, tuberculose	D	3,06
<i>Fabaceae</i>	<i>Detarium microcarpum</i>	Gill. Perr. 49834/SRF/Cam		Ecorces	Mal d'estomac, diarrhea, dysenterie	D	0,61
	<i>Erythrina senegalensis</i>	D.C. 35259/HNC	<i>Megham</i> ( <i>Bamoun</i> )	Feuilles, ecorces	Troubles gastrointestinaux	D	0,61
	<i>Millettia versicolor</i>	Welw. 32315/HNC		Feuilles	Troubles digestifs	D	1,22
<i>Labiaceae</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	L. 6899/SRF/Cam	<i>Tsham</i> ( <i>Bafia</i> )	Feuilles	Troubles gastrointestinalux	D	1,22
	<i>Ocimum gratissimum</i>	Lin. 42852/HNC	<i>Messeck</i> ( <i>Bafia</i> )	Feuilles	Antiulcère, mal d'estomac	D	1,84
<i>Loganiaceae</i>	<i>Anthocleista schweinfurthii</i>	Gil. 2281/HNC	<i>Yü'rum</i> ( <i>Bamoun</i> )	Ecorces	Mal abdominal	D	1,22
	<i>Persea americana</i>	Mill. 18604/HNC	<i>Fou biyé</i> ( <i>Bazou</i> )	Ecorces	Mal d'estomac	D	2,45
<i>Loranthaceae</i>	<i>Phragmentera capitata</i> ( <i>spreng</i> ) Balle. 24667/HNC			Feuilles	Troubles gastrointestinaux	D	1,22

D: Décoction, M: Macération, FC: fréquence de citation

\*HNC: Herbar National du Cameroun;

\*SRF/Cam: Société des Reserves Forestiers

**Tableau VIII (Suite et fin): Plantes médicinales utilisées par le tradipraticien pour le traitement du mal gastrique et des troubles digestives**

Famille	Noms scientifiques/ d'identification	Numéro	Noms locaux	Parties de la plante	Usages ethnopharmacologiques	Modes de préparation	FC (%)
<i>Malvaceae</i>	<i>Triumfetta pentandra</i> 9014/SRF/Cam	A. Rich.	<i>Okon (Bafia)</i>	Plante entière	Mal d'estomac, troubles gastrointestinaux	D	0,61
<i>Meliaceae</i>	<i>Khaya grandifoliola</i> 52661/HNC	D.C.	<i>Fa' tûtù (Bamoun)</i>	Ecorces	Mal d'estomac	D	1,84
<i>Mimosaceae</i>	<i>Entada africana</i> 2334/HNC	Guill et Pers.	<i>Lù (Bamoun)</i>	Ecorces	Mal d'estomac, troubles gastrointestinaux	D	1,22
<i>Moraceae</i>	<i>Ficus exasperata</i> 43999/HNC	Vahl.	<i>Ghùghu (Bamoun)</i>	Feuilles et écorces	Troubles d'estomac	D	1,84
<i>Myrtaceae</i>	<i>Psidium guayava</i> Lin. /2885/HNC		<i>Ntù goyave (Bazou)</i>	Feuilles	Troubles gastrointestinaux, ulcère	D	3,68
<i>Piperaceae</i>	<i>Piper umbellatum</i> 20934/SRF/Cam	L.	<i>Boupouete (Bamoun)</i>	Feuilles	Antibacteriens, mal d'estomac	D	1,22
<i>Poaceae</i>	<i>Cymbopogon ciratus</i> (D.C.) Stapf. 18628/HNC		<i>Fiba g'ass (Bazou)</i>	Feuilles	Troubles d'estomac	D	2,45
<i>Rutaceae</i>	<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle.		<i>Lamassi (Bazou)</i>	Feuilles	Mal d'estomac, troubles gastrointestinaux	D	5,52
<i>Solanaceae</i>	<i>Nicotina tabacum</i> 1863/SRF/Cam	L.	<i>Deubà (Bazou)</i>	Feuilles	Mal d'estomac, troubles digestifs	D	3,68
<i>Sterculiaceae</i>	<i>Cola acuminata</i> (P. Beauv.) Schott α Endl. 1729/SRF/Cam	Schott	<i>Shin pè' (Bamoun)</i>	Ecorces	Mal d'estomac	D	2,45

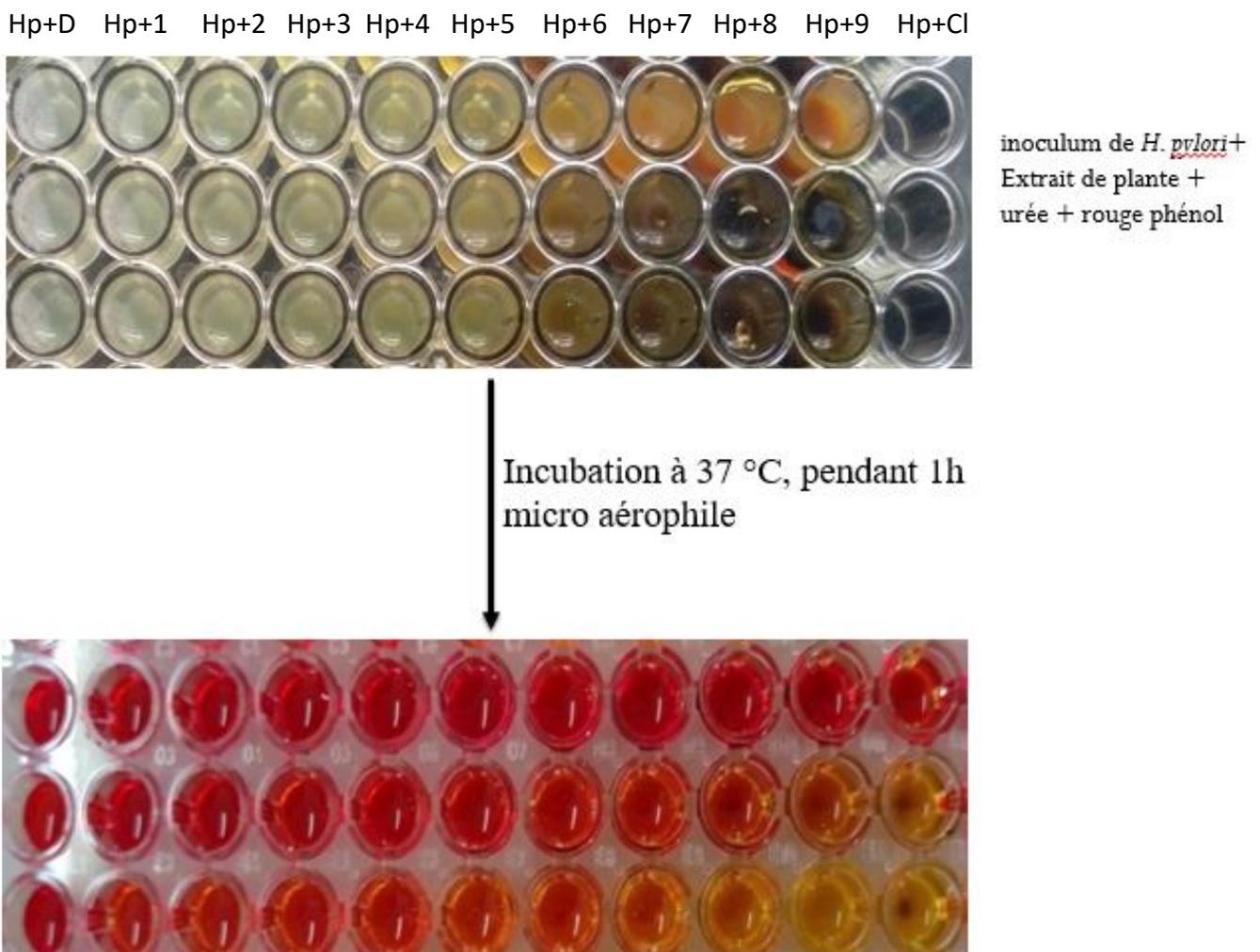
D: Décoction, M: Macération, FC: fréquence de citation

\*HNC: Herbar National du Cameroun

\*SRF/Cam: Société des Reserves Forestiers

### III.1.1.2. Inhibition de la croissance de *H. pylori* par les extraits bruts de plante

Nous avons étudié l'effet des extraits de plantes sur la croissance de *H. pylori* en utilisant un test de l'activité uréasique de *H. pylori* et la culture sur les boîtes de pétris pour confirmation. Les résultats sont illustrés sur les figures 16 et 17. L'activité anti-*H. pylori* des extraits de plantes, exprimée en CMI, est présentée dans le Tableau IX. Les valeurs de CMI des extraits de plantes sont comprises entre 0,125 et 100 mg/mL. *Spathodea campanulata* et *Nicotina tabacum* ont inhibé la croissance de *H. pylori* avec des CMI de 0,125 et 1 mg/mL respectivement.

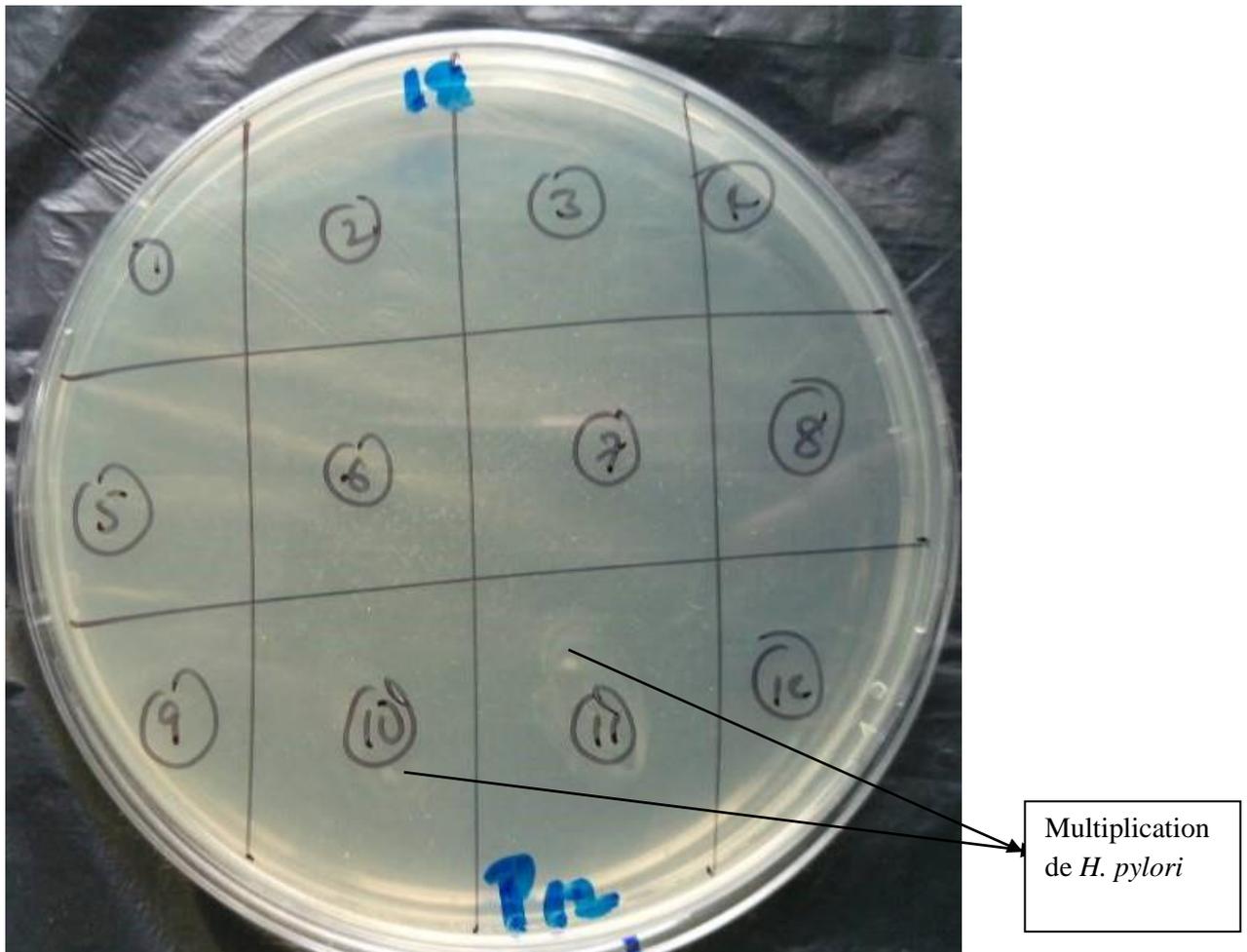


**Figure 16: Photographie de la plaque pour le test de croissance de *H. pylori* par activité uréasique**

Hp+D: *H. pylori* + DMSO, Hp+1: *H. pylori*+Extrait à la concentration 0,125mg/mL; Hp+2: *H. pylori*+Extrait à la concentration 0,25mg/mL; Hp+3: *H. pylori*+Extrait à la concentration 0,5mg/mL; Hp+4: *H. pylori*+Extrait à la concentration 1mg/mL; Hp+5: *H. pylori*+Extrait à la concentration 2mg/mL; Hp+6: *H. pylori*+Extrait à la concentration 10mg/mL; Hp+7: *H. pylori*+Extrait à la concentration 20mg/mL; Hp+8: *H. pylori*+Extrait à la concentration 50mg/mL; Hp+9: *H. pylori*+Extrait à la concentration 100mg/mL ; Hp+Cl: *H. pylori*+Clarithromycine.

La persistance de la coloration rouge indique la croissance visible des bactéries, tandis que le virage du rouge phénol au jaune implique l'inhibition de la croissance bactérienne.

La CMI de chaque extrait de plante est confirmé sur milieu solide par la culture d'une partie de l'échantillon. L'absence de multiplication de la bactérie à la plus petite concentration en extrait représente la CMI de cet extrait.



**Figure 17: Photographie de la boîte de pétri pour la culture de *H. pylori* sur milieu gélosé**

1, 2, 3, .....12 représente les différentes dilutions en extrait de plante, en *H. pylori*.

**Tableau IX: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la croissance de *H. pylori* en culture des extraits de plantes**

Extraits	Parties de la plantes	CMIs (mg/mL)
<i>Acanthus montanus</i>	Feuilles	50,0 ± 0,00
<i>Ageratum conyzoides</i>	Parties aériennes	10,0 ± 0,00
<i>Alchornea laxiflora</i>	Feuilles	20,0 ± 0,00
<i>Allanblackia florinbunda</i>	Feuilles	2,0 ± 0,00
<i>Annona muricata</i>	Feuilles	20,0 ± 0,00
<i>Anthocleista schweinfurthii</i>	Ecorces	20,0 ± 0,00
<i>Carica papaya</i>	Feuilles	50,0 ± 0,00
<i>Citrus aurantifolia</i>	Feuilles	50,0 ± 0,00
<i>Cola acuminata</i>	Ecorces	20,0 ± 0,00
<i>Commelina diffusa</i>	Feuilles	50,0 ± 0,00
<i>Croton macrostachyus</i>	Feuilles	100,0 ± 0,00
<i>Cymbopogon ciratus</i>	Feuilles	10,0 ± 0,00
<i>Dacryodes edulis</i>	Ecorces	20,0 ± 0,00
<i>Detarium microcarpum</i>	Ecorces	50,0 ± 0,00
<i>Elephantopus mollis</i>	Feuilles	50,0 ± 0,00
<i>Emilia coccinia</i>	Feuilles	20,0 ± 0,00
<i>Enantia chloranta</i>	Écorces	50,0 ± 0,00
<i>Entada africana</i>	Écorces	50,0 ± 0,00
<i>Erythrina senegalensis</i>	Feuilles	100,0 ± 0,00
<i>Euphorbia hirta</i>	Parties aériennes	20,0 ± 0,00
<i>Ficus exasperata</i>	Feuilles	50,0 ± 0,00
<i>Garcinia kola</i>	Écorces	20,0 ± 0,00
<i>Khaya grandifoliola</i>	Écorces	20,0 ± 0,00

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

**Tableau IX (Suite et fin): Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la croissance de *H. pylori* en culture des extraits de plantes**

Extraits	Partie de la plante	CMIs (mg/ml)
<i>Macaranga hurifolia</i>	Feuilles	20,0 ± 0,00
<i>Mangifera indica</i>	Écorces	20,0 ± 0,00
<i>Millettia versicolor</i>	Feuilles	50,0 ± 0,00
<i>Nicotina tabacum</i>	Feuilles	1,0 ± 0,00
<i>Ocimum basilicum</i>	Feuilles	100,0 ± 0,00
<i>Ocimum gratissimum</i>	Feuilles	20,0 ± 0,00
<i>Persea americana</i>	Écorces	50,0 ± 0,00
<i>Phragmentera capitata</i>	Feuilles	20,0 ± 0,00
<i>Piliostigma thonningii</i>	Feuilles	50,0 ± 0,00
<i>Piper umbellatum</i>	Feuilles	20,0 ± 0,00
<i>Polyscias fulva</i>	Ecorces	20,0 ± 0,00
<i>Psidium guayava</i>	Feuilles	50,0 ± 0,00
<i>Senna alata</i>	Feuilles	50,0 ± 0,00
<i>Spathodea companulata</i>	Écorces	0,125 ± 0,00
<i>Spilanthes africana</i>	Fruits	2,0 ± 0,00
<i>Triumfetta pentandra</i>	Plante entière	20,0 ± 0,00
<i>Vernonia guineensis</i>	Rhizomes	50,0 ± 0,00
<i>Voacanga africana</i>	Écorces	10,0 ± 0,00
<i>Clarithromycine</i>		1,00 ± 0,00

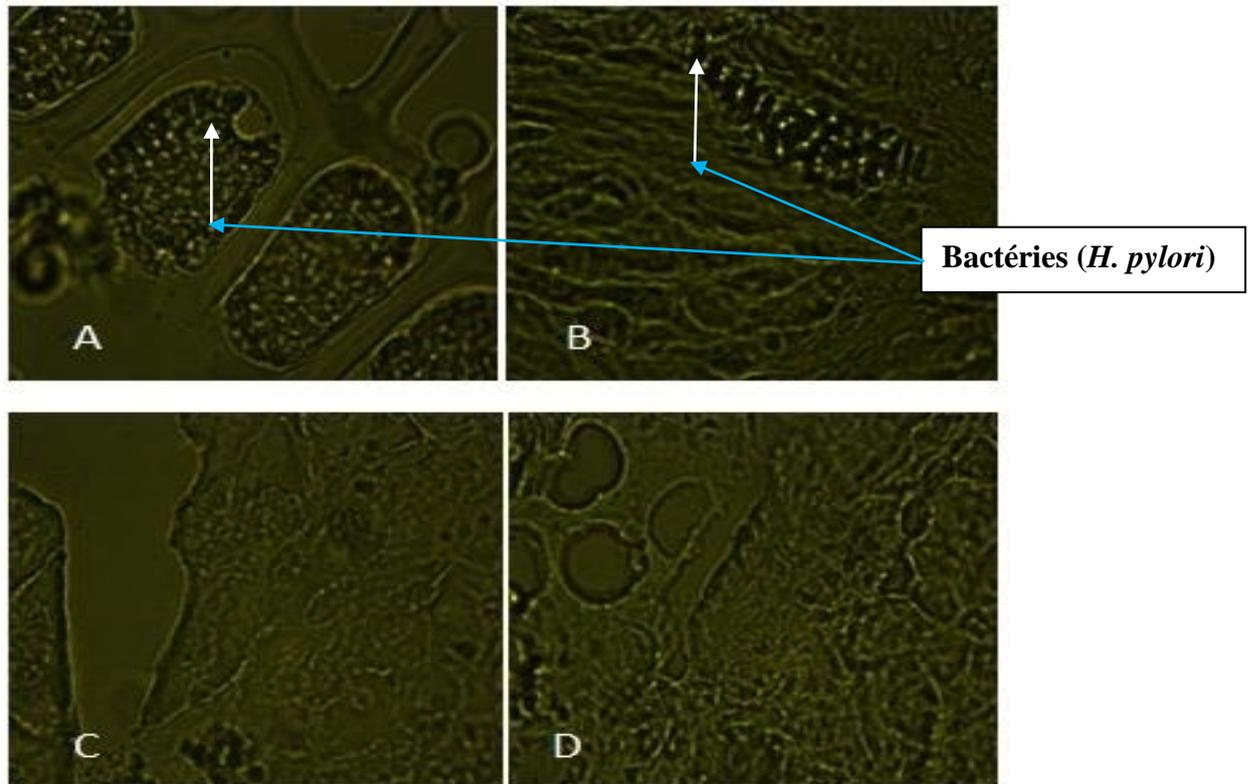
CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

### III.1.1.3. Effet des extraits bruts de plantes sur l'adhérence de *H. pylori*

#### III.1.1.3.1. Inhibition de l'adhérence de *H. pylori* au tissu d'estomac de Souris par les extraits bruts de plante

Dans cette expérience, toutes les plantes ont été testées à leur concentration minimale inhibitrice. La fixation de *H. pylori* marqué par une forte fluorescence verte a été observée dans les bactéries non traitées. Par contre avec les bactéries traitées, on observe une faible fluorescence verte traduisant ainsi l'inhibition de la fixation de *H. pylori* aux coupes de tissu gastique de souris (Figure 18). Les bactéries fluorescentes fixées ont été comptées pour chaque extrait dans 5 champs microscopiques et les moyennes sont exprimées au tableau X.

Vingt-neuf extraits de plantes ont complètement ou fortement réduit l'adhérence de *H. pylori* au tissu de souris.



**Figure 18: Coupes d'estomac de souris montrant la fixation ou non de *H. pylori* marqué au FITC**

(A) Coupe non traitée: présence de bactéries; (B) Coupe traitée au DMSO: présence de bactéries; (C, D) Coupes traitées aux extraits de plantes: absence de bactéries.

**Tableau X: Effet d'un prétraitement de 1 heure des coupes de tissu gastrique de souris avec l'extrait de plante sur l'adhérence de *H. pylori* marqué au FITC**

Extraits de plante	Nombre de bactéries adhérees	Extraits de plante	Nombre de bactéries adhérees
<i>Acanthus montanus</i>	0,00 ± 0,00	<i>Croton macrostachyus</i>	1,00 ± 1,00
<i>Ageratum Conyzoide</i>	0,00 ± 0,00	<i>Garcinia kola</i>	15,00 ± 2,00
<i>Alchornea laxiflora</i>	25,00 ± 3,00	<i>Khaya grandifoliola</i>	5,00 ± 1,73
<i>Allanblackia floribunda</i>	15,000 ± 3,21	<i>Macaranga hurifolia</i>	1,00 ± 1,00
<i>Annona muricata</i>	0,00 ± 0,00	<i>Mangifera indica</i>	0,00 ± 0,00
<i>Anthocleista schweinfurthuii</i>	5,00 ± 1,00	<i>Milletia versicolor</i>	20,00 ± 2,52
<i>Carica papaya</i>	25,00 ± 3,61	<i>Nicotina tabacum</i>	0,00 ± 0,00
<i>Citrus aurantifolia</i>	5,00 ± 1,73	<i>Ocimum basilicum</i>	5,00 ± 1,00
<i>Cola acuminata</i>	5,00 ± 0,57	<i>Ocimum gratissimum</i>	1,00 ± 1,00
<i>Commelina diffusa</i>	25,00 ± 2,64	<i>Persea americana</i>	5,00 ± 2,52

Chaque extrait de plante a été testé à sa concentration minimale inhibitrice au cours de trois expériences indépendantes. Quantification de l'adhérence bactérienne: 0, pas de fixation bactérienne; [1 à 6], faible fixation bactérienne; [7 à 24] fixation bactérienne moyenne; >25 forte fixation bactérienne.

**Tableau X: (Suite et fin): Effet d'un prétraitement de 1 heure des coupes de tissu gastrique de souris avec l'extrait de plante sur l'adhérence de *H. pylori* marqué au FITC**

<b>Extraits de plante</b>	<b>Nombre de bactéries adhérees</b>	<b>Extraits de plante</b>	<b>Nombre de bactéries adhérees</b>
<i>Cymbopogon citratus</i>	0,00 ± 0,00	<i>Phragmantera capitata</i>	5,00 ± 0,57
<i>Dacryodes edulis</i>	1,00 ± 0,57	<i>Piliostigma thonnigui</i>	25,00 ± 2,00
<i>Détarium microcapium</i>	0,00 ± 0,00	<i>Piper umbellatum</i>	5,00 ± 2,00
<i>Draceana deisteliena</i>	6,00 ± 1,53	<i>Polyscias fulva</i>	5,00 ± 1,00
<i>Euphorbia hirta</i>	20,00 ± 2,08	<i>Psidium guayava</i>	25,00 ± 2,00
<i>Elephantopus mollis</i>	15,00 ± 1,52	<i>Senna alata</i>	20 ± 2,08
<i>Emilia coccinea</i>	1,00 ± 0,57	<i>Spathodea campanulata</i>	0,00 ± 0,00
<i>Enantia chlorantha</i>	0,00 ± 0,00	<i>Spilanthes africana</i>	15,00 ± 1,73
<i>Entada africana MeOH</i>	5,00 ± 2,00	<i>Triumfetta pentandra</i>	1,00 ± 0,57
<i>Erythrina senegalensis</i>	1,00 ± 0,57	<i>Vernonia guinensis</i>	5,00 ± 1,00
<i>Ficus exasperata</i>	25,00 ± 2,00	<i>Voacanga africana</i>	1,00 ± 1,00

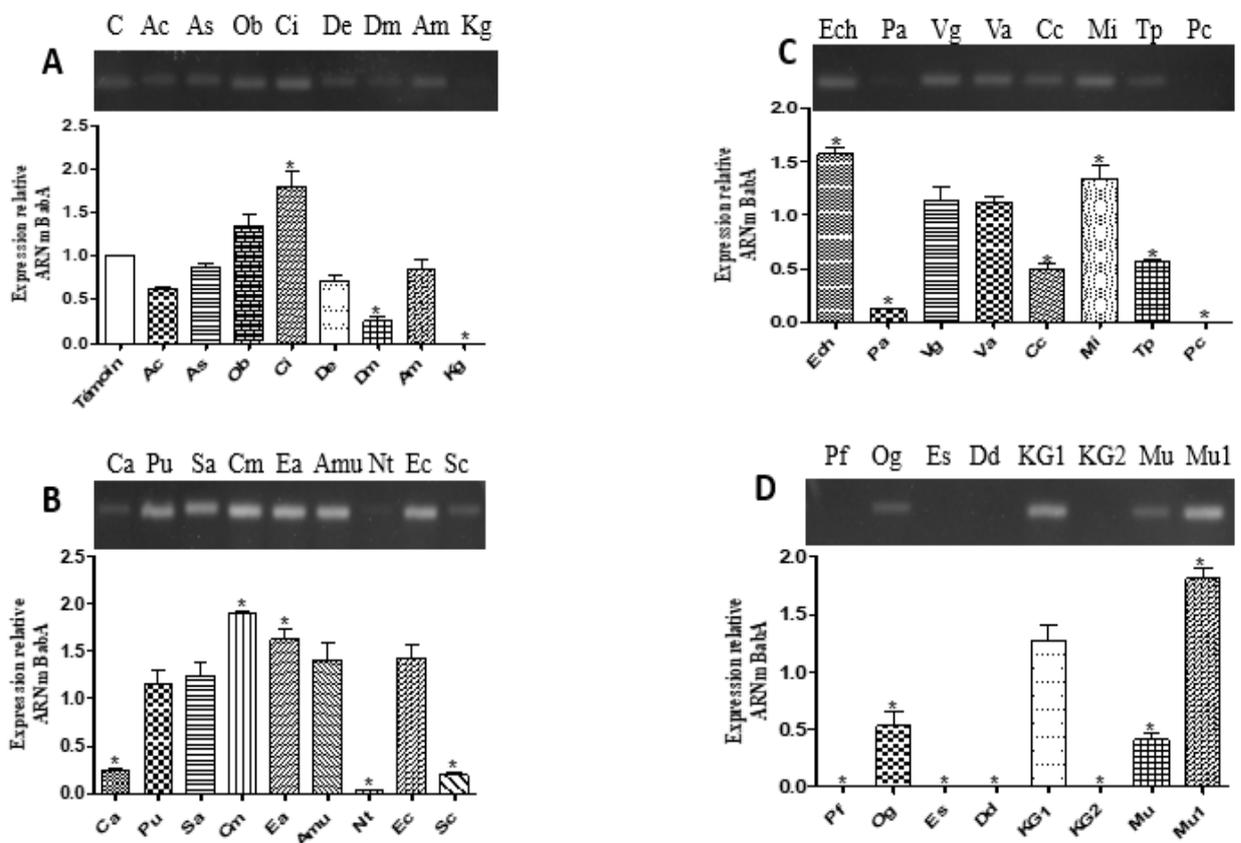
Chaque extrait de plante a été testé à sa concentration minimale inhibitrice au cours de trois expériences indépendantes. Quantification de l'adhérence bactérienne: 0, pas de fixation bactérienne; [1 à 6], faible fixation bactérienne; [7 à 24] fixation bactérienne moyenne; >25 forte fixation bactérienne

### III.1.1.3.2. Inhibition de l'expression des gènes d'adhérence par les extraits de plante

L'adhérence de *H. pylori* à l'épithélium gastrique est médiée par les molécules d'adhésine. Comme démontré dans le test d'adhésion, l'adhérence de *H. pylori* aux coupes de tissu gastrique de souris a été inhibée par certains extraits de plantes. Tous les extraits qui ont entraînés une faible fixation bactérienne ou pas de fixation bactérienne (0, pas de fixation bactérienne; [1 à 6], faible fixation bactérienne) ont été sélectionnés pour cette partie et la RT-PCR a été réalisée pour déterminer si les extraits de plantes avaient influencé l'expression des gènes de l'adhérence. Au total 30 extraits de plantes ont été testés. Le niveau d'expression des gènes d'adhérence *babA* et *hopZ* (Figures 19 et 20) par la bactérie traitée avec un extrait de plante a été évalué. Quinze extraits de plantes ont inhibé de façon significative l'expression des ARN de *babA* et *hopZ* ( $P < 0,05$ ), il s'agit de *Détarium microcapium*; *Khaya grandifoliola*; *Persea americana*; *Cymbopogon citratus*; *Triumfetta pentandra*; *Phragmantera capitata*; *Ca: Cola acuminata*; *Nicotina tabacum*; *Spathodea campanulata*; *Polyscias fulva*; *Ocimum gratissimum*; *Erythrina senegalensis*; *Dd: Draceana deisteliensia*; *KG2: Khaya grandifoliola Eth 70%*; *Mu: Macaranga urifolia Eth 70%*;

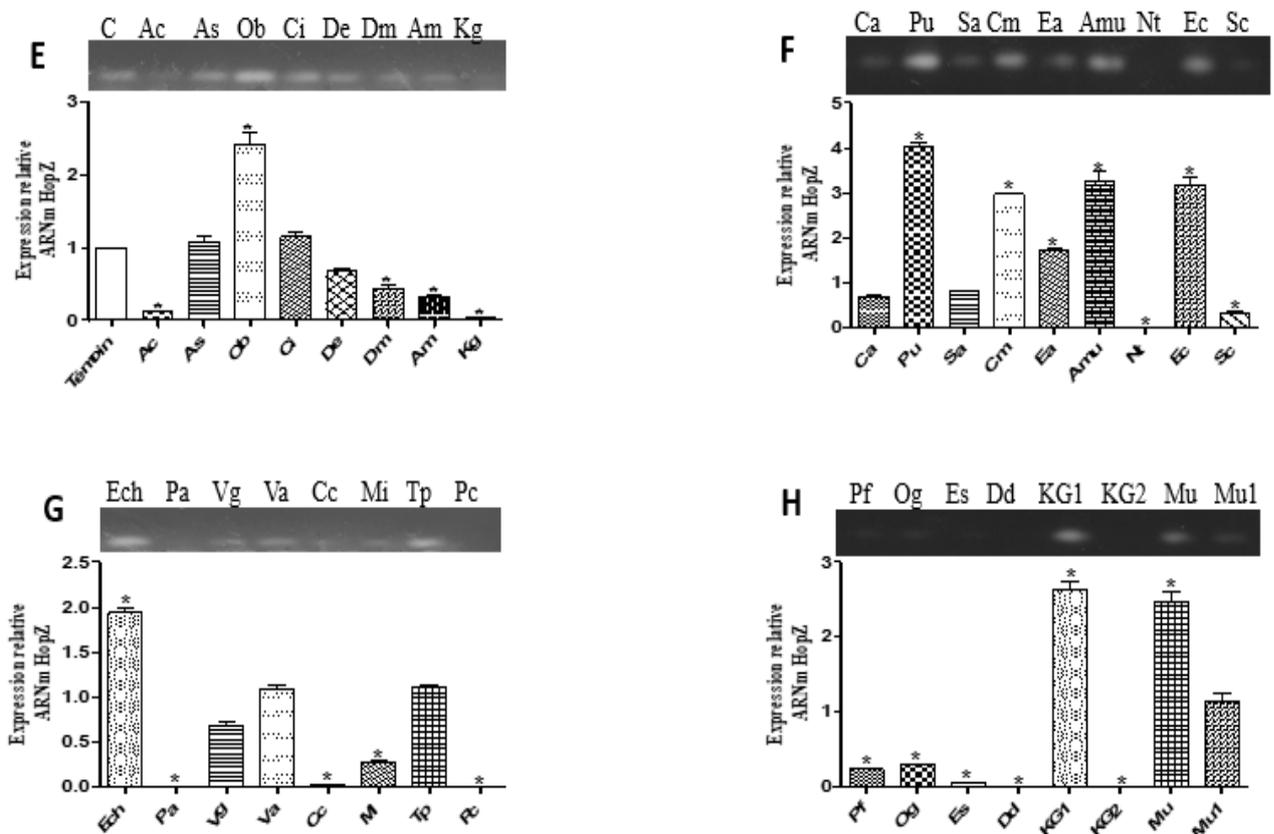
### III.1.1.3.3. Inhibition de l'expression des protéines d'adhérence par les extraits bruts de plante

Les adhésines jouent un rôle très important dans l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales. Après avoir étudié l'expression des ARNm, nous avons testé la capacité des extraits à inhiber l'expression des gènes codant pour les protéines *babA* et *hopZ*. Par conséquent, la capacité de nos extraits à inhiber l'expression des protéines *BabA* et *HopZ* a été déterminée par western blot comme présenté sur les figures 21 et 22. L'exposition de *H. pylori* aux extraits de plantes pendant 4 h a provoqué une inhibition de l'expression de la protéine *BabA* et *HopZ* de façon significative ( $P < 0,05$ ).



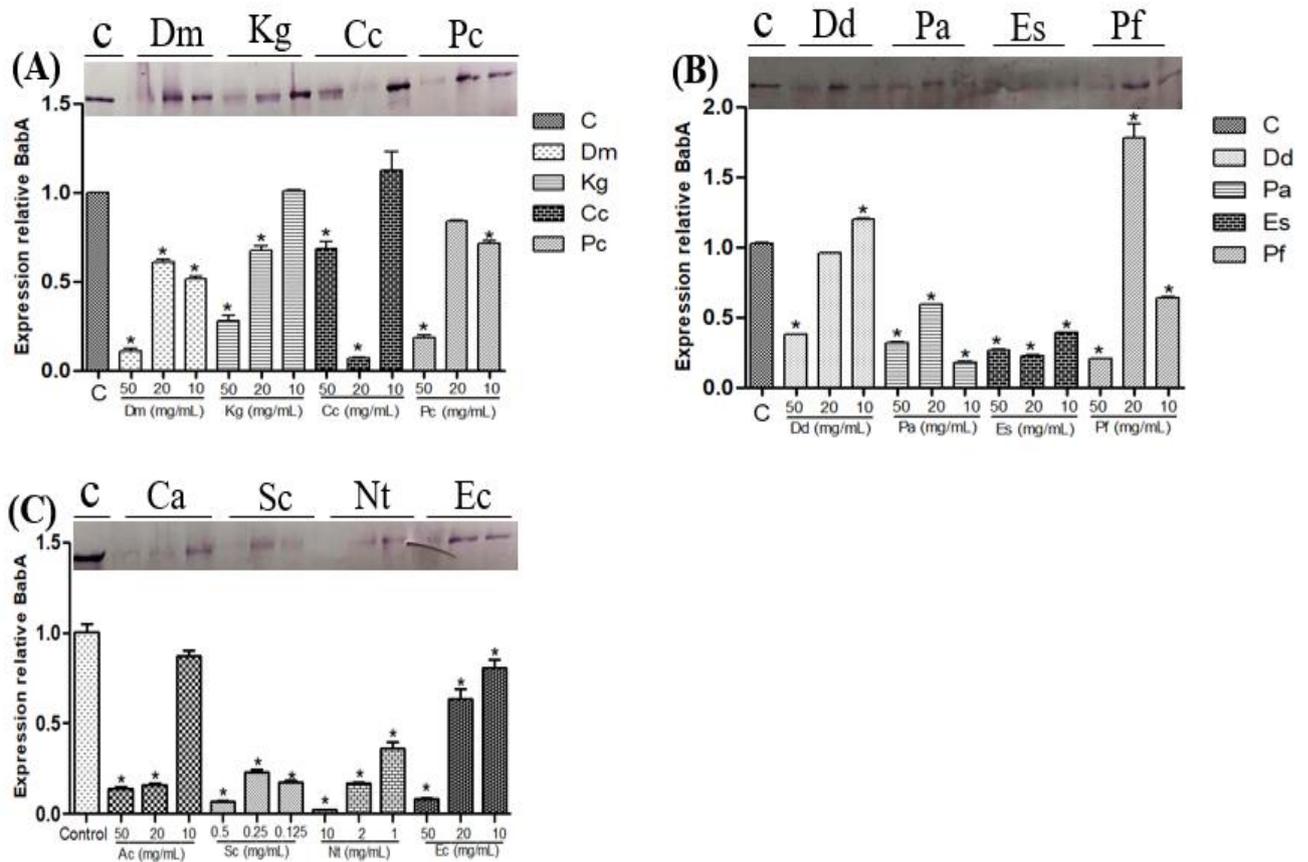
**Figure 19: Effet des extraits de plante sur l'expression du gène babA par RT-PCR**

*H. pylori* a été traité avec les extraits de plante pendant 4h. Le DMSO a été utilisé comme témoin. L'ARN a été extrait et le niveau d'expression de l'ARNm de babA a été déterminé par RT-PCR. L'image est représentative de deux expériences indépendantes. A, B, C et D représentent l'effet de l'extrait de plante sur l'expression de l'ARNm de BabA. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD de deux expériences indépendantes. Analyse ANOVA: \*  $P < 0,05$ . Valeurs significativement différentes par rapport au groupe témoin. C: témoin; Ac: *Ageratum conyzoides*; As: *Anthocleista schweinfurthui*; Ob: *Ocimum basilicum*; De: *Dacryodes edulis*; Dm: *Détarium microcapium*; Am: *Acanthus montanus*; Kg: *Khaya grandifoliola*; Ech: *Enantia chlorantha*; Pa: *Persea americana*; Vg: *Vernonia guinensis*; Va: *Voacanga Africana*; Cc: *Cymbopogon citratus*; Mi: *Mangifera indica*; Tp: *Triumfetta pentandra*; Pc: *Phragmantera capitata*; Ca: *Cola acuminata*; Pu: *Piper umbellayum*; Sa: *Spilanthes africana*; Cm: *Croton macrostachyus*; Ea: *Entada africana MeOH*; Amu: *Annona muricata*; Nt: *Nicotina tabacum*; Ec: *Emilia coccinea*; Sc: *Spathodea campanulata*; Pf: *Polyscias fulva*; Og: *Ocimum gratissimum*; Es: *Erythrina senegalensis*; Dd: *Draceana deisteliena*; KG1: *Khaya grandifoliola*; KG2: *Khaya grandifoliola Eth 70%*; Mu: *Macaranga urifolia Eth 70%*; Mu1: *Macaranga urifolia*.



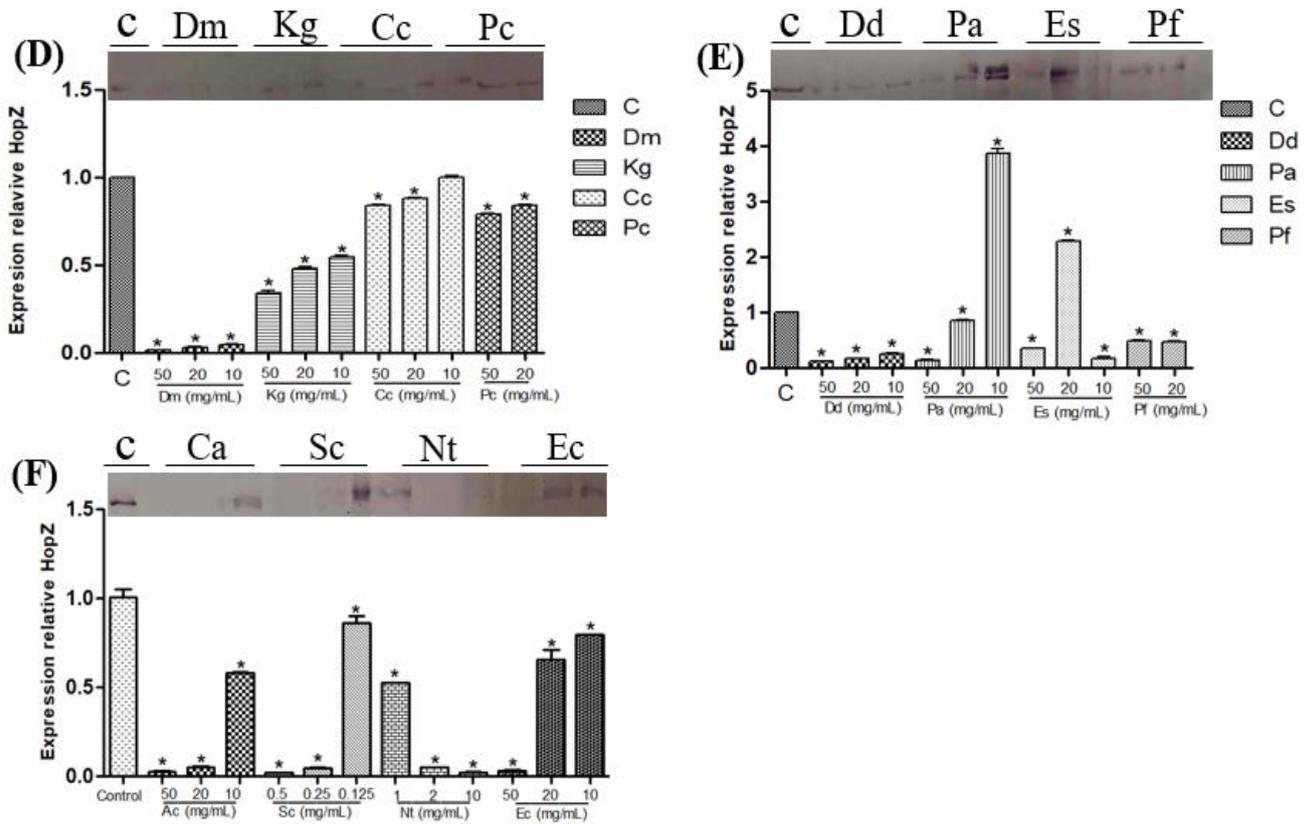
**Figure 20: Effet des extraits de plante sur l'expression du gène hopZ par RT-PCR**

*H. pylori* a été traité avec les extraits de plante pendant 4h. Le DMSO a été utilisé comme témoin. L'ARN a été extrait et le niveau d'expression de l'ARNm de babA a été déterminé par RT-PCR. L'image est représentative de deux expériences indépendantes. E, F, G et H représentent l'effet de l'extrait de plante sur l'expression de l'ARNm de HopZ. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD de deux expériences indépendantes. Analyse ANOVA: \*  $P < 0,05$ . Valeurs significativement différentes par rapport au groupe témoin. C: témoin; Ac: *Ageratum conyzoides*; As: *Anthocleista schweinfurthuii*; Ob: *Ocimum basilicum*; De: *Dacryodes edulis*; Dm: *Détarium microcapium*; Am: *Acanthus montanus*; Kg: *Khaya grandifoliola*; Ech: *Enantia chlorantha*; Pa: *Persea americana*; Vg: *Vernonia guinensis*; Va: *Voacanga Africana*; Cc: *Cymbopogon citratus*; Mi: *Mangifera indica*; Tp: *Triumfetta pentandra*; Pc: *Phragmantera capitata*; Ca: *Cola acuminata*; Pu: *Piper umbellayum*; Sa: *Spilanthes africana*; Cm: *Croton macrostachyus*; Ea: *Entada africana MeOH*; Amu: *Annona muricata*; Nt: *Nicotina tabacum*; Ec: *Emilia coccinea*; Sc: *Spathodea campanulata*; Pf: *Polyscias fulva*; Og: *Ocimum gratissimum*; Es: *Erythrina senegalensis*; Dd: *Draceana deisteliena*; KG1: *Khaya grandifoliola*; KG2: *Khaya grandifoliola Eth 70%*; Mu: *Macaranga urifolia Eth 70%*; Mu1: *Macaranga urifolia*.



**Figure 21: Effet des extraits de plante sur l'adhésine BabA de *H. pylori* P12 par Western blot**

*H. pylori* a été traité avec les extraits de plante pendant 4h. Le taux de la protéine d'adhésine BabA a été déterminé. Après traitement, les protéines totales ont été extraites et l'expression a été déterminée par Western blot. Le DMSO a été utilisé comme témoin. Chaque transfert représente l'une des deux expériences indépendantes. (A, B, C) effet de la plante sur l'expression de BabA. Analyse densitométrique des bandes pour extraits de plantes. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD de deux expériences indépendantes en triple. Les valeurs étaient significativement différentes par rapport au groupe témoin ( $p < 0,05$ ). Dm: *Détarium microcapium*; Kg: *Khaya grandifoliola*; Cc: *Cymbopogon citratus*; Pc: *Phragmantera capitata*; Dd: *Draceana deisteliena*; Pa: *Persea Americana*; Es: *Erythrina senegalensis*; Pf: *Polyscias fulva*; Ca: *Cola acuminata*; Sc: *Spathodea campanulata*; Nt: *Nicotina tabacum*; Ec: *Emilia coccinea*.



**Figure 22: Effet des extraits de plante sur l'adhésine HopZ de *H. pylori* P12 par Western blot**

*H. pylori* a été traité avec les extraits de plante pendant 4h. Le taux de la protéine d'adhésine HopZ a été déterminé. Après traitement, les protéines totales ont été extraites et l'expression a été déterminée par Western blot. Le DMSO a été utilisé comme témoin. Chaque transfert représente l'une des deux expériences indépendantes. (D, E, F) effet de la plante sur l'expression de HopZ. Analyse densitométrique des bandes pour extraits de plantes. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD de deux expériences indépendantes en triple. Les valeurs étaient significativement différentes par rapport au groupe témoin ( $p < 0,05$ ) Dm: *Détarium microcapium*; Kg: *Khaya grandifoliola*; Cc: *Cymbopogon citratus*; Pc: *Phragmantera capitata*; Dd: *Draceana deisteliena*; Pa: *Persea Americana*; Es: *Erythrina senegalensis*; Pf: *Polyscias fulva*; Ca: *Cola acuminata*; Sc: *Spathodea campanulata*; Nt: *Nicotina tabacum*; Ec: *Emilia coccinea*.

Le tableau XI est un récapitulatif de l'activité sur l'expression des gènes (ARNm et protéines) (BabA et HopZ) de *H. pylori* en présence des extraits de plante à leurs concentration minimal inhibitrice. A l'issu de cet activité, il ressort que trois extraits de plantes ont inhibées à la fois la production des ARNm et des adhésines BabA et HopZ. Il s'agit de *Nicotina tabacum* (1mg/mL), *Polysia fulva* (20mg/mL) et *Spathodea campanulata* (0,125mg/mL). Sur la base de la plus petite CMI qui a inhibé non seulement la croissance mais aussi l'adhérence de *H. pylori*, *Spathodea campanulata* a été sélectionné pour la suite du travail.

**Tableau XI: Récapitulatif de l'effet des extraits de plantes sur l'expression des gènes et protéines BabA et HopZ chez *H. pylori***

Extrait de plante (CMI mg/mL)	BabA		HopZ	
	ARN	Protéine	ARN	Protéine
<i>Ca</i> (20)	-	-	+	+
<i>Dd</i> (20)	-	-	-	+
<i>Cc</i> (10)	+	-	+	-
<i>Dm</i> (50)	-	+	-	+
<i>Ec</i> (10)	-	+	+	+
<i>Es</i> (50)	-	+	+	+
<i>Kg</i> (10)	+	-	+	+
<i>Nt</i> (1)	+	+	+	+
<i>Pa</i> (50)	+	+	+	-
<i>Pf</i> (20)	+	+	+	+
<i>Sc</i> (0,125)	+	+	+	+
<i>Pc</i> (20)	+	+	-	+

+ Inhibition, – pas d'inhibition, *Ca*: *Cola acuminata*; *Kg*: *Khaya grandifoliola*; *Cc*: *Cymbopogon citratus*; *Pa*: *Persea Americana*; *Es*: *Erythrina senegalensis*; *Pf*: *Polyscias fulva*; *Sc*: *Spathodea campanulata*; *Nt*: *Nicotina tabacum*; *Ec*: *Emilia coccinea*. *Dm*: *Détarium microcapium*; *Pc*: *Phragmantera capitata*; *Dd*: *Draceana deisteliensia*; *Sc*: *Spathodea campanulata*; *Nt*: *Nicotina tabacum*; *Ec*: *Emilia coccinea*.

## Conclusion partielle 1

Au terme de cette 1<sup>ère</sup> partie de notre travail dont l'objectif était de rechercher l'effet des plantes utilisées par les tradipraticiens pour soigner les affections gastriques sur la croissance et l'adhérence de *H. pylori*. Il en ressort que,

- Quarante et une (41) espèces de plantes appartenant à 27 familles ont été collectées dans le cadre de cette étude. Le plus grand nombre d'espèces cité appartenait à la famille des *astéracées* (5 espèces), suivi des *Euphorbiaceae* (4 espèces).
- Tous les 41 extraits de plantes ont inhibé la croissance de *H. pylori* avec les concentrations minimales inhibitrices comprises entre 0,125 et 100 mg/mL. L'inhibition la plus forte a été observée avec l'extrait de *S. campanulata*
- Quinze (15) extraits de plantes ont inhibé l'adhérence de *H. pylori* aux tissus d'estomac de souris, parmi lesquels trois d'entre-elles ont inhibé l'expression des ARNm et des adhésines BabA et HopZ. En somme, l'extrait de *S. campanulata* a démontré la plus forte activité inhibitrice sur la croissance et l'adhérence de *H. pylori*.

### III.1.2. Effet des fractions de l'extrait actif sur la croissance, l'adhérence de *H. pylori*.

Six fractions de l'extrait de *S. campanulata* ont été obtenues (A, B, C, D, E et F) (Figure 13).

#### III.1.2.1. Inhibition de la croissance de *H. pylori* par les fractions de *S. campanulata*

Les activités inhibitrices de toutes les fractions qui ont eu un diamètre d'inhibition supérieur ou égale à 8 mm ( $\geq 8$ ) sont représentés ci-dessous (Tableau XII). Les valeurs de quantité minimale active (QMA) allaient de 0,1 mg à 10 mg en fonction des fractions. La valeur de diamètre d'inhibition la plus élevée à la concentration de 0,1 mg/mL a été obtenue avec les fractions B et E.

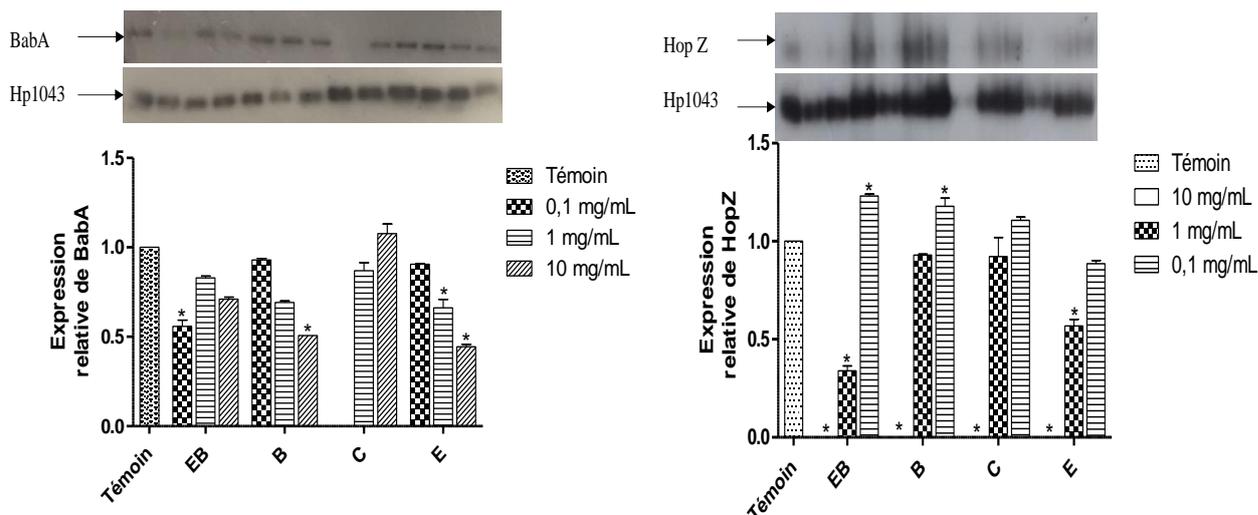
**Tableau XII: Diamètres d'inhibition et quantités minimales actives (mg) des fractions de *S. campanulata***

Extrait	Concentrations (mg/mL)			
	0,1	1,0	10,0	QMA (mg)
EB	0	9,6 ± 0,8	16,6 ± 0,7	1,0
B	11,3 ± 1,2	12,7 ± 2,1	14,1 ± 1,0	0,1
C	10 ± 0,0	12,0 ± 1,0	16,3 ± 2,5	0,1
E	12 ± 0,0	13,7 ± 0,6	15,8 ± 0,3	0,1
Kanamycine (2,5 mg/mL)			35,7 ± 0,6	

*EB*: Extrait brut; *B*: Fraction à l'hexane/Acétate d'éthyle 25%; *C*: Fraction à l'hexane/acétate d'éthyle 50%; *E*: Fraction à l'acétate d'éthyle

#### III.1.2.2. Inhibition de l'expression des protéines d'adhérence BabA et HopZ par les fractions de *S. campanulata*

Les résultats du Western Blot ont révélé que le traitement de *H. pylori* en culture par certaines fractions a réduit l'expression de *BabA* et *HopZ*. Comme le montre la figure 23, l'exposition de *H. pylori* aux fractions de plante à la concentration de 0,1; 1 et 10 mg/mL pendant 4h a entraîné une diminution marquée des taux de protéines *BabA* et *HopZ*. Les poids moléculaires des protéines *BabA* et *HopZ* de *H. pylori* sont 78 et 74 KDa et sur cette base, nous avons observé l'inhibition de la synthèse ces protéines dans les cellules traitées.



**Figure 23: Effet des fractions de *S. campanulata* sur la molécule d'adhésine BabA et HopZ de *H. pylori* (souche Hp G27)**

*H. pylori* a été traité avec les fractions de plante pendant 4h. Les taux de protéines d'adhésine BabA et HopZ ont été déterminés. Après traitement, les protéines totales ont été extraites et leur expression a été déterminée par Western blot. Le DMSO a été utilisé comme témoin. Chaque transfert représente l'une des deux expériences indépendantes. L'analyse densitométrique des bandes pour les fractions d'extrait de plantes a été faite par Image J. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD de deux expériences indépendantes. Les valeurs sont significativement différentes par rapport au groupe témoin ( $P < 0,05$ ). **EB**: Extrait brut; **B**: Fraction à l'hexane/Acétate d'éthyle 25%; **C**: Fraction à l'hexane/Acétate d'éthyle 50%; **E**: Fraction à l'acétate d'éthyle

### III.1.2.3. Effet des sous-fractions de *S. campanulata* sur la croissance de *H. pylori*

Les fractions B et E ont été retenues et séparées en sous fractions, pour B (SB1 et SB2) et E (SE1 et SE3). L'activité inhibitrice de toutes les sous-fractions qui ont eu un diamètre d'inhibition supérieur ou égale à 8 ( $\geq 8$ ) sont représentés ci-dessous (Tableau XIII). Les valeurs de quantité minimale active (QMA) variaient entre 0,1 mg et 10 mg en fonction des sous-fractions. La valeur de diamètre d'inhibition la plus élevée à la concentration de 0,1 mg/mL a été obtenue avec la sous fraction SB2 sur *H. pylori*.

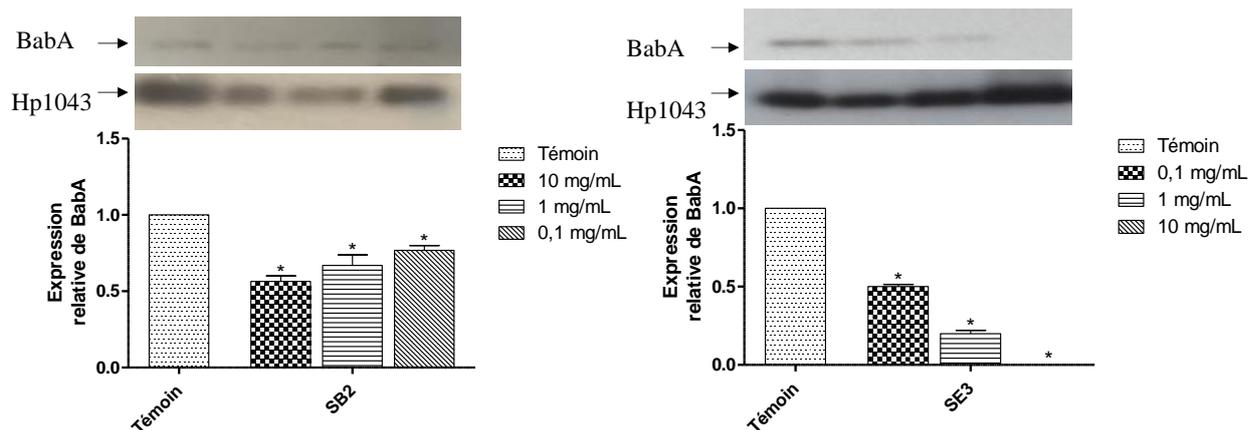
**Tableau XIII: Diamètres d'inhibition et quantités minimales actives (mg) des sous-fractions des fractions actives de *Spathodea campanulata***

Extrait	Concentrations (mg/mL)			
	0,1	1,0	10,0	QMA (mg)
<b>SB1</b>	0	8,7 ± 2,3	10,7 ± 0,6	1
<b>SB2</b>	9,3 ± 0,6	9,7 ± 0,6	11,3 ± 2,5	0,1
<b>SE1</b>	0	0	8 ± 0,0	10,0
<b>SE3</b>	0	11 ± 0,0	13,0 ± 1,0	1,0
<b>Kanamycine (2.5 mg/mL)</b>			35,7 ± 0,6	

*SB1 et SB2: Sous fraction au dichlorométhane/MeOH (70 et 90%); SE1 et SE3: Sous-fraction hydrométhanolique (50 et 70%)*

#### **III.1.2.4. Effet des sous-fractions de l'extrait de *S. campanulata* sur l'adhérence de *H. pylori***

L'exposition de *H. pylori* aux sous-fractions de l'extrait de la plante pendant 4h a entraîné une diminution marquée des taux de protéines BabA et HopZ, comme le montrent les figures 24 et 25. Sur la base de leur poids moléculaire respectif, nous avons observé la suppression de la synthèse des protéines BabA par la sous fraction SE3 et HopZ par les deux sous fractions SB2 et SE3 dans les cellules traitées.



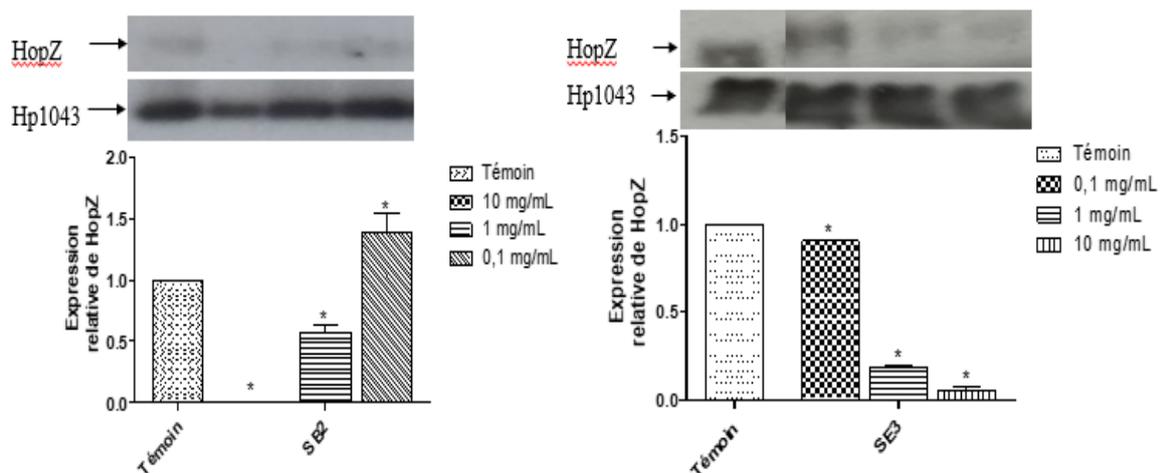
**Figure 24: Effet des sous-fractions de *S. campanulata* sur la molécule d'adhésine BabA de *H. pylori***

*H. pylori* a été traité avec les fractions de plante pendant 4h. Le taux de la protéine d'adhésine BabA a été déterminé. Après traitement, les protéines totales ont été extraites et leur expression a été déterminée par Western blot. Le DMSO a été utilisé comme témoin. Chaque transfert représente l'une des deux expériences indépendantes. L'analyse densitométrique des bandes pour les fractions d'extrait de plantes a été faite par ImageJ. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD de deux expériences indépendantes. Les valeurs sont significativement différentes par rapport au groupe témoin ( $P < 0,05$ ). **SB2**: Sous fraction au dichlorométhane/MeOH (90%); **SE3**: Sous fraction au Méthanol/H<sub>2</sub>O (70%).

### III.1.2.5. Profil phytochimique de l'extrait actif

#### III.1.2.5.1. Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes de l'extrait brut et des fractions de *S. campanulata*

Les teneurs en polyphénols et flavonoïdes des fractions et extraits de *S. campanulata* sont représentées dans le tableau XV. Ces teneurs varient de 43,04 à 68,75 mg EAG/g d'extrait de plante pour les polyphénols et de 1,79 à 7,10 mg EQ/g d'extrait de plante pour les flavonoïdes. La fraction à l'acétate d'éthyle présente des teneurs élevées en polyphénols (68,75 mg EAG/g) et flavonoïdes (7,10 mg EQ/g).



**Figure 25: Effet des sous-fractions de *S. campanulata* sur la molécule d'adhésine HopZ de *H. pylori***

*H. pylori* a été traité avec les fractions de plante pendant 4h. Le taux de la protéine d'adhésine HopZ a été déterminé. Après traitement, les protéines totales ont été extraites et leur expression a été déterminée par Western blot. Le DMSO a été utilisé comme témoin. Chaque transfert représente l'une des deux expériences indépendantes. L'analyse densitométrique des bandes pour les fractions d'extrait de plantes a été faite par ImageJ. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD de deux expériences indépendantes. Les valeurs sont significativement différentes par rapport au groupe témoin ( $P < 0,05$ ). **SB2**: Sous fraction au dichlorométhane/MeOH (90%); **SE3**: Sous fraction au Méthanol/H<sub>2</sub>O (70%).

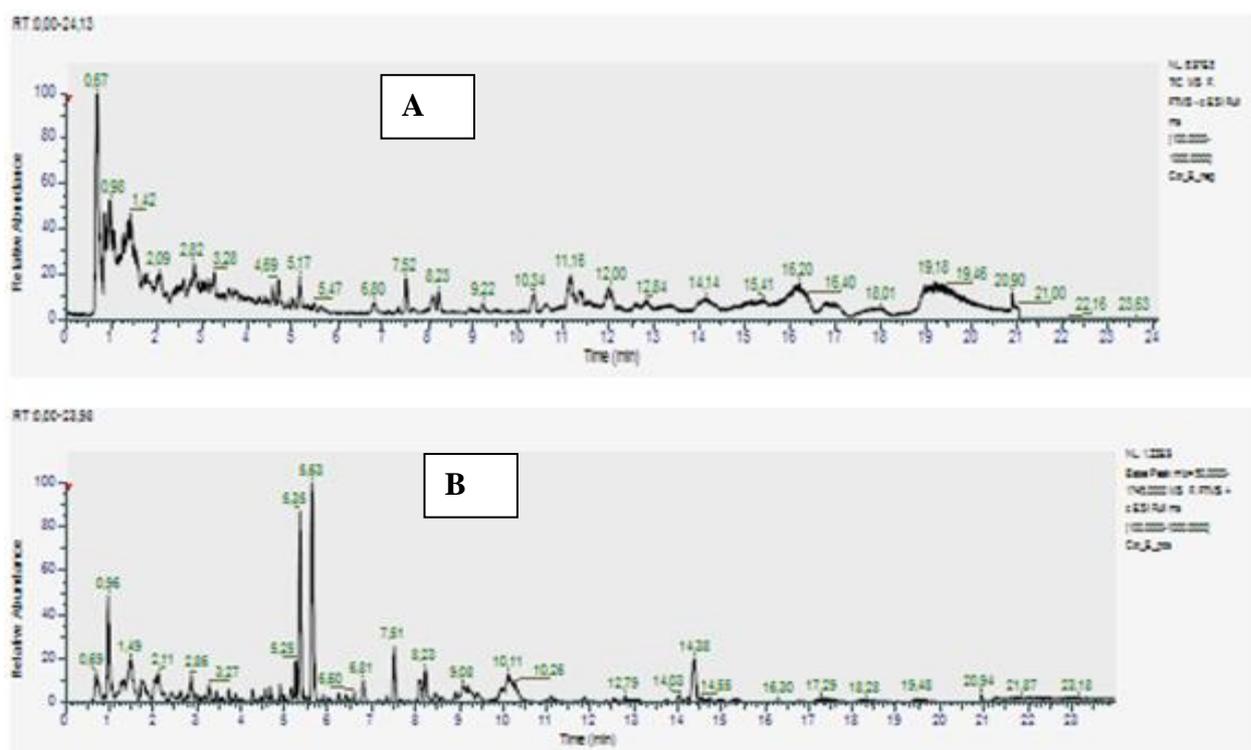
### III.1.2.5.2. Structures des composés présents dans la fraction E et la sous-fraction SE3

L'analyse de la fraction active E et sa sous fraction SE3 par CLHP – MS a montré plusieurs pics avec des temps de rétention et d'intensité variables représentant les différents composés contenus dans cette fraction et sous fraction. Les figures 26, 27 et 28 ci-dessous illustrent la composition de la fraction E et la sous-fraction SE3. Les temps de rétention des composés ainsi que leurs formules brutes sont regroupés dans le Tableau XIV ci-dessous.

**Tableau XIV: La Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes de l'extrait et des fractions d'écorces de *S. campanulata***

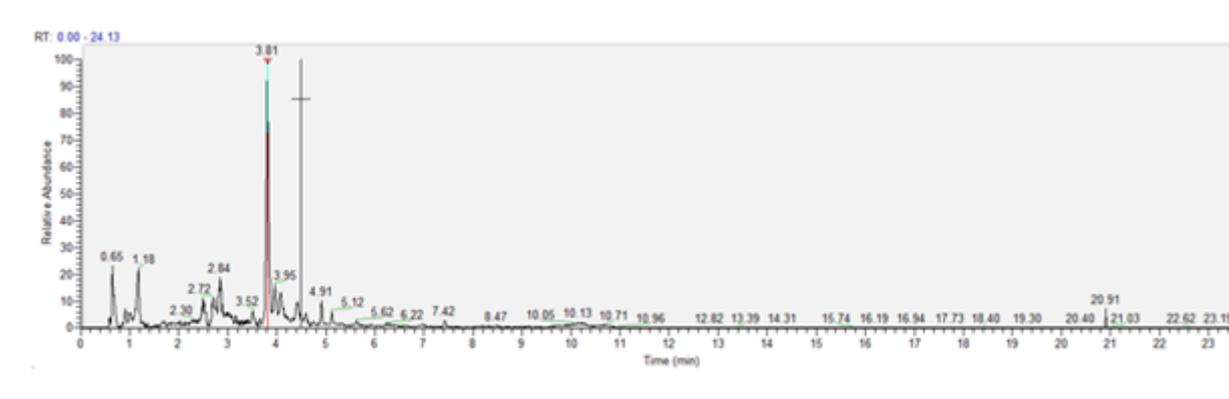
Extrait brut et fractions							
	A	B	C	D	E	F	EB
<b>TPT (mg EAG/g d'extrait)</b>	46,43 ± 0,48	43,04 ± 0,13	52,99 ± 0,00	48,27 ± 0,01	68,75 ± 0,32	56,34 ± 1,14	51,38 ± 0,00
Extrait brut et fractions							
	A	B	C	D	E	F	EB
<b>TF (mg EQ/g d'extrait)</b>	2,79 ± 0,1	1,79 ± 0,00	1,88 ± 0,02	2,02 ± 0,00	7,10 ± 0,02	1,86 ± 0,12	5,23 ± 0,15

**EB:** Extrait brut; **A:** Fraction à l'hexane; **B:** Fraction à l'hexane/Acétate d'éthyle 25%; **C:** Fraction à l'hexane/Acétate d'éthyle 50%; **D:** Fraction à l'hexane/Acétate d'éthyle 75%; **E:** Fraction à l'acétate d'éthyle; **F:** Fraction au méthanol; **TPT:** teneurs en polyphénols totaux; **TF:** teneurs en flavonoïdes; **EAG:** equivalent Acide Gallique; **EQ:** equivalent de Quercetine



**Figure 26: Le chromatogramme total de la fraction E A: ion négatif, B: ion positif**

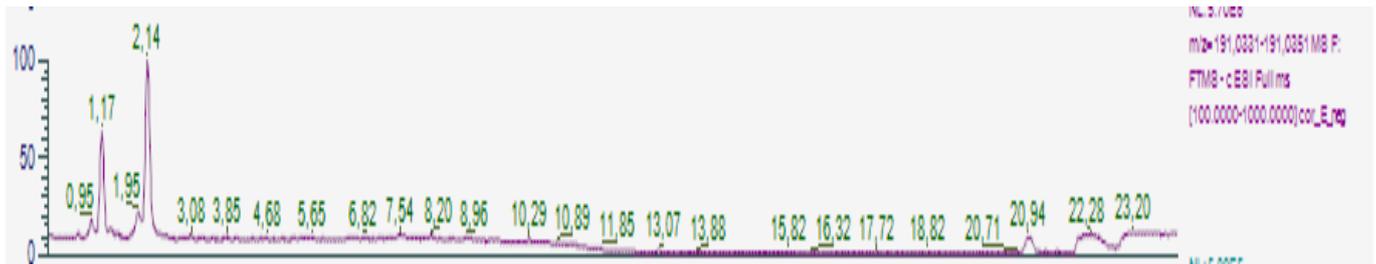
Le chromatogramme CLHP-MS de la fraction à l'acétate d'éthyle (E), nous a permis d'identifier un mélange de composés à savoir l'acide ursolique, le kaempférol 3-glucoside, l'acide tomentosolique, le spathodol, méthyl-4-hydroxybenzoate et le 5,7-dihydroxy-4-methylcoumarine. L'analyse de la sous-fraction SE3 par CLHP a montré plusieurs pics avec des temps de rétention et d'intensités variables représentant les différents composés contenus dans cette sous-fraction. Le chromatogramme HPLC de la sous-fraction SE3 (figure 27) a indiqué plusieurs pics et celui avec le temps de rétention de 3,81 min a été désigné comme le kaempférol (Tableau XV).



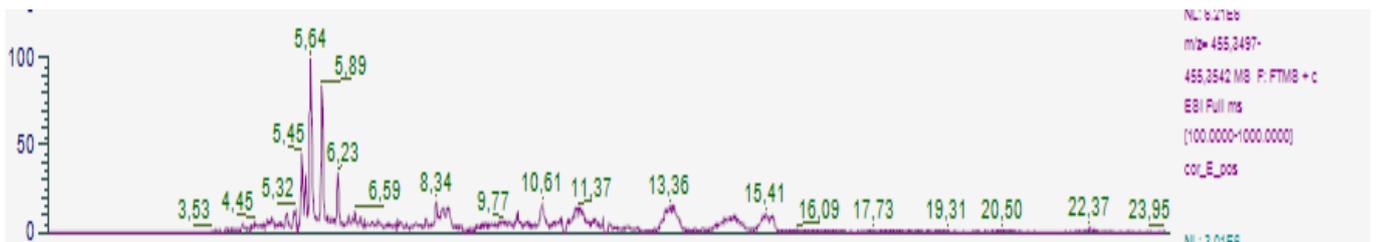
**Figure 27: Chromatogramme de la sous-fraction SE3**



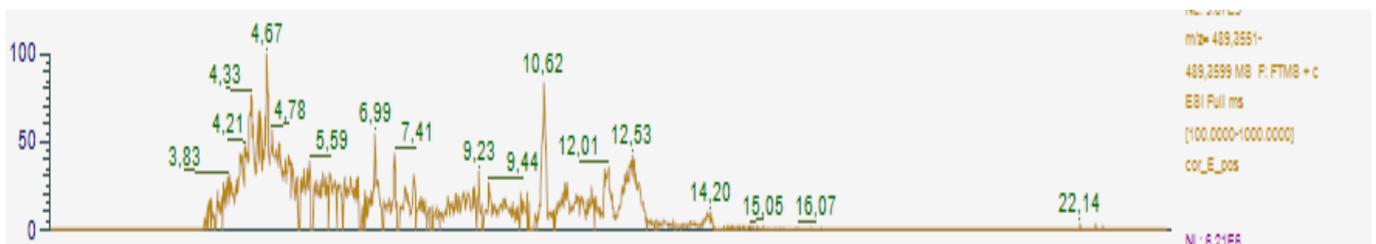
TR: 2,15; 5,7-dihydroxy 4-methylcoumarine (positive)



TR: 2,14; 5,7-dihydroxy 4-methylcoumarine (négative)



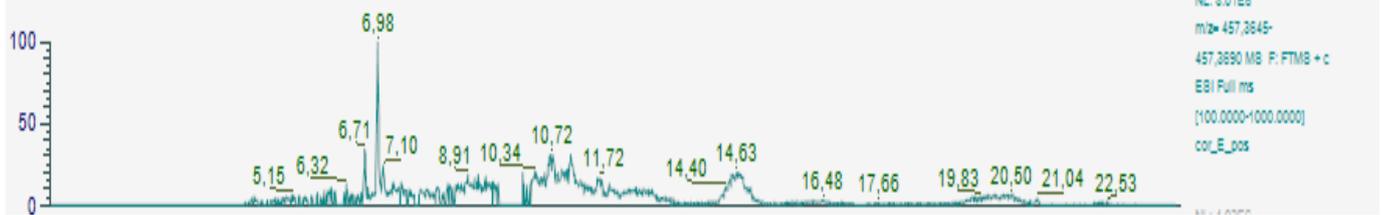
TR: 5,64; Acide Tomentosolique (positive)



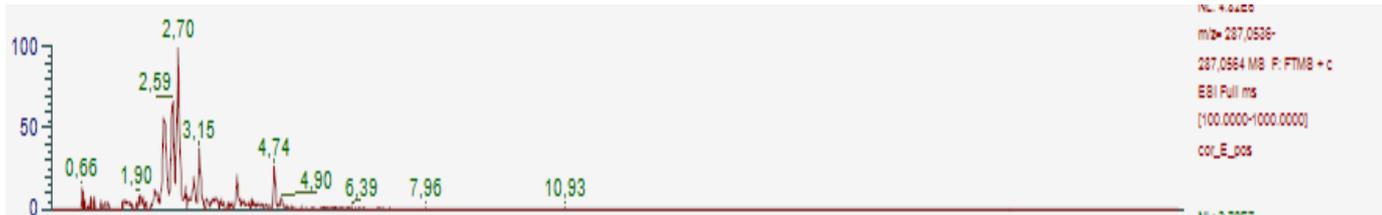
TR: 10,62; Acide spathodique (positive)

**Figure 28: Chromatogramme des différents composés détectés avec leur temps de rétention pour la fraction E**

*TR: Temps de rétention*



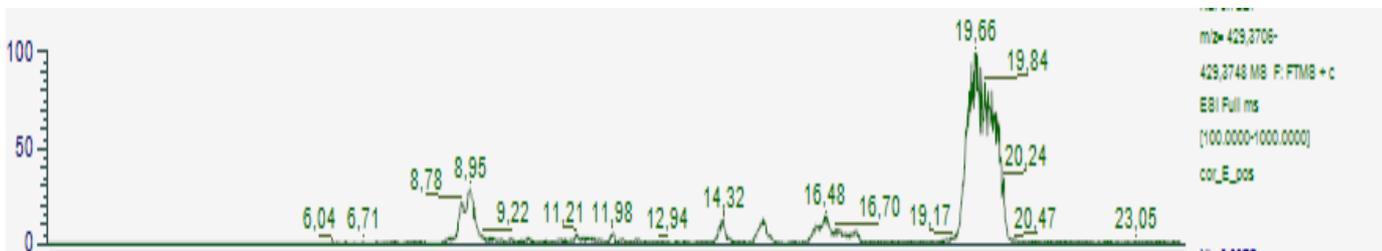
TR: 6,98; Acide ursolique



TR: 2,70; Kaempferol (positive)



TR: 4,74; Kaempferol (negative)

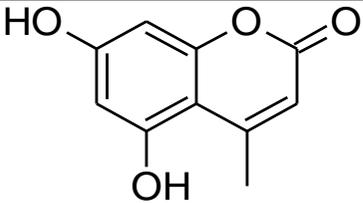
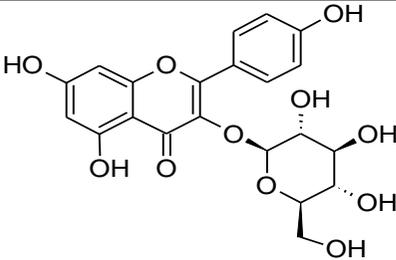
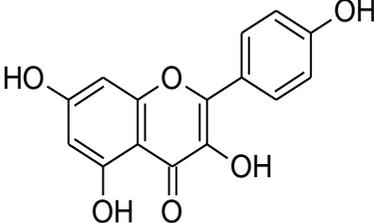


TR: 8,95; Spathodol (positive)

**Figure 28 (suite et fin): Chromatogramme des différents composés détectés avec leur temps de rétention pour la fraction E**

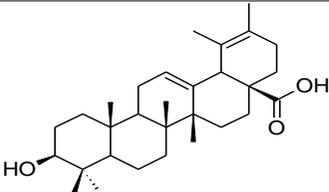
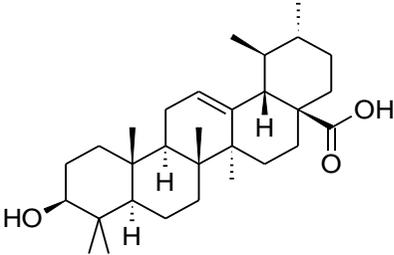
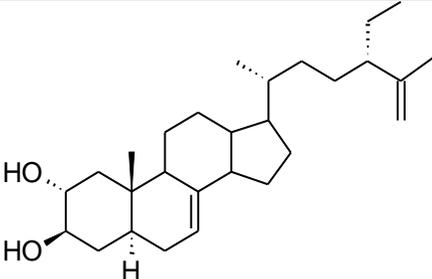
*TR: Temps de rétention*

**Tableau XV: Temps de retention, formule brute et noms des composés**

Fraction	TR/min	Mode d'ion	Ion précurseur	Fragments	Formule moléculaire	Structure	Identification	Référence
<b>E</b>	2,15	[M+H] <sup>+</sup>	193,0498	178,0258; 150,0311; 133,0283; 137,0595	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>		5,7-dihydroxy-4-methylcoumarine	
	2,14	[M-H] <sup>-</sup>	191.0341	176,0106; 148,0155; 104,0255	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>		5,7-dihydroxy-4-methylcoumarine	
	2,72	[M+H] <sup>+</sup>	449,1078	287,0551	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>		Kaempferol -3-glucoside	Nazif , 2007
	4,74	[M-H] <sup>-</sup>	285,0405	229,2277, 151,0029; 133,0284	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>		Kaempférol	Lifongo <i>et al.</i> , 2014

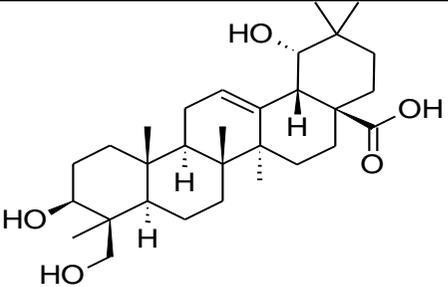
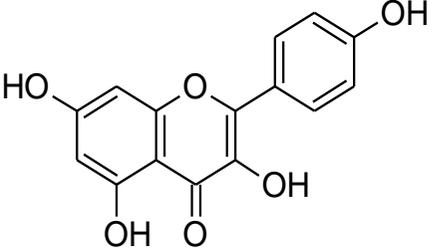
*TR: Temps de retention; E: Fraction a l'acétate d'ethyle*

**Tableau XV (suite) : Temps de retention, formule brute et noms des composés**

Fraction	TR/min	Mode d'ion	Ion précurseur	Fragments	Formule moléculaire	Structure	Identification	Référence
	5,64	[M+H] <sup>+</sup>	455,3516	437,3415; 409,3470; 391,3368; 219,1742	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>		Acide Tomentosolique	Heim <i>et al.</i> , 2012
	6,98	[M+H] <sup>+</sup>	457,3313	439,3628; 411,3253; 393,3140; 339,2325; 175,1483	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>		Acide ursolique	Heim <i>et al.</i> , 2012; Lifongo <i>et al.</i> , 2014
	8,95	[M+H] <sup>+</sup>	429,3725	412,3649; 346,2809; 317,2466; 303,2307; 289,21592; 177,0911; 151,0753; 137,0596	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>		Spathodol	Heim <i>et al.</i> , 2012; Ngouela <i>et al.</i> , 1988

*TR*: Temps de retention; *E*: Fraction a l'acétate d'ethyle

**Tableau XV (suite et fin): Temps de retention, formule brute et noms des composés**

Fraction	TR/min	Mode d'ion	Ion précurseur	Fragments	Formule moléculaire	Structure	Identification	Référence
	10,62	[M+H] <sup>+</sup>	489,3585		C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>		Acide Spathodique	Heim <i>et al.</i> , 2012
<b>SE3</b>	3,81	[M-H] <sup>-</sup>	285,0405	151,0025; 133,0283	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>		Kaempférol	Lifongo <i>et al.</i> , 2014

*TR*: Temps de retention; *E*: Fraction à l'acétate d'éthyle; *SE3*: Sous-fraction au méthanol/eau 70%

## Conclusion partielle 2

Au terme de cette deuxième partie de notre travail dont l'objectif était de déterminer l'effet des fractions de l'extrait actif sur la croissance, l'adhérence de *H. pylori*. Il en ressort que,

- Les fractions à l'acétate d'éthyle et à l'hexane/acétate d'éthyle 25% ont inhibé la croissance et l'expression des adhésines *BabA* et *HopZ* de *H. pylori*.
- La fraction à l'acétate d'éthyle présente des teneurs élevées en polyphénols totaux et flavonoïdes. Cette fraction est un mélange de plusieurs composés phytochimiques: acide ursolique, acide spathodique, acide tomentosolique, spathodol, kaempférol et 5,7-diméthyl-4-hydroxybenzoate. La sous fraction SE3 renferme du kaempférol.

A l'issu de cette partie, les fractions à l'acétate d'éthyle (E) et à l'hexane/acétate d'éthyle 25 % (B) qui ont présenté de meilleures activités sur la croissance et l'adhérence de *H. pylori* ont été sélectionnées et testées sur les facteurs de virulence CagA et uréase.

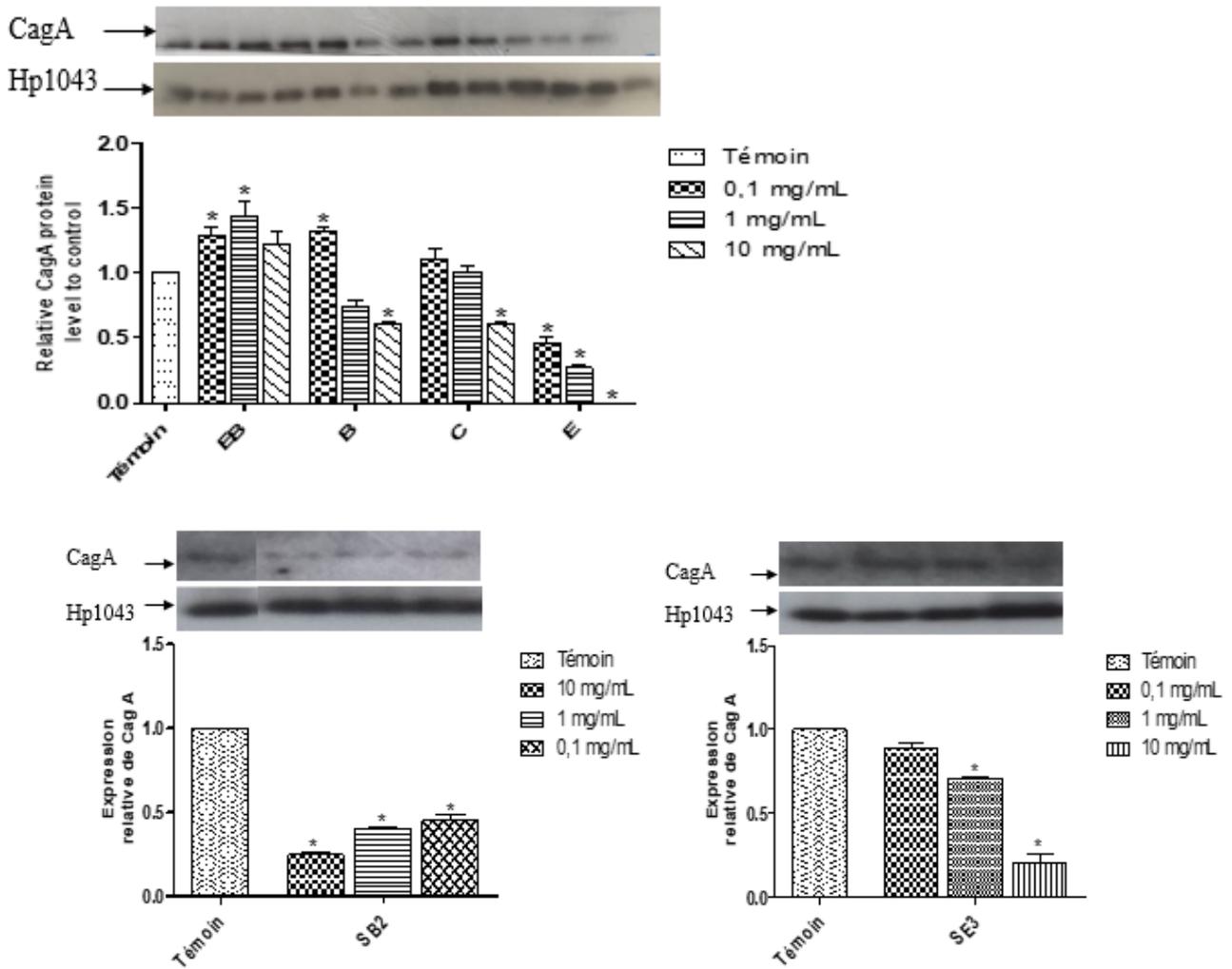
### **III.1.3. Effet des sous-fractions de *S. campanulata* sur les facteurs de virulence CagA et uréase de *H. pylori***

Dans cette partie du travail, il a été question de déterminer l'effet des sous-fractions des fractions sélectionnées l'expression de la cytotoxine CagA et l'uréase de *H. pylori*.

Deux sous-fractions ont été obtenues pour chaque fraction: SB1 et SB2 pour la fraction B et SE1 et SE3 pour la fraction E (Figure 14).

#### **III.1.3.1. Inhibition de l'expression de la cytotoxine CagA par les fractions et sous-fractions de *S. campanulata***

Les résultats du Western Blot ont révélé que le traitement de *H. pylori* en culture avec certaines fractions réduisait l'expression de la cytotoxine CagA. Comme le montre la figure 29, nous avons observé une inhibition significative de l'expression de la cytotoxine CagA avec les fractions B, C et E et des sous-fractions SE3 et SB2.

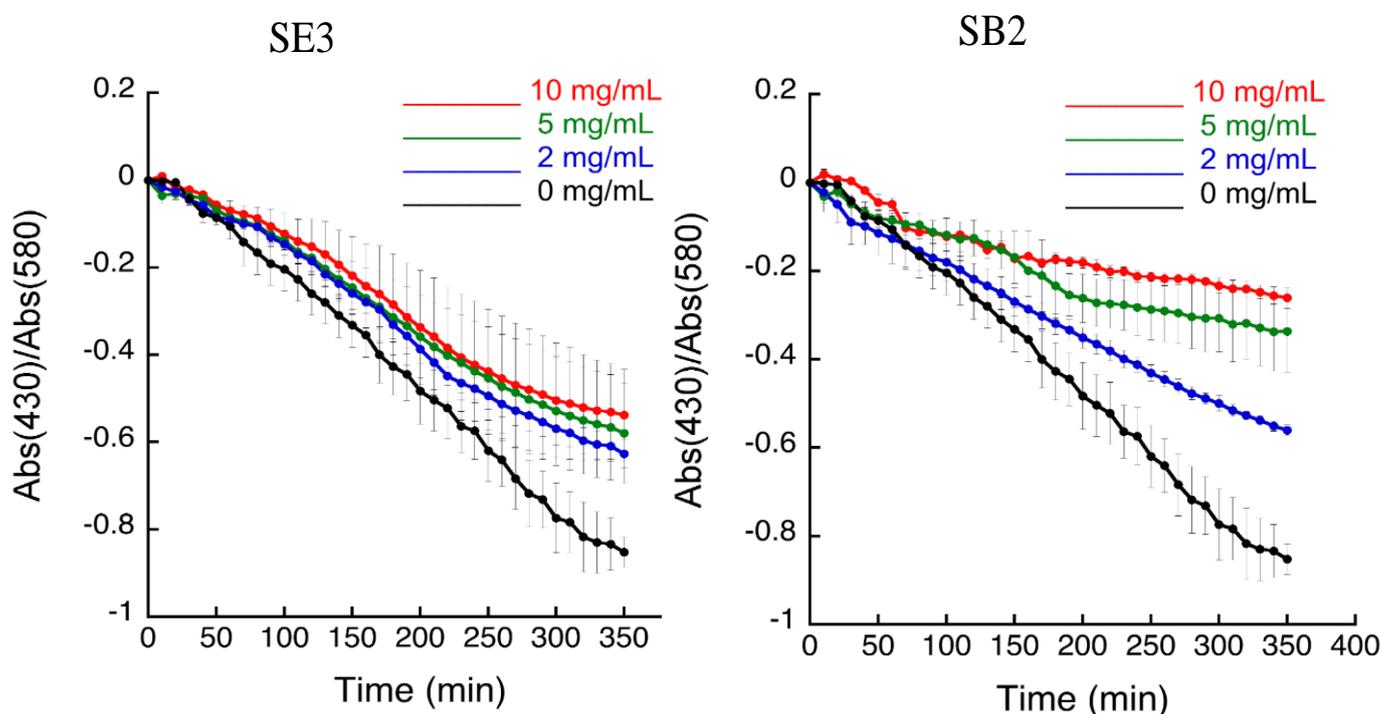


**Figure 29: Effet des fractions et sous-fractions de l'extrait de *S. campanulata* sur l'expression du gène codant pour la cytotoxine CagA de *H. pylori***

*H. pylori* a été traité avec les extraits de plante pendant 4h. Le taux de protéine de la cytotoxine CagA a été déterminé. Après traitement, les protéines totales ont été extraites et leur expression a été déterminée par Western blot. Le DMSO a été utilisé comme contrôle. Chaque transfert représente l'une des deux expériences indépendantes. L'analyse densitométrique des bandes pour les différentes fractions d'extrait de plantes a été faite par Image J. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD de deux expériences indépendantes. Les valeurs sont significativement différentes par rapport au groupe témoin ( $P < 0,05$ ). **EB:** Extrait brut; **B:** Fraction à l'hexane/Acétate d'éthyle 25%; **C:** Fraction à l'hexane/Acétate d'éthyle 50%; **E:** Fraction à l'acétate d'éthyle, **SB2:** Sous fraction au dichlorométhane/MeOH (90%); **SE3:** Sous fraction au Méthanol/H<sub>2</sub>O (70%).

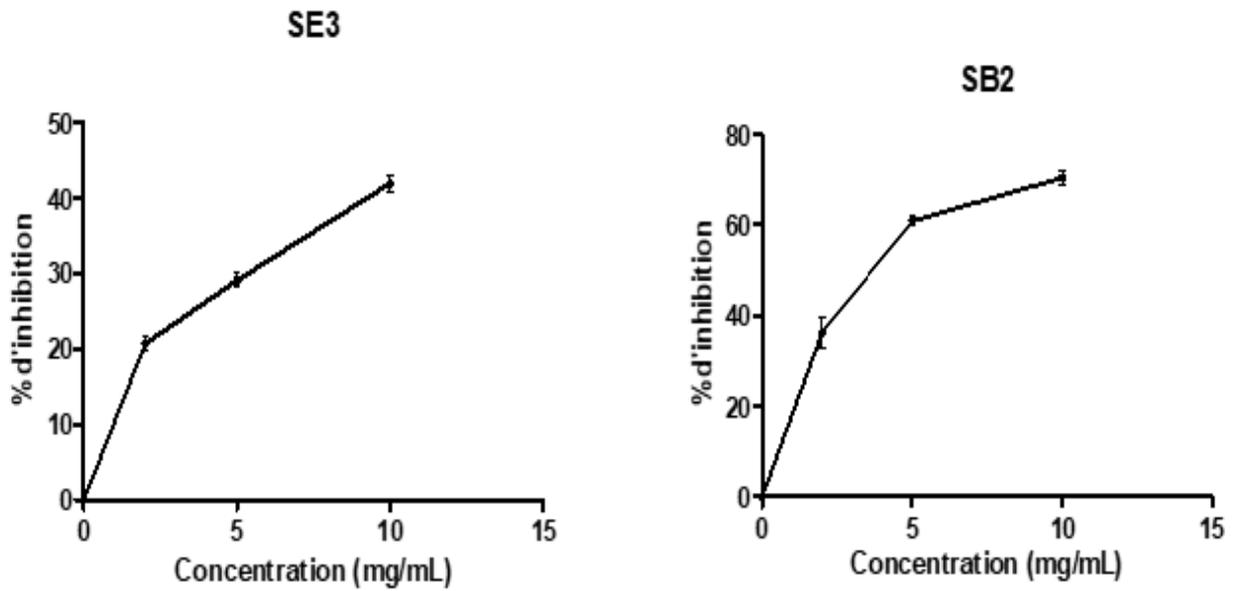
### III.1.3.2. Inhibition de l'activité de l'uréase de *H. pylori* par les sous-fractions de *S. campanulata*

Toutes les sous-fractions choisies ont inhibé l'activité de l'activité enzymatique. Les inhibitions exercées par SE1 et SE3 étaient cependant faibles. Seule la sous-fraction de SB2 a inhibé complètement l'enzyme (Figure 30). Et a permis de représenter les pourcentages d'inhibitions en fonction des concentrations en extraits (Figure 31). Pour obtenir la concentration inhibitrice cinquante de la sous-fraction SB2  $CI_{50} = 5,83 \pm 0,22$  mg/mL.



**Figure 30: Activité inhibitrice de l'uréase par les sous-fractions SE3 et SB2**

Les mesures ont été effectuées dans une plaque à 96 puits, après addition de  $250 \mu\text{M}$  de Ni (II) et de  $10 \text{ mM}$  d'urée. Chaque mesure a été réalisée en double. Les barres d'erreur représentent les écarts-types des valeurs moyennes. SB2: Sous fraction au dichlorométhane/MeOH (90%); SE3: Sous fraction au Méthanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (70%)



**Figure 31: Représentation des pourcentages d'inhibition des différentes sous fractions SE3 et SB2**

*SB2: Sous fraction au dichlorométhane/MeOH (90%); SE3: Sous-fraction hydrométhanolique (70%)*

### **Conclusion partielle 3**

Au terme de cette troisième partie du travail dont l'objectif était d'évaluer l'effet des sous-fractions de l'extrait de la plante active sur l'expression de quelques facteurs de virulence de *H. pylori*. Il en ressort que:

- Les fractions B, C et E et sous-fractions hydrométhanolique 70% (SE3) et au dichlorométhane/MeOH 90% (SB2) inhibent l'expression de la cytotoxine CagA.
- Les sous-fractions dichlorométhane/méthanol 90% (SB2) et hydrométhanolique 70% (SE3) inhibent l'activité de l'uréase. La sous-fraction SB2 inhibe l'enzyme avec une  $CI_{50}$  de 5,83 mg/mL.

### III.2. Discussion générale

Les affections gastriques sont les maladies affectant la muqueuse gastrique ou duodénale. Selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), des centaines de millions de personnes dans le monde souffrent des affections gastriques. La thérapie conventionnelle pour l'éradication de *H. pylori* est basée sur l'utilisation de multiples antibiotiques, tels que la Clarithromycine, l'Amoxicilline, la Furazolidone, la Tétracycline, Métronidazole avec le Bismuth et un inhibiteur de la pompe à protons (Zaidi *et al.*, 2009; Mégraud, 2008). Cependant, l'éradication de *H. pylori* est difficile, et cela pour plusieurs raisons. La bactérie occupe une niche écologique protégée puisqu'elle colonise la surface de la muqueuse gastrique et les couches profondes du mucus. Cette situation impose que les agents antibactériens puissent atteindre, sous une forme active et à concentration bactéricide, le mucus gastrique. Il existe un nombre limité d'antibiotiques doués de propriétés bactéricides vis-à-vis de *H. pylori*. De plus, *H. pylori* a une capacité élevée de variation génomique, responsable de l'émergence de résistances. La résistance acquise de *H. pylori* à divers antibiotiques est relativement importante et tend à augmenter sous la pression de sélection des antibiotiques et notamment à la faveur de leur utilisation en monothérapie pour d'autres infections (Asha *et al.*, 2013; Lamarque *et al.*, 2012; Babarikina *et al.*, 2011; Zaidi *et al.*, 2009). Au Cameroun, la résistance de *H. pylori* à la clarithromycine, au métronidazole et à l'amoxicilline a été évaluée à 44,7%, 95,5% et 85,6% respectivement (Al-Eraky *et al.*, 2018; Harrison *et al.*, 2017; Ndip *et al.*, 2008). De ce fait, la recherche de nouvelles molécules au niveau des plantes médicinales reste d'actualité.

Les plantes synthétisent plusieurs molécules dotées pour la plupart d'une activité biologique. Au Cameroun, diverses études ont montré que les extraits de plante ont des effets inhibiteurs sur la culture de *H. pylori* (Kouitchou *et al.*, 2016; Njume *et al.*, 2010; Ndip *et al.*, 2007, 2004). Cependant ces études étaient juste focalisées sur l'inhibition de la bactérie et non sur les facteurs de virulence de celle-ci. Ceci suggère que les plantes de la pharmacopée camerounaise pourraient être des sources potentielles de nouvelles molécules bioactives contre l'infection à *H. pylori*. Le but principal de l'étude a été de déterminer l'effet des extraits de plante sur la croissance de *H. pylori* et quelques facteurs de sa pathogénicité à savoir l'adhérence, et la virulence.

La première partie de notre étude a été consacrée à la collecte des plantes utilisées par les tradipraticiens de la zone de Bafia, Bazou et Foubot contre les affections gastriques et à l'évaluation de leurs effets sur la croissance et l'adhérence de *H. pylori*. La recherche des

meilleurs extraits de plantes avec les activités anti-*H. pylori* et anti-adhérence a été effectuée. Ces activités ont été déterminées respectivement par micro-dilution sur bouillon de culture, dilution sur gélose et marqueur FITC.

L'enquête a permis de collecter 41 plantes appartenant à 27 familles, la plus représentée était la famille des *Asteraceae* (5 espèces), suivi d'*Euphorbiaceae* (4 espèces). L'enquête a révélé que les solvants utilisés en médecine traditionnelle étaient l'eau, le vin de palme et l'huile de palmiste et le mode de préparation le plus utilisé est la décoction.

La capacité de nos extraits à inhiber la croissance de *H. pylori* a été évaluée. Il ressort que tous les extraits testés ont inhibé la croissance de *H. pylori* (Tableau X) et l'inhibition la plus forte a été observée avec l'extrait de *S. campanulata* avec une CMI de 0,125 mg/mL. L'inhibition de la croissance de *H. pylori* n'est suffisante pour affirmer qu'une plante peut être utilisée dans le traitement de l'ulcère gastrique dû à *H. pylori*. Au cours de l'infection de *H. pylori* cette bactérie doit d'abord se fixer aux tissus gastriques grâce aux adhésines (Odenbreit *et al.*, 1999; Lengsfeld *et al.*, 2004) afin de les coloniser en induisant un ulcère. C'est pourquoi une molécule anti-*H. pylori*, devrait être capable d'inhiber non seulement croissance, y compris la fixation et les facteurs de virulences. Nous avons par la suite testé l'ensemble des plantes ayant inhibé *H. pylori* à l'expression des gènes aux activités d'inhibition de fixation aux tissus gastriques et l'expression des gènes de molécules protéiques de fixation, encore appelée adhésines. Plusieurs adhésines ont été caractérisés chez *H. pylori* (Walz *et al.*, 2005). Mais nous nous sommes limités à BabA et HopZ les plus importantes. En testant l'expression des adhésines, de l'ARN et des protéines, il nous est apparu qu'un certains nombre de plantes permet d'inhiber la croissance de *H. pylori*, d'autres l'expression des ARN et des protéines. Mais à la fin trois plantes particulières ont inhibé à la fois la croissance et l'expression des ARN et des protéines, il s'agit de *Polyscias fulva*, *Spathodea campanulata* et *Nicotina tabacum*.

*Spathodea campanulata* P. Beauv. (Bignoniaceae) est une plante médicinale traditionnellement utilisée en Afrique pour la prévention et le traitement des maladies des reins et des voies urinaires, de la peau, du tractus gastro-intestinal et de l'inflammation en général (Ofori *et al.*, 2009; Oligidigwe *et al.*, 2010). Des extraits de cette plante se sont révélés actifs contre les maladies prolifératives, impliquant des cellules cancéreuses et des bactéries (Kuate *et al.*, 2016; Masruri *et al.*, 2018). Ces études ont montré que *S. campanulata* agit sur les bactéries gram négatives telles que *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* et *Klebsiella pneumoniae* (Mambe *et al.*, 2016).

Sur la base de cette observation, *S. campanulata* pour le traitement des maux d'estomac, des troubles digestifs et son effet inhibiteur des fractions et sous-fractions sur la croissance et l'adhérence de *H. pylori*, a été étudié. Les fractions B, C et E ont inhibé la croissance de *H. pylori* avec des diamètres d'inhibition de 11,3; 10 et 12 mm respectivement à une concentration de 0,1 mg/mL (Tableau XIII). Des résultats similaires ont été obtenus par **Lu et al. (2018)** qui ont montré qu'un extrait au chloroforme d'*Ixeris chinensis* inhibait la croissance de *H. pylori* avec un diamètre d'inhibition de 11,67 mm à une concentration plus élevé de 50 mg/mL. De ce fait, on peut conclure que les fractions B et E sont plus actives que l'extrait de *S. campanulata*.

La capacité de *S. campanulata* à inhiber la croissance de *H. pylori* suggère qu'elle est riche en molécules capables d'inhiber la croissance de cette bactérie. Cette suggestion est confortée par la présence dans l'extrait de cette plante des composés comme des polyphénols (acide benzoïque), flavonoïdes (Kaempférol) reconnus bactéricides (**Kaur et al., 2010; Shin et al., 2005; Funatogawa et al., 2004**). Ainsi, les résultats obtenus avec l'extrait de *S. campanulata* pourraient se justifier par la présence des composés phénoliques présents qui de par leur groupe hydroxyle se lient aux protéines empêchant l'action enzymatique des lactamases et d'autres part à la capacité de ces composés à former des complexes insolubles avec d'autres macromolécules ou en détruisant les membranes microbiennes en augmentant la fluidité des lipides membranaires. En fait, ces groupes de métabolites pourraient améliorer leurs activités bactéricides en inhibant la prolifération des pompes circulantes, la biosynthèse protéinique, la synthèse peptidoglycane, l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques (**De Klerk et al., 2016; Thöle et al., 2015**).

Au cours de la pathogénicité de *H. pylori*, la bactérie utilise les adhésines telles que BabA, SabA, HopZ ( **Walz et al., 2005; Akopyants et al., 1998; Atherton et al., 1995**) pour se lier à la muqueuse gastrique (**Walz et al., 2005**). L'adhérence est l'étape nécessaire à la fois pour la colonisation et la pathogénèse. Ainsi, les agents ayant des propriétés anti-adhésives, qui empêchent la fixation de *H. pylori* aux tissus épithéliales sont considérés comme des bon candidats dans l'éradication de cette bactérie. À cet effet, nous avons incubé des extraits de plantes, fractions et sous-fractions en présence de la bactérie et nous avons évalué l'expression des gènes responsables de la biosynthèse des adhésines *babA* et *hopZ* par RT-PCR ainsi que l'expression des protéines BaBA et HopZ par western blot. Certains extraits de plantes ont inhibé fortement la synthèse des deux adhésines: *Anthocleista schweinfurthui*; *Ageratum conyzoides*, *Nicotina tabacum* et *Spathodea campanulata*. L'inhibition la plus forte de

l'expression des gènes (*babA* et *hopZ*) et de protéines (*BabA* et *HopZ*) a été observée avec l'extrait de *S. campanulata*.

L'effet des fractions de *S. campanulata* a été aussi testé sur l'expression des protéines *BabA* et *HopZ* et les fractions B, C et E et les sous-fractions SB2 et SE3 ont inhibé l'expression de *BabA* et *HopZ*. L'inhibition la plus forte a été observée avec la fraction à l'acétate d'éthyle (E) (Figures 23). Les acides N-phénylpropenoyl-L-amine (NPAs) ont été identifiés comme polyphénols/acides aminés conjugués dans les graines de *Theobroma cacao* ainsi que dans une variété de médicaments à base de plantes, ils ont été décrits pour leurs effets inhibiteurs de la protéine *BabA* (Niehues *et al.*, 2011).

Après avoir déterminé les activités anti-*H. pylori* et anti-adhérence des fractions et des sous-fractions de *S. campanulata*, leur effet sur certains facteurs de virulence a été étudié.

L'uréase favorise la colonisation et la survie de la bactérie, car capable d'hydrolyser l'urée en ammoniac et dioxyde de carbone (Arfan *et al.*, 2010), et permet d'élever le pH du milieu rendant ainsi l'environnement propice pour *H. pylori* à coloniser la muqueuse (Koniczna *et al.*, 2012a; Rutherford, 2014a). Ainsi, l'inhibition de cet enzyme est importante pour prévenir l'infection à *H. pylori*. Alors la capacité des sous-fractions de plante à inhiber l'uréase directement dans un environnement cellulaire a été déterminée. Parmi toutes les sous fractions étudiées, les sous-fractions hydrométhanolique 70% (SE3) et dichlorométhane/MeOH 90% (SB2) ont inhibé l'uréase (figures 30 et 31).

La cytotoxine associée au gène A (*Cag A*) est le facteur de virulence le plus important, associé aux pathologies sévères. Les souches *Cag A* positif de *H. pylori* sont associées à une plus grande inflammation et un risque accru d'ulcère et de cancer chez les humains (Covacci *et al.*, 1999). Par conséquent, l'inhibition de l'expression de *Cag A* représente une stratégie thérapeutique pour la prévention de l'inflammation de la muqueuse. Ainsi, la capacité des fractions à inhiber l'expression de *Cag A* a été évaluée. Les résultats révèlent que la fraction à l'acétate d'éthyle E et les sous-fractions hydrométhanolique 70% (SE3) et dichlorométhane/MeOH 90% (SB2) inhibent l'expression de cette cytotoxine (Figure 29). La sous-fraction SE3, capable de moduler simultanément l'expression de deux adhésines (*HopZ* et *BabA*) et la cytotoxine (*CagA*), a été obtenue à partir de la fraction E, qui avait une forte teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes (Tableau XV); le flavonol kaempférol a été identifié dans la sous-fraction SE3. La fraction à l'acétate d'éthyle a permis d'identifier les composés tels que l'acide ursolique, le spathodol, l'acide spathodique, le kaempférol, le kaempférol-3-glucoside et l'acide tomentosolique (Boniface *et al.*, 2015; Heim *et al.*, 2012; Nazif, 2007; Pianaro *et al.*, 2007). Les composés phénoliques ont une activité

antimicrobienne en générale et certains d'entre eux sont également actifs contre *H. pylori* (**Escandón et al., 2016**). Plusieurs substances phytochimiques peuvent agir en inhibant la croissance microbienne, en induisant des perturbations de la membrane cellulaire, en interférant avec certains processus métaboliques microbiens et en modulant la transduction du signal ou les voies d'expression des gènes (**Godstime et al., 2014**). Il a été récemment observé que le flavonoïde kaempférol, a un effet anti-inflammatoire sur l'inflammation induite par *H. pylori* en supprimant la translocation des protéines CagA et VacA et conduisant à la régulation et la baisse des cytokines pro-inflammatoires (**Yeon et al., 2019**). Récemment, le kaempférol s'est avéré inhiber l'activité de liaison à l'ADN *in vitro* du régulateur de stress homéostatique (HsrA), une protéine qui joue le rôle de régulateur homéostatique, synchronisant les fonctions métaboliques et la virulence avec la disponibilité des nutriments et la division cellulaire, en médiant également la réponse au stress oxydatif. HsrA représente une nouvelle cible thérapeutique efficace dans l'infection à *H. pylori* (**González et al., 2019**). Ce résultat est en accord avec une étude récente de **González et al. (2019)**, où le kaempférol a montré une puissante activité bactéricide contre *H. pylori* sur des souches résistantes. Et aussi l'étude d' **Escandón et al. (2016)** rapporte une activité anti-*H. pylori* du kaempférol avec le diamètre d'inhibition de 15 mm à la concentration de 1 mg.

La capacité à inhiber la croissance de *H. pylori* est attribuée à une variété d'extraits de plantes médicinales et de fractions (**Wang, 2014**), en particulier de nombreux composés appartenant à différentes classes chimiques. L'acide benzoïque et ses dérivés appartiennent à la famille des acides phénoliques qui agissent par inhibition enzymatique, soit à travers plusieurs réactions non spécifiques avec les protéines microbiennes, le kaempférol, aux flavonoïdes qui ont la capacité de se complexer avec les protéines extracellulaires solubles et à la paroi bactérienne (**Cowan, 1999**). Les acides ursolique, tomentosolique et spathodique sont des triterpénoïdes de la classe chimique des terpènes qui peuvent perturber la structure membranaire des microorganismes à travers leurs composants lipophiles; le spathodol est un polyhydroxystérol. Pour les coumarines également, une activité remarquable contre *H. pylori* a été rapportée (**Wang, 2014**). Ces coumarines dont les cibles d'action importantes sont l'action sur l'ADN gyrase et la topoisomérase IV.

Au terme de cette discussion, nous observons que la fraction à l'acétate d'éthyle et sa sous-fraction hydrométhanolique de *S. campanulata* exercent leur effet anti-*H. pylori* via multiples mécanismes: elles inhibent la croissance de *H. pylori*, elles empêchent et réduisent la fixation de la bactérie à la muqueuse épithéliale en inhibant l'expression des adhésines BabA et HopZ, elles limitent l'inflammation à travers l'inhibition de la cytotoxine Cag A et

de l'uréase. Au vu des multiples activités observées simultanément par cette fraction et ses sous-fractions, cet extrait de plante pourrait être un bon candidat pour surmonter le problème de résistance aux antibiotiques dans le traitement de la maladie gastrique causée par *H. pylori*.

**CONCLUSION GENERALE ET  
PERSPECTIVES**

## 1. Conclusion générale

Au terme de ce travail dont l'objectif général était d'étudier les propriétés des extraits de quelques plantes médicinales du Cameroun sur les facteurs de pathogénicité de *H. pylori*: la croissance et l'expression des facteurs de virulence de *Helicobacter pylori*, les conclusions majeures ci-après se dégagent:

- De l'enquête ethnopharmacologique, 41 plantes ont été collectées. L'extrait de *S. campanulata* inhibe la croissance et l'expression des ARNm babA et hopZ et des protéines BabA et HopZ de *H. pylori* en empêchant sa fixation aux coupes de tissu d'estomac.
- Les fractions à l'acétate d'éthyle et à l'hexane/acétate d'éthyle 25% de l'extrait de *S. campanulata* inhibent la croissance et l'adhérence de *H. pylori*. La fraction à l'acétate d'éthyle présente des teneurs élevées en polyphénols et flavonoïdes et est constituée de plusieurs composés phytochimiques: acide ursolique, acide spathodique, acide tomentosolique, spathodol, kaempférol et 5,7-diméthyl-4-hydroxybenzoate. La sous-fraction hydrométhanolique 70% contient le kaempférol.
- Les fractions à l'acétate d'éthyle et à l'hexane/acétate d'éthyle 25% et les sous-fractions hydrométhanolique 70% et au dichlorométhane/méthanol 90 % de *S. campanulata* inhibent l'expression de la cytotoxine Cag A et les sous-fractions hydrométhanolique 70% et au dichlorométhane/méthanol 90 % inhibent l'uréase de *H. pylori*.

Les activités d'inhibition exercées par l'extrait de *S. campanulata* et sa fraction à l'acétate d'éthyle à la fois sur la croissance, l'adhérence et quelques facteurs de virulence CagA et uréase confirment l'importance de l'utilisation de ces extraits de plantes en médecine traditionnelle locale et sont ainsi une preuve solide pour la valorisation de *S. campanulata* comme source de potentiels composés actifs pouvant permettre d'éradiquer l'infection à *H. pylori*.

## 2. Perspectives

Dans un avenir proche, nous envisageons:

- Déterminer la toxicité *in vivo* de *S. campanulata* sur des modèles expérimentaux d'ulcère gastriques,
- Déterminer l'effet de *S. campanulata* sur les isolats du Cameroun.

## **REFERENCES**

## Bibliographie

1. Akopyants, Natalia S., Clifton, S.W., Kersulyte, D., Crabtree, J.E., Youree, B.E., Reece, C.A., Bukanov, N.O., Drazek, E.S., Roe, B.A., Berg, D.E., 1998. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 28, 37–53. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00770.x>
2. Al-Eraky, D.M., Helmy, O.M., Ragab, Y.M., Abdul-Khalek, Z., El-Seidi, E.A., Ramadan, M.A., 2018. Prevalence of CagA and antimicrobial sensitivity of *H. pylori* isolates of patients with gastric cancer in Egypt. *Infect. Agent. Cancer* 13, 24. <https://doi.org/10.1186/s13027-018-0198-1>
3. Amandeep K, Robin S., Ramica S. and Sunil K., 2012. (16) Peptic ulcer: A review on etiology and pathogenesis. *Inter. Res. J. Phar.* ISSN. 2230-8407. URL <https://www.researchgate.net/publication/286351016>
4. Amin, M., Anwar, F., Naz, F., Mehmood, T., Saari, N., 2013. Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibition activities of some traditional medicinal plants. *Mol. Basel Switz.* 18, 2135–2149. <https://doi.org/10.3390/molecules18022135>
5. Andoulo, F.A., Noah, D.N., Tagni-Sartre, M., Ndam, E.C.N., Blackett, K.N., 2013. Epidémiologie de l'infection à *Helicobacter pylori* à Yaoundé: de la particularité à l'énigme Africaine. *Pan Afr. Med. J.* 16. <https://doi.org/10.11604/pamj.2013.16.115.3007>
6. Andrutis, K.A., Fox, J.G., Schauer, D.B., Marini, R.P., Li, X., Yan, L., Josenhans, C., Suerbaum, S., 1997. Infection of the ferret stomach by isogenic flagellar mutant strains of *Helicobacter mustelae*. *Infect. Immun.* 65, 1962–1966.
7. Arfan, M., Ali, M., Ahmad, H., Anis, I., Khan, A., Choudhary, M.I., Shah, M.R., 2010. Urease inhibitors from *Hypericum oblongifolium* WALL. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25, 296–299. <https://doi.org/10.3109/14756360903179385>
8. Asha, M.K., Debraj, D., Prashanth, D., Edwin, J.R., Srikanth, H.S., Muruganatham, N., Dethe, S.M., Anirban, B., Jaya, B., Deepak, M., Agarwal, A., 2013. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of a flavonoid rich extract of *Glycyrrhiza glabra* and its probable mechanisms of action. *J. Ethnopharmacol.* 145, 581–586. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.11.033>
9. Asher, G.N., Corbett, A.H., Hawke, R.L., 2017. Common Herbal Dietary Supplement-Drug Interactions. *Am. Fam. Physician* 96, 101–107.
10. Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M., Tummuru, M.K.R., Blaser, M.J., Cover, T.L., 1995. Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori* association

- of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* 270, 17771–17777. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.30.17771>
11. Atherton, J.C., Peek, R.M., Tham, K.T., Cover, T.L., Blaser, M.J., 1997. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol* 112, 92–99.
  12. Azevedo, N.F., Guimarães, N., Figueiredo, C., Keevil, C.W., Vieira, M.J., 2007. A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. *Crit. Rev. Microbiol.* 33, 157–169. <https://doi.org/10.1080/10408410701451922>
  13. Azevedo, N.F., Huntington, J., Goodman, K.J., 2009. The Epidemiology of *Helicobacter pylori* and Public Health Implications. *Helicobacter* 14, 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2009.00703.x>
  14. Aziz, R.K., Khalifa, M.M., Sharaf, R.R., 2015. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *J. Adv. Res.* 6, 539–547. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.007>
  15. Babarikina, A., Nikolajeva, V., Babarykin, D., 2011. Anti-*Helicobacter*; Activity of Certain Food Plant Extracts and Juices and Their Composition *in Vitro*; *Food Nutr. Sci.* 02, 868–877. <https://doi.org/10.4236/fns.2011.28118>
  16. Backert, S., Clyne, M., 2011. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 16, 19–25. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2011.00876.x>
  17. Backert, S., Clyne, M., Tegtmeyer, N., 2011. Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun. Signal.* 9, 28. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-28>
  18. Backert, S., Selbach, M., 2008. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 10, 1573–1581. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01156.x>
  19. Bentahar, A., 2018. L’Ulcère gastroduodéal à *Helicobacter pylori*: Aspects épidémiologique et phytothérapeutique traditionnel en Nord-Est Algérien (Thesis).p.204.
  20. Blaser, M.J., 1994. *Helicobacter pylori* Phenotypes Associated with Peptic Ulceration. *Scand. J. Gastroenterol.* 29, 1–5. <https://doi.org/10.3109/00365529409091402>
  21. Bonacorsi, C., Raddi, M.S.G., Carlos, I.Z., Sannomiya, M., Vilegas, W., 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima*

- crassa Nied. (Malpighiaceae). *BMC Complement. Altern. Med.* 9. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-2>
22. Boniface, P.K., Singh, M., Verma, S., Shukla, A., Khan, F., Srivastava, S.K., Pal, A., 2015. RP-HPLC-DAD method for the identification of two potential antioxidant agents namely verminoside and 1- O - (E)-caffeoyl- $\beta$ -gentiobiose from *Spathodea campanulata* leaves. *Nat. Prod. Res.* 29, 676–680. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.981538>
23. Breurec, S., 2011. *Helicobacter pylori*: migrations humaines et cancer gastrique (Thesis) p.223.
24. Brown, L.M., 2000. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol. Rev.* 22, 283–297. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a018040>
25. Burger, O., Ofek, I., Tabak, M., Weiss, E.I., Sharon, N., Neeman, I., 2000. A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29, 295–301. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01537.x>
26. Bürgers, R., Schneider-Brachert, W., Reischl, U., Behr, A., Hiller, K.-A., Lehn, N., Schmalz, G., Ruhl, S., 2008. *Helicobacter pylori* in human oral cavity and stomach. *Eur. J. Oral Sci.* 116, 297–304. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2008.00543.x>
27. Busler, V.J., Torres, V.J., McClain, M.S., Tirado, O., Friedman, D.B., Cover, T.L., 2006. Protein-Protein Interactions among *Helicobacter pylori* Cag Proteins. *J. Bacteriol.* 188, 4787–4800. <https://doi.org/10.1128/JB.00066-06>
28. Carbonnelle, B., Denis, F., Marmonier, A, Pinon, G, Vague, R, 1987. Bactériologie médicale: techniques usuelles. p.330. *Simep*, Paris.
29. Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., Covacci, A., 1996. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14648–14653.
30. Chaput, C., Boneca, I.G., 2006. Bases moléculaires de l'interaction de *Helicobacter pylori* avec les cellules épithéliales gastriques. *Hépatogastro Oncol. Dig.* 13, 379–388.
31. Chevalier, C., Thiberge, J.M., Ferrero, R.L., Labigne, A., 1999. Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol. Microbiol.* 31, 1359–1372. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01271.x>

32. Chu, S.H., Kim, H., Seo, J.Y., Lim, J.W., Mukaida, N., Kim, K.H., 2003. Role of NF- $\kappa$ B and AP-1 on *Helicobacter pylori*-Induced IL-8 Expression in AGS Cells. *Dig. Dis. Sci.* 48, 257–265. <https://doi.org/10.1023/A:1021963007225>
33. Chuah, S.-K., Tsay, F.-W., Hsu, P.-I., Wu, D.-C., 2011. A new look at anti-*Helicobacter pylori* therapy. *World J. Gastroenterol.* WJG 17, 3971–3975. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i35.3971>
34. Clyne, M., Dolan, B., Reeves, E.P., 2007. Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* 268, 135–143. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00648.x>
35. Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L., 2006. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* “proof-of-concept.” *J. Ethnopharmacol.* 106, 290–302. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>
36. Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5791–5795.
37. Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., Rappuoli, R., 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Sci* 284, 1328–1333. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1328>
38. Croxen, M.A., Sisson, G., Melano, R., Hoffman, P.S., 2006. The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor TlpB (HP0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa. *J. Bacteriol.* 188, 2656–2665. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2656-2665.2006>
39. de Jonge, R., Durrani, Z., Rijpkema, S.G., Kuipers, E.J., van Vliet, A.H.M., Kusters, J.G., 2004. Role of the *Helicobacter pylori* outer-membrane proteins AlpA and AlpB in colonization of the guinea pig stomach. *J. Med. Microbiol.* 53, 375–379. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45551-0>
40. De Klerk, N., Maudsdotter, L., Gebreegziabher, H., Saroj, S.D., Eriksson, B., Eriksson, O.S., Roos, S., Lindén, S., Sjölander, H., Jonsson, A.-B., 2016. Lactobacilli Reduce *Helicobacter pylori* Attachment to Host Gastric Epithelial Cells by Inhibiting Adhesion Gene Expression. *Infect. Immun.* 84, 1526–1535. <https://doi.org/10.1128/IAI.00163-16>

41. Delgado-Rosado, G., Dominguez-Bello, M.G., Massey, S.E., 2011. Positive selection on a bacterial oncoprotein associated with gastric cancer. *Gut Pathog.* 3, 18. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-3-18>
42. Demır, M., Göktürk, S., Öztürk, N.A., Serin, E., Yılmaz, U., 2010. Bismuth-based first-line therapy for *Helicobacter pylori* eradication in type 2 diabetes mellitus patients. *Digestion* 82, 47–53.
43. Dossumbekova, A., Prinz, C., Mages, J., Lang, R., Kusters, J.G., Van Vliet, A.H.M., Reindl, W., Backert, S., Saur, D., Schmid, R.M., Rad, R., 2006. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms. *J. Infect. Dis.* 194, 1346–1355. <https://doi.org/10.1086/508426>
44. Eaton, K.A., Suerbaum, S., Josenhans, C., Krakowka, S., 1996. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect. Immun.* 64, 2445–2448.
45. Eloumou Bagnaka, S. a. F., Luma Namme, H., Noah Noah, D., Essomba, N.E., Malongue, A., Manga, A., Tzeuton, C., Biwole Sida, M., 2016. [Risk factors associated with gastroduodenal lesions in a Douala referral hospital (Cameroon)]. *Med. Sante Trop.* 26, 104–109. <https://doi.org/10.1684/mst.2015.0521>
46. Escandón, R.A., Del Campo, M., López-Solis, R., Obrique-Slier, E., Toledo, H., 2016. Antibacterial effect of kaempferol and (–)-epicatechin on *Helicobacter pylori*. *Eur. Food Res. Technol.* 242, 1495–1502. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2650-z>
47. Evans, D.J., Evans, D.G., 2000. *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. *Helicobacter* 5, 183–195. <https://doi.org/10.1046/j.1523-5378.2000.00029.x>
48. Flahou, B., Haesebrouck, F., Chiers, K., Deun, K.V., Smet, L.D., Devreese, B., Vandenberghe, I., Favoreel, H., Smet, A., Pasmans, F., D’Herde, K., Ducatelle, R., 2011. Gastric epithelial cell death caused by *Helicobacter suis* and *Helicobacter pylori*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase is mainly glutathione degradation-dependent. *Cell. Microbiol.* 13, 1933–1955. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01682.x>
49. Ford, A.C., Axon, A.T.R., 2010. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. *Helicobacter* 15 Suppl 1, 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2010.00779.x>
50. Franco, A.T., Johnston, E., Krishna, U., Yamaoka, Y., Israel, D.A., Nagy, T.A., Wroblewski, L.E., Piazuolo, M.B., Correa, P., Peek, R.M., 2008. Regulation of gastric

- carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res.* 68, 379–387. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0824>
51. Franklin, A., Rao, U., Vijayakumar, R., Srikumar, R., 2012. In-vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of *Emblica officinalis*. *Inter. J. Microbiol. Res.* 3(3): 216-220.
52. Frenck, R.W., Clemens, J., 2003. *Helicobacter* in the developing world. *Microbes Infect.* 5, 705–713. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(03\)00112-6](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00112-6)
53. Funatogawa, K., Hayashi, S., Shimomura, H., Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H., Hirai, Y., 2004. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol.* 48, 251–261. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03521.x>
54. Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Borén, T., Rad, R., Schepp, W., Miehle, S., Classen, M., Prinz, C., 1999. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12778–12783.
55. Giannakis, M., Bäckhed, H.K., Chen, S.L., Faith, J.J., Wu, M., Guruge, J.L., Engstrand, L., Gordon, J.I., 2009. Response of gastric epithelial progenitors to *Helicobacter pylori* isolates obtained from Swedish Patients with chronic atrophic gastritis. *J. Biol. Chem.* 284, 30383–30394. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052738>
56. Godstime, O.C., García, A., Augustina, J.O., Christopher, E., 2014. Mechanisms of antimicrobial actions of phytochemicals against enteric pathogens – A Review.
57. Gong, M., Ling, S.S.M., Lui, S.Y., Yeoh, K.G., Ho, B., 2010. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase is a pathogenic factor in the development of peptic ulcer disease. *Gastroenterol* 139, 564–573. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.03.050>
58. González, A., Salillas, S., Velázquez-Campoy, A., Angarica, V.E., Fillat, M.F., Sancho, J., Lanás, Á., 2019. Identifying potential novel drugs against *Helicobacter pylori* by targeting the essential response regulator HsrA. *Sci. Rep.* 9, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47746-9>
59. Gumurdulu, Y., Serin, E., Özer, B., Kayaselcuk, F., Ozsahin, K., Cosar, A.M., Gursoy, M., Gur, G., Yilmaz, U., Boyacioglu, S., 2004. Low eradication rate of *Helicobacter pylori* with triple 7-14 days and quadruple therapy in Turkey. *World J. Gastroenterol.* 10, 668–671. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i5.668>

60. Harris, P.R., Cover, T.L., Crowe, D.R., Orenstein, J.M., Graham, M.F., Blaser, M.J., Smith, P.D., 1996. *Helicobacter pylori* cytotoxin induces vacuolation of primary human mucosal epithelial cells. *Infect. Immun.* 64, 4867–4871.
61. Harrison, U., Fowora, M.A., Seriki, A.T., Loell, E., Mueller, S., Ugo-Ijeh, M., Onyekwere, C.A., Lesi, O.A., Otegbayo, J.A., Akere, A., Ndububa, D.A., Adekanle, O., Anomneze, E., Abdulkareem, F.B., Adeleye, I.A., Crispin, A., Rieder, G., Fischer, W., Smith, S.I., Haas, R., 2017. *Helicobacter pylori* strains from a Nigerian cohort show divergent antibiotic resistance rates and a uniform pathogenicity profile. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176454>
62. Heim, S.C., Guarnier, F.A., Ferreira, D.T., Braz-Filho, R., Cecchini, R., Cecchini, A.L., 2012. Antioxidant activity of *Spathodea campanulata* (Bignoneaceae) extracts. *Rev. Bras. Plantas Med.* 14, 287–292. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000200006>
63. Hildebrand, P., Meyer-Wyss, B.M., Mossi, S., Beglinger, C., 2000. Risk among gastroenterologists of acquiring *Helicobacter pylori* infection: case-control study. *BMJ* 321, 149.
64. Hooi, J.K.Y., Lai, W.Y., Ng, W.K., Suen, M.M.Y., Underwood, F.E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D.Y., Wong, V.W.S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., Kaplan, G.G., Ng, S.C., 2017. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterol* 153, 420–429. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
65. Hou, P., Tu, Z.-X., Xu, G.-M., Gong, Y.-F., Ji, X.-H., Li, Z.-S., 2000. *Helicobacter pylori* vacA genotypes and cagA status and their relationship to associated diseases. *World J. Gastroenterol.* 6, 605–607. <https://doi.org/10.3748/wjg.v6.i4.605>
66. Huang, H.-L., Ko, C.-H., Yan, Y.-Y., Wang, C.-K., 2014. Antiadhesion and Anti-inflammation Effects of Noni (*Morinda citrifolia*) Fruit Extracts on AGS Cells during *Helicobacter pylori* Infection. *J. Agric. Food Chem.* 62, 2374–2383. <https://doi.org/10.1021/jf405199w>
67. Ilver, D., Arnqvist, A., Ögren, J., Frick, I.-M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L., Borén, T., 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279, 373–377. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.373>

68. Israel, D.A., Peek, R.M., 2001. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15, 1271–1290. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2001.01052.x>
69. Iwamoto, H., Czajkowsky, D.M., Cover, T.L., Szabo, G., Shao, Z., 1999. VacA from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett.* 450, 101–104. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00474-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00474-3)
70. Jafri, W., Yakoob, J., Abid, S., Siddiqui, S., Awan, S., Nizami, S.Q., 2010. *Helicobacter pylori* infection in children: population-based age-specific prevalence and risk factors in a developing country. *Acta Paediatr.* 99, 279–282. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2009.01542.x>
71. Janzon, A., Bhuiyan, T., Lundgren, A., Qadri, F., Svennerholm, A.-M., Sjöling, A., 2009. Presence of high numbers of transcriptionally active *Helicobacter pylori* in vomitus from Bangladeshi patients suffering from acute gastroenteritis. *Helicobacter* 14, 237–247. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2009.00692.x>
72. Jones, N.L., Shabib, S., Sherman, P.M., 1997. Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* 146, 223–227. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10197.x>
73. Kafarski, P., Talma, M., 2018. Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. *J. Adv. Res., Biotechnological and medical relevance of ureases* 13, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.01.007>
74. Kao, C.-Y., Sheu, B.-S., Wu, J.-J., 2016. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed. J.* 39, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.06.002>
75. Kaur, B., Balgir, P.P., Kumar, B., Garg, N., 2010. *Helicobacter pylori* infection: efficacy of probiotics and role of genome wide association studies. *Arch.Clin.Microbiol.* 1. 4:3.
76. Kennemann, L., Didelot, X., Aebischer, T., Kuhn, S., Drescher, B., Droege, M., Reinhardt, R., Correa, P., Meyer, T.F., Josenhans, C., Falush, D., Suerbaum, S., 2011. *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5033–5038. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018444108>
77. Keya, C.A., 2018. Urease: The Ultimate Therapeutic Target for *Helicobacter pylori*. *Int. J. Cell Sci. Mol. Biol.* 3. <https://doi.org/10.19080/IJCSMB.2018.04.555625>

78. Kivi, M., Tindberg, Y., 2006. *Helicobacter pylori* occurrence and transmission: a family affair? *Scand. J. Infect. Dis.* 38, 407–417. <https://doi.org/10.1080/00365540600585131>
79. Kivi, M., Tindberg, Y., Sörberg, M., Casswall, T.H., Befrits, R., Hellström, P.M., Bengtsson, C., Engstrand, L., Granström, M., 2003. Concordance of *Helicobacter pylori* Strains within Families. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5604–5608. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5604-5608.2003>
80. Konieczna, I., Żarnowiec, P., Kwinkowski, M., Kolesińska, B., Frączyk, J., Kamiński, Z., Kaca, W., 2012a. Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 789. <https://doi.org/10.2174/138920312804871094>
81. Konieczna, I., Żarnowiec, P., Kwinkowski, M., Kolesińska, B., Frączyk, J., Kamiński, Z., Kaca, W., 2012b. Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 789–806. <https://doi.org/10.2174/138920312804871094>
82. Kouitcheu Mabeku, L. brigitte, Eyoum Bille, B., Nguépi, E., 2016. In Vitro and In Vivo Anti-*Helicobacter* Activities of *Eryngium foetidum* (Apiaceae), *Bidens pilosa* (Asteraceae), and *Galinsoga ciliata* (Asteraceae) against *Helicobacter pylori*. *BioMed Res. Int.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2171032>
83. Kuete, V., Tchinda, C.F., Mambe, F.T., Beng, V.P., Efferth, T., 2016. Cytotoxicity of methanol extracts of 10 Cameroonian medicinal plants towards multi-factorial drug-resistant cancer cell lines. *BMC Complement. Altern. Med.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1253-3>
84. Kusters, J.G., van Vliet, A.H.M., Kuipers, E.J., 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 449–490. <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>
85. Kuwahara, H., Miyamoto, Y., Akaike, T., Kubota, T., Sawa, T., Okamoto, S., Maeda, H., 2000. *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxydinitrite via carbon dioxide production. *Infect. Immun.* 68, 4378–4383. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.8.4378-4383.2000>
86. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
87. Lamarque, D., Burucoa, C., Courillon-Mallet, A., Korwin, J.-D. de, Delchier, J.-C., Fauchère, J.-L., Kalach, N., Labigne, A., Lehours, P., Mégraud, F., Raymond, J., 2012. Révision des recommandations françaises sur la prise en charge de l'infection

- par *Helicobacter pylori*. *Hépatogastro-Oncol. Dig.* 19, 475–502.  
<https://doi.org/10.1684/hpg.2012.0785>
88. Lanas, A., Chan, F.K.L., 2017. Peptic ulcer disease. *The Lancet* 390, 613–624.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32404-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32404-7)
89. Lee, M.H., Yang, J.Y., Cho, Y., Woo, H.J., Kwon, H.J., Kim, D.H., Park, M., Moon, C., Yeon, M.J., Kim, H.W., Seo, W.-D., Kim, S.-H., Kim, J.-B., 2019. Inhibitory effects of menadione on *Helicobacter pylori* growth and *Helicobacter pylori*-induced inflammation via NF- $\kappa$ B inhibition. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1169.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20051169>
90. Lengsfeld, C., Titgemeyer, F., Faller, G., Hensel, A., 2004. Glycosylated compounds from okra inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1495–1503. <https://doi.org/10.1021/jf030666n>
91. Leung, W.-K., Siu, K.L.K., Kwok, C.K.L., Chan, S.-Y., Sung, R., Sung, J.J.Y., 1999. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 2881–2884.  
[https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(99\)00487-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(99)00487-6)
92. Lifongo, L.L., Simoben, C.V., Ntie-Kang, F., Babiaka, S.B., Judson, P.N., 2014. A bioactivity versus ethnobotanical survey of medicinal plants from Nigeria, West Africa. *Nat. Prod. Bioprospecting* 4, 1–19. <https://doi.org/10.1007/s13659-014-0005-7>
93. Lindholm, C., Quiding-Järbrink, M., Lönroth, H., Hamlet, A., Svennerholm, A.-M., 1998. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect. Immun.* 66, 5964–5971.
94. Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., Falush, D., Stamer, C., Prugnolle, F., van der Merwe, S.W., Yamaoka, Y., Graham, D.Y., Perez-Trallero, E., Wadstrom, T., Suerbaum, S., Achtman, M., 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nat.* 445, 915–918.  
<https://doi.org/10.1038/nature05562>
95. Lu, H., Hsu, P.-I., Graham, D.Y., Yamaoka, Y., 2005. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol* 128, 833–848.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.01.009>
96. Lu, H., Wu, J.Y., Beswick, E.J., Ohno, T., Odenbreit, S., Haas, R., Reyes, V.E., Kita, M., Graham, D.Y., Yamaoka, Y., 2007. Functional and Intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesin from Western and

- East Asian Strains. *J. Biol. Chem.* 282, 6242–6254.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M611178200>
97. Lu, M.-C., Chiu, H.-F., Lin, C.-P., Shen, Y.-C., Venkatakrisnan, K., Wang, C.-K., 2018. Anti- *Helicobacter pylori* effect of various extracts of ixeris chinensis on inflammatory markers in human gastric epithelial AGS cells. *J. Herb. Med.* 11, 60–70.  
<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.08.002>
98. Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F.O., Forsberg, L., Roche, N., Ångström, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K.-A., Altraja, S., Wadström, T., Kersulyte, D., Berg, D.E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K.-E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B.B., Arnqvist, A., Hammarström, L., Borén, T., 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Sci.* 297, 573–578.  
<https://doi.org/10.1126/science.1069076>
99. Malaty, H.M., Graham, D.Y., Isaksson, I., Engstrand, L., Pedersen, N.L., 1998. Co-twin study of the effect of environment and dietary elements on acquisition of *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Epidemiol.* 148, 793–797.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009700>
100. Malfertheiner, P., Megraud, F., O’Morain, C., Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D., Hunt, R., Rokkas, T., Vakil, N., Kuipers, E.J., 2007. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 56, 772–781. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.101634>
101. Mambe, F.T., Voukeng, I.K., Beng, V.P., Kuete, V., 2016. Antibacterial activities of methanol extracts from Alchornea cordifolia and four other Cameroonian plants against MDR phenotypes. *J. Taibah Univ. Med. Sci.* 11, 121–127.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2015.12.001>
102. Marshall, B.J., Warren, J.R., 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1311–1315.  
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)91816-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91816-6)
103. Masruri, M., Pangestin, D.N., Ulfa, S.M., Riyanto, S., Srihardyastutie, A., Rahman, Moh.F., 2018. A Potent *Staphylococcus Aureus* Growth Inhibitor Of A Dried Flower Extract Of *Pinus Merkusii* Jungh & De Vriese And Copper Nanoparticle. IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng. 299, 012072. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/299/1/012072>
104. Megraud, F., 2008. Quand et comment s’infecte-t-on par *Helicobacter pylori*? *Gastroenterol. Clin. Biol.* p. 374-379. Data revues 0399832000273-C2374.

105. Megraud, F., Bonnet, F., Garnier, M., Lamouliatte, H., 1985. Characterization of “*Campylobacter pyloridis*” by culture, enzymatic profile, and protein content. *J. Clin. Microbiol.* 22, 1007–1010.
106. Mishra, S., 2013. Is *Helicobacter pylori* good or bad? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 301–304. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1773-9>
107. Moran, A.P., Prendergast, M.M., 2001. Molecular mimicry in *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides: contribution of gastrointestinal infections to autoimmunity. *J. Autoimmun.* 16, 241–256. <https://doi.org/10.1006/jaut.2000.0490>
108. Moreno-Rojas, J.M., Moreno-Ortega, A., Ordóñez, J.L., Moreno-Rojas, R., Pérez-Aparicio, J., Pereira-Caro, G., 2018. Development and validation of UHPLC-HRMS methodology for the determination of flavonoids, amino acids and organosulfur compounds in black onion, a novel derived product from fresh shallot onions (*Allium cepa* var. *aggregatum*). *LWT* 97, 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.032>
109. Mueller, D., Tegtmeyer, N., Brandt, S., Yamaoka, Y., De Poire, E., Sgouras, D., Wessler, S., Torres, J., Smolka, A., Backert, S., 2012. c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian *Helicobacter pylori* strains. *J. Clin. Invest.* 122, 1553–1566. <https://doi.org/10.1172/JCI61143>
110. Mustapha, P., 2011. Etude des interactions entre *Helicobacter pylori* et les cellules épithéliales gastriques (PhD Thesis). p.149. Université de Poitiers.
111. Nazif Naglaa M., 2007. Phytochemical and antioxidant activity of *Spathodea campanulata* P. Beauvois. Growing in Egypt. *Nat. Prod. Sci.* 13, 11–16.
112. Ndip, R.N., Malange, A.E., Akoachere, J.F.T., MacKay, W.G., Titanji, V.P.K., Weaver, L.T., 2004. *Helicobacter pylori* antigens in the faeces of asymptomatic children in the Buea and Limbe health districts of Cameroon: a pilot study. *Trop. Med. Int. Health* 9, 1036–1040. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01299.x>
113. Ndip, R.N., Malange Takang, A.E., Ojongokpoko, J.E.A., Luma, H.N., Malongue, A., Akoachere, J.-F.T.K., Ndip, L.M., MacMillan, M., Weaver, L.T., 2008. *Helicobacter pylori* isolates recovered from gastric biopsies of patients with gastro-duodenal pathologies in Cameroon: current status of antibiogram: *Helicobacter pylori* in Cameroon. *Trop. Med. Int. Health* 13, 848–854. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2008.02062.x>

114. Ndip, R.N., Malange Tarkang, A.E., Mbullah, S.M., Luma, H.N., Malongue, A., Ndip, L.M., Nyongbela, K., Wirmum, C., Efange, S.M.N., 2007. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. *J. Ethnopharmacol.* 114, 452–457. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.037>
115. Ngouela, S., Tsamo, E., Sondengam, B.L., 1988. Extractives from Bignoniaceae: Constituents of the Stem Bark of *Spathodea campanulata*. *Planta Med.* 54, 476–476. <https://doi.org/10.1055/s-2006-962516>
116. Ngougoure VLN, Mfotie Njoya E, Ngamli Fewou S, Ella AF, McGaw LJ, Moundipa PF, 2019. Acetylcholinesterase inhibitory, anti-inflammatory and antioxidant properties of some Cameroonian medicinal plants used to treat some neurological disorders. *Investig. Med. Chem. Pharmacol.* URL <https://www.investchempharma.com/https-dx-doi-org-10-31183-imcp-2019-00033/> (accessed 7.3.20).
117. Ngoyi, E.N., n.d. Résistance de *Helicobacter pylori* aux antibiotiques et d'autres substances antimicrobiennes: Aspects moléculaires des mécanismes de détection 168.
118. Niehues, M., Stark, T., Keller, D., Hofmann, T., Hensel, A., 2011. Antiadhesion as a functional concept for prevention of pathogens: N-Phenylpropenoyl-L-amino acid amides as inhibitors of the *Helicobacter pylori* BabA outer membrane protein. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 1104–1117. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000548>
119. Njume, C., Afolayan, A., Ndip, R., 2010. An overview of antimicrobial resistance and the future of medicinal plants in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Afr. J. Phar. Pharmacol.* 3(13): 685-699.
120. Odenbreit, S., Püls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., Haas, R., 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Gastric Epithelial Cells by Type IV Secretion. *Sci.* 287, 1497–1500. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1497>
121. Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G., Haas, R., 1999. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol. Microbiol.* 31, 1537–1548.
122. Oertli, M., Noben, M., Engler, D.B., Semper, R.P., Reuter, S., Maxeiner, J., Gerhard, M., Taube, C., Müller, A., 2013. *Helicobacter pylori*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and vacuolating cytotoxin promote gastric persistence and immune

- tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 3047–3052.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1211248110>
123. Olofsson, A., Vallström, A., Petzold, K., Tegtmeyer, N., Schleucher, J., Carlsson, S., Haas, R., Backert, S., Wai, S.N., Gröbner, G., Arnqvist, A., 2010a. Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. *Mol. Microbiol.* 77, 1539–1555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07307.x>
124. Olofsson, A., Vallström, A., Petzold, K., Tegtmeyer, N., Schleucher, J., Carlsson, S., Haas, R., Backert, S., Wai, S.N., Gröbner, G., Arnqvist, A., 2010b. Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. *Mol. Microbiol.* 77, 1539–1555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07307.x>
125. O'Mahony, R., Al-Khtheeri, H., Weerasekera, D., Fernando, N., Vaira, D., Holton, J., Basset, C., 2005. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World J. Gastroenterol.* 11, 7499–7507. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i47.7499>
126. Owen, R.J., Xerry, J., 2003. Tracing clonality of *Helicobacter pylori* infecting family members from analysis of DNA sequences of three housekeeping genes (*ureI*, *atpA* and *ahpC*), deduced amino acid sequences, and pathogenicity-associated markers (*cagA* and *vacA*). *J. Med. Microbiol.* 52, 515–524. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.04988-0>
127. Pan, M.-H., Hsieh, M.-C., Hsu, P.-C., Ho, S.-Y., Lai, C.-S., Wu, H., Sang, S., Ho, C.-T., 2008. 6-Shogaol suppressed lipopolysaccharide-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 1467–1477. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700515>
128. Parreira, P., Soares, B.I.G., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Reis, C.A., Martins, M.C.L., Duarte, M.F., 2017. Eucalyptus spp. outer bark extracts inhibit *Helicobacter pylori* growth: in vitro studies. *Ind. Crops Prod.* 105, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.012>
129. Parsonnet, J., Shmueli, H., Haggerty, T., 1999. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA* 282, 2240–2245. <https://doi.org/10.1001/jama.282.23.2240>
130. Peck, B., Ortkamp, M., Diehl, K.D., Hundt, E., Knapp, B., 1999. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.* 27, 3325–3333.

131. Perry, S., Sanchez, M. de la L., Yang, S., Haggerty, T.D., Hurst, P., Perez-Perez, G., Parsonnet, J., 2006. Gastroenteritis and Transmission of *Helicobacter pylori* Infection in Households. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1701–1708. <https://doi.org/10.3201/eid1211.060086>
132. Pianaro, A., Pinto, J., Trevisan Ferreira, D., Ishikawa, N., Braz-Filho, R., 2007. Iridoid glucoside and antifungal phenolic compounds from *Spathodea campanulata* roots *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 28, n. 2, p. 251-256, abr./jun.
133. Raymond, J., Thiberge, J.-M., Chevalier, C., Kalach, N., Bergeret, M., Labigne, A., Dauga, C., 2004. Genetic and Transmission Analysis of *Helicobacter pylori* Strains within a Family<sup>1</sup>. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1816–1821. <https://doi.org/10.3201/eid1010.040042>
134. Raymond, J., Thiberge, J.-M., Kalach, N., Bergeret, M., Dupont, C., Labigne, A., Dauga, C., 2008. Using macro-arrays to study routes of infection of *Helicobacter pylori* in three families. *PloS One* 3, e2259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002259>
135. Renart, J., Reiser, J., Stark, G.R., 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 3116–3120.
136. Ricci, V., Zarrilli, R., Romano, M., 2002. Voyage of *Helicobacter pylori* in human stomach: odyssey of a bacterium. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 34, 2–8. [https://doi.org/10.1016/s1590-8658\(02\)80051-2](https://doi.org/10.1016/s1590-8658(02)80051-2)
137. Rudi, J., Kuck, D., Strand, S., von Herbay, A., Mariani, S.M., Krammer, P.H., Galle, P.R., Stremmel, W., 1998. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis. *J. Clin. Invest.* 102, 1506–1514.
138. Russo F, Notamicola M, Di Matteo G, Leoci C, Caruso M L, Pirrelli M, Caradona M, Marandi L, Di Leo A, 1999. Detection of *Helicobacter pylori* cagA gene by polymerase chain reaction in faecal samples.1999. *Mar.* 11 (3):251-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10333197> (accessed 1.13.20).
139. Rutherford, J.C., 2014a. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *PLoS Pathog.* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004062>

140. Rutherford, J.C., 2014b. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *PLoS Pathog.* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004062>
141. Sachs, G., Weeks, D.L., Wen, Y., Marcus, E.A., Scott, D.R., Melchers, K., 2005. Acid Acclimation by *Helicobacter pylori*. *Physiology* 20, 429–438. <https://doi.org/10.1152/physiol.00032.2005>
142. Safavi, M., Shams-Ardakani, M., Foroumadi, A., 2015. Medicinal plants in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Pharm. Biol.* 53, 939–960. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.952837>
143. Schmitt, W., Haas, R., 1994. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* 12, 307–319. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01019.x>
144. Schwarz, S., Morelli, G., Kusecek, B., Manica, A., Balloux, F., Owen, R.J., Graham, D.Y., van der Merwe, S., Achtman, M., Suerbaum, S., 2008. Horizontal versus familial transmission of *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog.* 4, e1000180. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000180>
145. Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C.R., Meyer, T.F., Backert, S., 2003. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J.* 22, 515–528. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg050>
146. Selgrad, M., Malfertheiner, P., 2011. Treatment of *Helicobacter pylori*. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 27, 565–570. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834bb818>
147. Senkovich, O.A., Yin, J., Ekshyyan, V., Conant, C., Traylor, J., Adegboyega, P., McGee, D.J., Rhoads, R.E., Slepnev, S., Testerman, T.L., 2011. *Helicobacter pylori* AlpA and AlpB Bind Host Laminin and Influence Gastric Inflammation in Gerbils. *Infect. Immun.* 79, 3106–3116. <https://doi.org/10.1128/IAI.01275-10>
148. Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., Mentis, A., 2004. In Vitro and In Vivo Inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* Strain Shirota. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 518–526. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.518-526.2004>
149. Shin, J.-E., Kim, J.-M., Bae, E.-A., Hyun, Y.-J., Kim, D.-H., 2005. In Vitro Inhibitory Effect of Flavonoids on Growth, Infection and Vacuolation of *Helicobacter pylori*. *Planta Med.* 71, 197–201. <https://doi.org/10.1055/s-2005-837816>

150. Siddaraju, M.N., Dharmesh, S.M., 2007. Inhibition of gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and *Helicobacter pylori* growth by phenolic antioxidants of *Zingiber officinale*. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 324–332. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600202>
151. Simoons-Smit, I.M., Appelmelk, B.J., Verboom, T., Negrini, R., Penner, J.L., Aspinall, G.O., Moran, A.P., Fei, S.F., Shi, B.S., Rudnica, W., Savio, A., de Graaff, J., 1996. Typing of *Helicobacter pylori* with monoclonal antibodies against Lewis antigens in lipopolysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2196–2200.
152. Sinha, S.K., Martin, B., Sargent, M., McConnell, J.P., Bernstein, C.N., 2002. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* in a pediatric Canadian First Nations population. *Helicobacter* 7, 76–85.
153. Smolka, A.J., Backert, S., 2012. How *Helicobacter pylori* infection controls gastric acid secretion. *J. Gastroenterol.* 47, 609–618. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0592-1>
154. Sobhani, I., Vallot, T., Mignon, M., 1995. [*Helicobacter pylori*, a rediscovered bacterium. Implication in gastroduodenal diseases]. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983 24, 67–73, 75–76, 78–79.
155. Søreide, K., Thorsen, K., Harrison, E.M., Bingener, J., Møller, M.H., Ohene-Yeboah, M., Søreide, J.A., 2015. Perforated peptic ulcer. *Lancet Lond. Engl.* 386, 1288–1298. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00276-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00276-7)
156. Sripramote, M., Lekhyananda, N., 2003. A randomized comparison of ginger and vitamin B6 in the treatment of nausea and vomiting of pregnancy. *J. Med. Assoc. Thail.* Chotmai het Thangphaet 86, 846–853.
157. Sugimoto, M., Ohno, T., Graham, D.Y., Yamaoka, Y., 2009. Gastric mucosal interleukin-17 and -18 mRNA expression in *Helicobacter pylori*-induced Mongolian gerbils. *Cancer Sci.* 100, 2152–2159. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01291.x>
158. Suzuki, R., Shiota, S., Yamaoka, Y., 2012. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infect. Genet. Evol.* 12, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.002>
159. Tan, P.V., Boda, M., Sonke, B., Etoa, F.-X., Nyasse, B., 2006. Susceptibility of helicobacter and campylobacter to crude extracts prepared from plants used in Cameroonian folk medicine 15. *Phar.* 3: 877-891.
160. Tarsia, C., Danielli, A., Florini, F., Cinelli, P., Ciurli, S., Zambelli, B., 2018. Targeting *Helicobacter pylori* urease activity and maturation: In-cell high-throughput

- approach for drug discovery. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1862, 2245–2253. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.07.020>
161. Tchakounté, B.N., Nkouayep, V.R., Poné, J.W., 2018. Soil Contamination Rate, Prevalence, Intensity of Infection of Geohelminths and Associated Risk Factors among Residents in Bazou (West Cameroon). *Ethiop. J. Health Sci.* 28, 63–72.
  162. Tharmalingam, N., Kim, S.-H., Park, M., Woo, H., Kim, H., Yang, J., Rhee, K.-J., Kim, J., 2014. Inhibitory effect of piperine on *Helicobacter pylori* growth and adhesion to gastric adenocarcinoma cells. *Infect. Agent. Cancer* 9, 43. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-9-43>
  163. Thöle, C., Brandt, S., Ahmed, N., Hensel, A., 2015. Acetylated rhamnogalacturonans from immature fruits of *abelmoschus esculentus* inhibit the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric cells by interaction with outer membrane proteins. *Molecules* 20, 16770–16787. <https://doi.org/10.3390/molecules200916770>
  164. Tiogué, C.T., Bibou, A., Kenfack, A., Tchoumboué, J., 2020. Caractéristiques Socio-économiques et techniques des élevages piscicoles du Département du Mbam et Inoubou. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 14, 983–1000. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v14i3.26>
  165. Toller, I.M., Neelsen, K.J., Steger, M., Hartung, M.L., Hottiger, M.O., Stucki, M., Kalali, B., Gerhard, M., Sartori, A.A., Lopes, M., Müller, A., 2011. Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 14944–14949. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100959108>
  166. Torres, J., Pérez-Pérez, G., Goodman, K.J., Atherton, J.C., Gold, B.D., Harris, P.R., la Garza, A.M., Guarner, J., Muñoz, O., 2000. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Arch. Med. Res.* 31, 431–469.
  167. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350–4354.
  168. Tummuru, M.K., Cover, T.L., Blaser, M.J., 1993. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun.* 61, 1799–1809.
  169. Tuorkey M. and Karolin, T.M. and K., 2009. Anti-ulcer activity of curcumin on experimental gastric ulcer in rats and its effect on oxidative stress/antioxidant, IL-6

- and enzyme activities. *Bio. Env. Sci.* 22(6):488-495  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20337222> (accessed 1.21.20).
170. Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N., Schlemper, R.J., 2001. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N. Engl. J. Med.* 345, 784–789.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa001999>
171. Unemo, M., Aspholm-Hurtig, M., Ilver, D., Bergström, J., Borén, T., Danielsson, D., Teneberg, S., 2005. The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 280, 15390–15397. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412725200>
172. Ustün, O., Özçelik, B., Akyön, Y., Abbasoglu, U., Yesilada, E., 2006. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 108, 457–461. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.06.001>
173. Vannini, A., Roncarati, D., Spinsanti, M., Scarlato, V., Danielli, A., 2014. In depth analysis of the *helicobacter pylori* cag pathogenicity island transcriptional responses. *PLOS ONE* 9, e98416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098416>
174. Varon, C., Mégraud, F., 2013. Infection à *Helicobacter pylori* et cancer gastrique. *Rev. Francoph. Lab.* 2013, 67–76. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(13\)72225-1](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(13)72225-1)
175. Vincent, P., Gottrand, F., Pernes, P., Husson, M.O., Lecomte-Houcke, M., Turck, D., Leclerc, H., 1994. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in cohabiting children. Epidemiology of a cluster, with special emphasis on molecular typing. *Gut* 35, 313–316. <https://doi.org/10.1136/gut.35.3.313>
176. Walz, A., Odenbreit, S., Mahdavi, J., Borén, T., Ruhl, S., 2005. Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays. *Glycobiol* 15, 700–708. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwi049>
177. Wang, H.-J., Cheng, W.-C., Cheng, H.-H., Lai, C.-H., Wang, W.-C., 2012. *Helicobacter pylori* cholesteryl glucosides interfere with host membrane phase and affect type IV secretion system function during infection in AGS cells. *Mol. Microbiol.* 83, 67–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07910.x>
178. Wang, Y.-C., 2014. Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 10368–10382.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i30.10368>

179. Warren, J.R., Marshall, B., 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1273–1275.
180. Wroblewski, L.E., Peek, R.M., Wilson, K.T., 2010. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 713–739. <https://doi.org/10.1128/CMR.00011-10>
181. Wu, J.Y., Lu, H., Sun, Y., Graham, D.Y., Cheung, H.S., Yamaoka, Y., 2006. Balance between polyoma enhancing activator 3 and activator protein 1 regulates *Helicobacter pylori*–stimulated matrix metalloproteinase 1 expression. *Canc. Res.* 66, 5111. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0383>
182. Yamaoka, Y., Kudo, T., Lu, H., Casola, A., Brasier, A.R., Graham, D.Y., 2004. Role of interferon-stimulated responsive element-like element in interleukin-8 promoter in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol* 126, 1030–1043. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.12.048>
183. Yamaoka, Y., Kwon, D.H., Graham, D.Y., 2000. A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 7533–7538. <https://doi.org/10.1073/pnas.130079797>
184. Yamaoka, Y., Ojo, O., Fujimoto, S., Odenbreit, S., Haas, R., Gutierrez, O., El-Zimaity, H.M.T., Reddy, R., Arnqvist, A., Graham, D.Y., 2006. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut* 55, 775–781. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.083014>
185. Yang, J.-C., 2014. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current status and future concepts. *World J. Gastroenterol.* 20, 5283. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5283>
186. Yeon, M.J., Lee, M.H., Kim, D.H., Yang, J.Y., Woo, H.J., Kwon, H.J., Moon, C., Kim, S.-H., Kim, J.-B., 2019. Anti-inflammatory effects of Kaempferol on *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 83, 166–173. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1528140>
187. Zaidi, S.F.H., Yamada, K., Kadowaki, M., Usmanghani, K., Sugiyama, T., 2009. Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. *J. Ethnopharmacol.* 121, 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.11.001>

## Webographie

1. <http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/grain6d.html>, consulté le 24/07/2019 à 9h
2. <http://www.prevention.ch/ulcere.htm>, consulté le 02/08/2019 à 21h

## **ANNEXES**

**Annexe 1: Fiche d'enquête**

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

Facultés de sciences

Département de Biochimie

*Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie*

Questionnaire concernant les plantes médicinales utilisées par tradipraticiens pour traiter le mal gastrique et les troubles digestifs

Fiche n°.....Date.....

Localité.....

Nom du tradipraticien.....Age.....Sexe.....

1. Pouvez-vous donner les noms des quelques maladies donc vous êtes capables de traiter

a-.....b-.....c-.....

2. Connaissez-vous les maladies liées à d'estomac  
OUI.....NON.....

3. Si oui, quels sont ces maladies ?

.....  
.....

4. Quelles sont les causes de ces maladies liées au mal d'estomac ?

.....  
.....

5. Est-ce que vous traitez le mal d'estomac et troubles digestifs ?  
OUI.....NON.....

6. Si oui, qu'est-ce que vous utilisez pour traiter ces maladies ?

7. Quelles plantes utilisez-vous pour traiter ces maladies ? Quels sont les noms vernaculaires de ces plantes ? N° de l'échantillon

Nom vernaculaire .....

Nom courant .....

8. Quelles sont les parties de plante utilisée pour traiter ces maladies ?

Racine Feuilles ..... Tige ..... Rhizome

Écorce ..... Fruit .....

Fleur ..... Plante entière .....

9. Recette de la préparation :

.....  
.....  
.....

10. Posologie:

.....  
.....

11. Pendant combien de temps (jours ou mois) le patient doit-il suivre le traitement pour être complètement guéri ?

.....  
.....

12. Quand vous donnez le traitement à un patient considérez-vous l'âge comme un facteur très import ?

OUI.....NON.....Pourquoi.....

.....  
.....

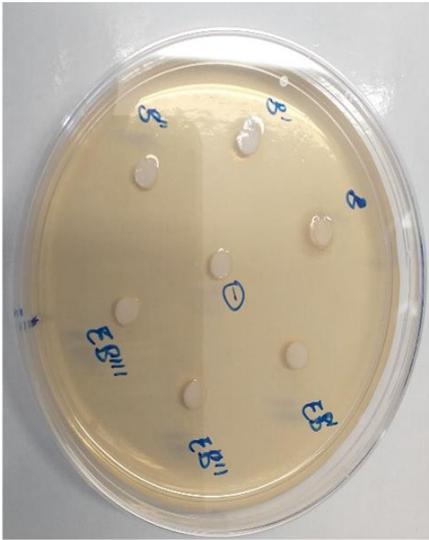
13. Qu'est ce qui arrive au patient qui consomme le médicament en excès ?

.....  
.....

14. Dans ce cas, qu'est- ce que vous faites pour réduire les effets du médicament ?

.....  
.....  
.....

## Annexe 2 : Divers



**Figure 29:** Culture de *H. pylori* sur gélose



**Figure 30:** Incubation des microplaques de culture de *H. pylori* avec un générateur d'atmosphère micro aérobie Gaspack



**Figure 31:** Incubation des boîtes de pétries de culture de *H. pylori* avec un générateur d'atmosphère micro aérobie Gaspack



**Figure 32:** Montage de SDS-PAGE



**Figure 33:** Montage pour le fractionnement



**Figure 34:** Appareil pour la Chromatographie en Phase Liquide à Haute Pression (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse

**Annexe 3: Les photos de quelques plantes**



*Acanthus monthanus*



*Annona muricata*



*Garcinia kola*



*Spathodea campanulata*



*Cymbopogon ciratus*



*Ocimum gratissimum*



*Ficus exasperata*



*Ageratum conoizoides*



*Nicotina tabacum*



*Mangifera indica*



*Carica papaya*



*Erythrina senegalensis*



*Khaya grandifoliola*



*Entada africana*



*Citrus aurantifolia*

## **Annexe 4: Procédure de préparation des réactifs utilisés**

### **1. Etude des propriétés anti-*Helicobacter pylori***

#### **✓ Préparation du milieu de culture**

##### **S1:**

- Peser 18 g de GC agar
- Dissoudre dans 450 mL d'eau stérile

##### **S2:**

- Une boîte du supplément sélectif
- Dissoudre dans 2 mL d'eau stérile

S1+ 40 mL de Horse serum + 5 mL vitamine Mix + S2

### **2. Test d'adhérence**

#### **Préparation de tampon (0,15 M NaCl, 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pH 9,0)**

- Peser 0,87 g de NaCl et 1,06 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et dissoudre dans 100 mL

#### **Tampon de blocage**

- Peser 0,2 g de BSA et 50 µL de Tween-20 qsp 100 mL

#### **FITC**

- Peser 0,1 g de FITC
- Dissoudre dans le DMSO qsp 10 mL

### **3. Western blot**

#### **Solution de développement des bandes**

- Prélever 8,83 ml du Tris (0,1 M; pH 9,6)
- Prélever 70 µL MgCl<sub>2</sub> (1 M)
- Prélever 100 µL de BCIP (5 mg/mL dans le DMF)
- Prélever 1000 µL de NBT (1 mg/mL dans 0.1 M de Tris; pH 9,6)

Pour obtention qsp 10 mL

## 4. Etude phytochimique

### Dosage des polyphénols

- Solution d'acide gallique 40 $\mu$ g/mL
  - Peser 0,01 g d'acide gallique
  - Dissoudre dans l'éthanol qsp 25mL
  
- Solution de folin ciocalteu 2N
  - Prélever 10 ml du réactif de Folin Ciocalteu
  - Diluer dans l'eau distillée qsp 100 mL
  
- Solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 75 g/L
  - Peser 11,25 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
  - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 150 mL

### Dosage des flavonoïdes

- Solution de quercetine 5 $\mu$ g/mL
  - Peser 0,01 g de quercetine
  - Dissoudre dans 2mL de méthanol
  
- Solution éthanolique d'AlCl<sub>3</sub> 2%
  - Peser 2 g d'AlCl<sub>3</sub>
  - Dissoudre dans l'éthanol qsp 100 mL

## Annexe 5: Courbes d'étalonnages

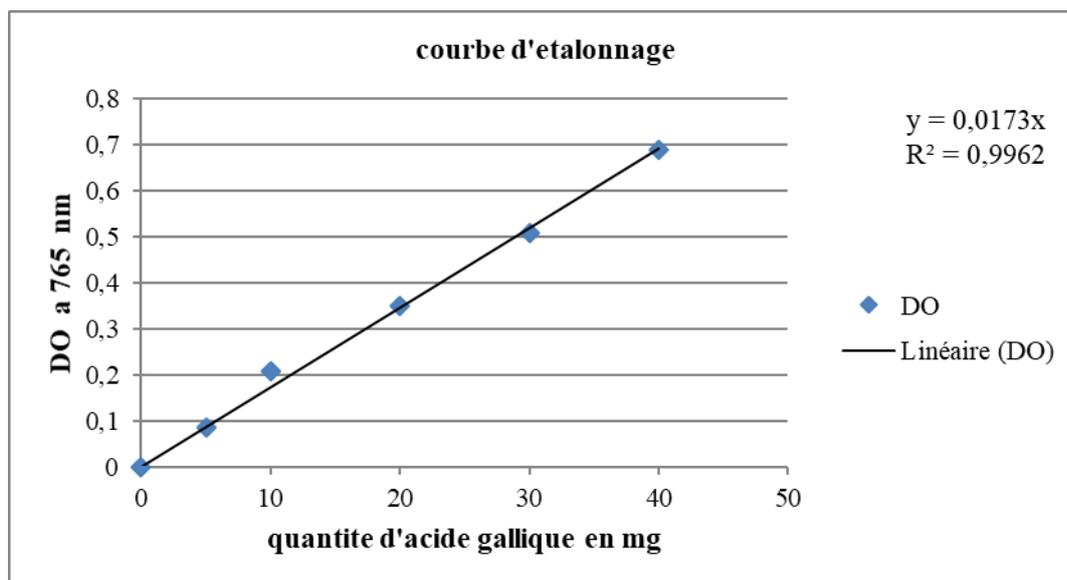


Figure 35: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

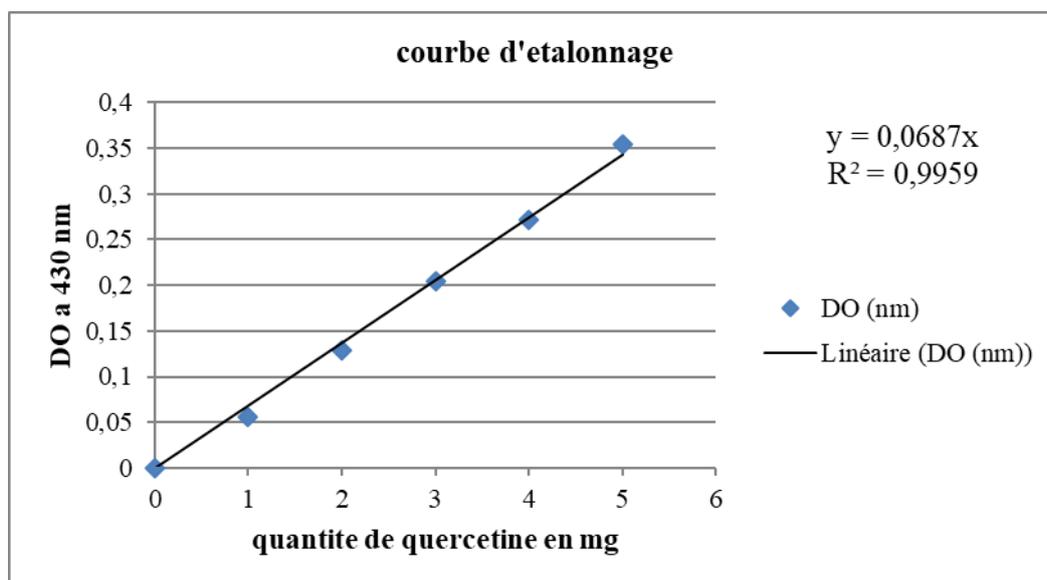


Figure 36: Courbe d'étalonnage de la quercétine

**PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE**

Ce travail de recherche a conduit à la publication de deux (02) articles scientifiques.



## Research paper

Inhibitory effect of medicinal plants from Cameroon on the growth and adhesion of *Helicobacter pylori*Corinne Raïssa Ngnamko<sup>a</sup>, Frederic Nico Njayou<sup>a</sup>, Muinah Fowora<sup>b</sup>, Fredy Brice Simo Nemg<sup>a</sup>, Paul Moundipa Fewou<sup>a,\*</sup>, Stella Ifeanvi Smith<sup>b</sup><sup>a</sup> Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Department of Biochemistry, Faculty of science, University of Yaounde I, PO. Box 812 Yaounde, Cameroon<sup>b</sup> Nigerian Institute of Medical Research, 6, Edmond Crescent, P.M.B.2013, Lagos, Nigeria

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Ethnopharmacology  
*Spathodea campanulata*  
*Nicotina tabacum*  
*Helicobacter pylori*  
 Adhesins BabA and HopZ  
 Cameroon

## ABSTRACT

**Introduction:** Plants in the Cameroon Pharmacopoeia are used by the population as decoctions, infusions and are macerated to relieve digestive and gastric disorders. The aim of this study was to screen for the anti-*Helicobacter pylori* and anti-adhesion activities of various plant extracts from Cameroon.

**Methods:** Medicinal plants used for the treatment and stomach pains and digestive disorders were identified and collected in an ethnopharmacological survey in Cameroon. Dried plant material were used to prepare crude extracts and tested against *Helicobacter pylori* strain P12. The minimal inhibitory concentration (MIC) of plant extract was determined by broth micro dilution and agar diffusion methods. The anti-adhesion was determined by adhesion of *Fluorescein-isothiocyanate* (FITC) labelled *Helicobacter pylori* to sections of mouse gastric tissue and expression of adhesion gene in response to the plant extract treatment using RT-PCR and western blotting. Results were analyzed statistically by the Bonferroni's post hoc test.

**Results:** All the plant extracts demonstrated anti-*Helicobacter pylori* activity with MIC values ranging from 0.125 to 100 mg/ml. *Spathodea campanulata* and *Nicotina tabacum* showed the highest anti-*Helicobacter pylori* activity on *H. pylori* P12 strain. The lowest MIC recorded by *Spathodea campanulata* and *Nicotina tabacum* were 0.125 and 1 mg/ml respectively. Seventeen plant extracts reduced *H. pylori* adhesion to the mouse tissue stomach. In addition, plant extracts decreased the expression of blood group antigen-binding adhesion BabA and *H. pylori* outer membrane protein HopZ.

**Conclusion:** *Spathodea campanulata* and *Nicotina tabacum* may be useful in the development of new drugs for the treatment of *H. pylori* infection. They represent promising natural sources to be used in pharmacology.

## 1. Introduction

Peptic ulcers affect the stomach (gastric ulcers) and small intestines (duodenal ulcers). *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) plays a predominant role in the etiology of gastric cancer and was characterized as a class I carcinogen by the World Health Organization in 1994 [1]. This disease is characterized by gastric inflammation, gastric cancer and gastric mucosa-associated lymphoid-tissue lymphoma [2,3]. *H. pylori* is a curved Gram-negative bacterium frequently present in the human stomach. It possesses two to six flagella which permit it to be mobile and to resist stomach contractions and favor penetration into the gastric mucosa. Approximately 50% of the world's population are infected with *H.*

*pylori* and its prevalence is significantly higher in developing countries [4–6], infection reaches 80–90% of the population [7]. In Cameroon, the study conducted on 171 patients with gastric ulcer at the Yaounde University Teaching Hospital and Medical Center the Cathedral showed that 72.5% of these patients were infected by this bacterium [8].

The transmission of *H. pylori* is uncertain, but the gastro-oral, oral-oral and fecal oral routes are highly probable [9]. Once at the epithelial level, *H. pylori* adheres with the help of adhesins. There are many adhesins such as adherence-associated lipoprotein A and B (*AlpA-B*), blood group antigen-binding adhesion (*BabA*), sialic acid-binding adhesion (*SabA*), *H. pylori* outer membrane protein (*HopZ*), *H. pylori* adhesin A (*HpaA*) and Lewis<sup>x</sup>-LPS, all of which mediate adhesion to

**Abbreviations:** BabA, blood group antigen binding adhesion; HopZ, *Helicobacter pylori* outer membrane protein; FITC, Fluorescein-isothiocyanate; MIC, minimal inhibitory concentration; DMSO, dimethyl sulfoxide

\* Corresponding author.

**E-mail addresses:** [corinnengnameko@yahoo.fr](mailto:corinnengnameko@yahoo.fr) (C.R. Ngnamko), [njayou@yahoo.com](mailto:njayou@yahoo.com) (F.N. Njayou), [muinahj@yahoo.com](mailto:muinahj@yahoo.com) (M. Fowora), [nemgsi@yahoo.fr](mailto:nemgsi@yahoo.fr) (F.B.S. Nemg), [pmoundipa@uy1.uninet.cm](mailto:pmoundipa@uy1.uninet.cm), [pmoundipa@hotmail.com](mailto:pmoundipa@hotmail.com) (P. Moundipa Fewou), [stellaismith@yahoo.com](mailto:stellaismith@yahoo.com) (S.I. Smith).

<https://doi.org/10.1016/j.eujim.2019.100957>

Received 15 January 2019; Received in revised form 9 August 2019; Accepted 9 August 2019

1876-3820/ © 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Table 1**  
Primer sequences used for qualitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

Genes	Primer Sequence (5'__3')	
	Forward	Reverse
<i>babA</i>	AATCCAAAAGGAGAAAAAGTATGAAA	ACAGGATGTGGCTTTAGTGATTGT
<i>hopZ</i>	TTTTGACCCGGTGGATATATTAG	CGTAGGTGATTTCTCGTATCCGCCGGCGTAA

gastric epithelial cells, followed by the establishment of infection [10]. *H. pylori* is sensitive to acid pH but survives in the stomach under acidic conditions due to the activity of the urease secreted by this bacterium. *BabA* plays a significant role in enhancing *H. pylori* virulence, and may represent a potential target for a curative therapy [11]. Two of the virulence factors that have been implicated in this process are cytotoxin-associated gene A (*cagA*) and vacuolating cytotoxin A (*vacA*), which are expressed by *H. pylori*. *VacA* is present in all *H. pylori* strains and contains two variable parts relevant to virulence [12], whereas *cagA* is not present in every *H. pylori* strain and is a marker for a pathogenicity island (PAI) [13] associated with more severe clinical outcomes as well as an increased risk of developing gastric cancer and peptic ulcer disease.

Current treatment still relies on a combination of antimicrobial agents, such as antibiotics, and anti-secretory agents, such as proton pump inhibitors (PPIs) [14,15]. Several studies have shown a high resistance to antibiotics namely 95.5% metronidazole, 44.7% clarithromycin and 85.6% amoxicillin [4,5,16]. The resistance of *H. pylori* to antibiotics used to treat infection makes relevant the search for new therapeutic sources with anti-*helicobacter pylori* activity [17]. Currently, plants are viewed as the main source for the discovery of new compounds [18]. Medicinal plants have always been used for the treatment of gastric diseases in Africa and specifically in Cameroon. Tan et al. [19] showed that an extract of *Pleiocarpa* sp. had inhibitory effects against this bacterium. Likewise, *Eryngium foetidum* extract presented similar effects on *H. pylori* culture [20]. In addition, the work of Tharmalingam et al. [21] has shown that piperine extract has anti-*Helicobacter pylori* and anti-adhesive activities. The anti-*Helicobacter* and anti-adhesive effects were investigated for a list of medicinal plants obtained from a survey held amongst herbalist in Cameroon.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Survey, plant collection and extraction

The ethnopharmacological survey was carried out in Bafia (Center region Cameroon), Bazou and Foubot (West region Cameroon). Informed consent was obtained orally from all responders prior to the interview. It was made clear to the responders that their information was purely for scientific studies and not for any commercial use. A questionnaire was developed to investigate what types of medicinal plants were used by the herbalist for the treatment of stomach pains and digestive disorders. All the traditional physicians were recommended to by neighboring populations. Each practitioner was interviewed in local language. The questionnaire contained information about different plants used to treat stomach related disease, the mode of preparation, administration of the medicinal drug, the parts of the plants used and route of administration. Every herbalist was asked to list the main diseases treated and the plants used in the treatment. Each herbalist was also asked to provide samples of the plant species from their own collection as well as from the field; and if possible plant photographs. Two voucher specimens per medicinal plant were collected in the field, pressed and then dried prior to identification at the Cameroon National Herbarium (HNC) or Society of Forest Reserves of Cameroon (SRF/Cam). All plant specimens were collected in both flowering and fruiting conditions. Samples of medicinal plants were

collected for scientific identification and herbarium preparation following standard procedures.

Plants were collected in the locality of Bafia (Center region Cameroon), Bazou and Foubot (West region Cameroon) and they were washed with distilled water and dried at room temperature for several weeks. The dried plant materials were powdered using a grinder. The powder obtained was kept at 4 °C until the preparation of extracts. Two hundred grams of powdered plant materials were soaked in 800 ml of solvent methylene chloride/methanol (1:1; v/v) or 70% ethanol for 48 h and filtered using Whatman N° 1 paper. The filtrate was dried using a rotary evaporator to obtain a residue which constituted the crude extract.

### 2.2. The growth condition of *H.pylori* P12 and determination of minimum inhibitory concentration (MICs) by the microdilution and agar dilution method

*H. pylori* strain P12 (*vacA* and *cagA* positive) was obtained from the Nigerian Institute of Medical Research, Lagos, Nigeria. The strain was cultured on GC agar supplemented with horse serum, vitamins and selective supplement (vancomycin 5.0 mg, trimethoprim 2.5 mg, cef-sulodin 2.5 mg and amphotericin 2.5 mg). *H. pylori* strain was grown at 37 °C for 72 h under microaerophilic conditions (2.5 to 9.5% CO<sub>2</sub> and 6.2 to 13.2% O<sub>2</sub>). Except for vitamin mix obtained from Sigma, France, all reagents were purchased from Oxoid, United Kingdom.

The broth microdilution assay was performed according to the method described by Sgouras et al. [22]. To each well in the microplate 100 µl of Mueller Hinton broth, supplemented with 10% fetal bovine serum was inoculated with  $6 \times 10^8$  *H. pylori* (McFarland turbidity standard 2), 100 µl of the extract, was also added to reach the final concentrations of 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2; 10; 20; 50 and 100 mg/ml. Clarithromycin (10 mg/ml) was used as the standard drug for growth inhibition. The microplate was incubated at 37 °C under micro-aerophilic conditions for 3–5 days. Urease activity was determined by phenol red method with some modifications. Briefly, 5 µl of *H. pylori* cell suspension was added to 150 µl of urease reaction buffer (20% [w/v] urea and 0.012% phenol red in phosphate buffer, with the final pH adjusted to 6.5) on a microliter plate, and the plate was incubated for 1 h at 37 °C. The absorbance at 620 nm was measured with a Sunrise microliter plate reader.

The MICs of plant extract against *H. pylori* strain was evaluated by using agar dilution method. To confirm the micro-dilution, a series of concentrations of 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2; 10; 20; 50 and 100 mg/ml of plant extract was used. The agar plates were checked for bacterial growth for 3 days. After 72 h, the MIC values were determined as the lowest concentration at which there was no strain growth judged by visual examination. Clarithromycin was used as the positive control.

### 2.3. Anti-adherence Assay with *H. pylori*

The adhesion assay was performed according to the method described by Lengsfeld et al. [23].

#### 2.3.1. Preparation of FITC-labelled *H. pylori*

Briefly, 2 days after inoculation, bacteria were harvested from agar plates using a 2 µL sterile loop and resuspended in 1.0 ml of 0.15 M

**Table 2**  
Medicinal plants used in the treatment of stomach pains and digestive disorders as identified by the ethno pharmacological survey.

Family	Scientific name	Voucher Specimen number	Vernacular name	Plant part	Ethnopharmacological use(s)	Administration of the drugs	FC (%)
Acanthaceae	<i>Acanthus montanus</i> (Nees) T. Anderson.	26004/SRF/Cam	Fozem	Leaves	Stomach-ache, Chronic ulcers, gastritis	Oral administration as decoction	1.22
Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i> Lin.	18646/HNC	Fronneux	Bark	Gastrointestinal disorders	Oral administration as decoction	4.29
Annonaceae	<i>Annona muricata</i> L.	32879/HNC	Ntùè kaoh	Leaves, Seeds	Stomach pains	Oral administration as decoction	1.84
Apocynaceae	<i>Enantia chlorantha</i> Oliv.	6420/HNC	Sabasaba	Bark	Stomach problems	Oral administration as decoction	3.68
Araliaceae	<i>Voacanga africana</i> Stapf.	47215/HNC	Bouleu nkan	Bark	Stomach problems, antitumor	Oral administration as decoction	4.9
Asteraceae	<i>Polyscias fulva</i> Hiern.	2990/HNC	Pugue (Pungue)	Aerial parts	Veneral infections, stomach pains	Oral administration as decoction	1.84
	<i>Ageratum conyzoides</i> Lin.	6575/HNC	Kéyavas	Leaves	Abdominal pains, dysentery, gastrointestinal pain	Oral administration as decoction	7.36
	<i>Elephantopus mollis</i> Kunth.	39570/HNC	Akiba	Leaves	Antibacterial, stomach disorders	Oral administration as decoction	1.22
	<i>Emilia coccinea</i> (Sims.)g. don.	29441/HNC	Shin mi	Leaves	ulcer, jaundice, abdominal pains	Oral administration as decoction	1.22
	<i>Spilanthes africana</i> D.C.	33075/HNC	Mièk gèp	Flowers	Toothache, gastrointestinal disorders	Oral administration as decoction	3.68
	<i>Vernonia guineensis</i> Benth.	11133/SRF/Cam	Mgbukwet	Rhizomes	Gastrointestinal disorders, jaundice	Oral administration as decoction	2.45
Biognoniaceae	<i>Spathodea campanulata</i> P.Beaux.	50085/HNC	Vivet	Bark	Digestive disorders, ulcer	Oral administration as decoction	5.52
Burseraceae	<i>Dacryodes edulis</i> (g.don) h.lam.	18258/HNC	Kéyom	Bark	Dysentery, antimicrobial	Oral administration as decoction	1.84
Caricaceae	<i>Carica papaya</i> Lin.	18647/HNC	Tam mekal	Leaves	Gastrointestinal disorders, stomach disorders	Oral administration as decoction	3.68
Cesipilaceae	<i>Ptilostigma thomningii</i> (schum.) n.redhead.	2689/HNC	Pien	Leaves	Stomach-ache, digestive disorders	Oral administration as decoction	1.84
	<i>Senna alata</i> (Lin.) link.	11002/HNC	Fa bibile	Leaves	Stomach problems	Oral administration as decoction	1.22
Clusiaceae	<i>Allanblackia floribunda</i> Oliv.	1380/HNC	Nsangomo	Leaves	Digestive disorders, stomach ache	Oral administration as decoction	1.84
	<i>Garcinia kola</i> Heckel.	9815/SRF/Cam	Nzòè mbeu	Leaves	Antitumor, gastrointestinal disorders	Oral administration as decoction	5.52
Commelinaceae	<i>Commelina diffusa</i> Burm.f.	35189/SRF/Cam	Metit neuron	Leaves	Antimicrobial, fever	Oral administration as decoction	1.84
Euphorbiaceae	<i>Alchornea laxiflora</i> (benth) Pax&K.H.	2093/HNC	Meshé	Leaves	Stomach-ache, dysentery, jaundice	Oral administration as decoction	1.22
Family	Scientific name	Voucher Specimen number	Vernacular name	Plant part	Ethnopharmacological use(s)	Administration of the drugs	FC (%)
Euphorbiaceae	<i>Croton macrostachyus</i> Hochst et Del.	17909/SRF/Cam	Kùtshá	Leaves	Stomach-ache	Oral administration as decoction	1.84
	<i>Euphorbia hirta</i> L.	14288/HNC	Bimom	Aerial parts	Gastrointestinal disorders	Oral administration as decoction	1.84
Fabaceae	<i>Macaranga hirtifolia</i> Beille		Assas	Leaves	Gastrointestinal disorders, tuberculosis	Oral administration as decoction	3.06
	<i>Détiarum microcarpum</i> Gill.	Perr. 49834/SRF/Cam	Megham	Bark	Stomach-ache, diarrhoea, dysentery	Oral administration as decoction	0.61
	<i>Erythrina senegalensis</i> D.C.	35259/HNC		Leaves, Barks	Gastrointestinal disorders	Oral administration as decoction	0.61
Labiaceae	<i>Millettia versicolor</i> Welw.	32315/HNC	T'sham	Leaves	Digestive disorders	Oral administration as decoction	1.22
	<i>Ocimum basilicum</i> L.	6899/SRF/Cam	Messeck	Leaves	Gastrointestinal disorders	Oral administration as decoction	1.22
	<i>Ocimum gratissimum</i> Lin.	42852/HNC	Yi'rum	Leaves	Antitumor, stomach pains	Oral administration as decoction	1.84
Loganiaceae	<i>Anthocleista schweinfurthii</i> Gil.	2281/HNC	Fou byé	Bark	Abdominal pains	Oral administration as decoction	1.22
Loranthaceae	<i>Persa americana</i> Mill.	18604/HNC	Okon	Leaves	Antitumor	Oral administration as decoction	2.45
Malvaceae	<i>Phragmintera capitata</i> (Spreng) Balle.	24667/HNC	Fa' tütù	Whole plant	Gastrointestlnl disorders, ulcer	Oral administration as decoction	0.61
	<i>Triumfetta pentandra</i> A. Rich.	9014/SRF/Cam	Lù	Bark	Stomach-ache	Oral administration as decoction	1.84
Meliaceae	<i>Khaya grandifoliola</i> D.C.	52661/HNC	Ghùghu	Bark	Stomach-ache, gastrointestinal disorders	Oral administration as decoction	1.22
Mimosaceae	<i>Entada africana</i> Guill et Pers.	2334/HNC	Ntù goyave	Leaves, Barks	Stomach disorders	Oral administration as decoction	1.84
Moraceae	<i>Ficus exasperata</i> Vahl.	43999/HNC	Boupaute	Leaves	Gastrointestinal disorders, ulcer	Oral administration as decoction	3.68
Myrtaceae	<i>Psidium guayana</i> L.	/2885/HNC	Fiba gass	Leaves	Antibacterial, stomach ache	Oral administration as decoction	1.22
Piperaceae	<i>Piper umbellatum</i> L.	20934/SRF/Cam	Lamassi	Leaves	Stomach disorders	Oral administration as decoction	2.45
Poaceae	<i>Cymbopogon ciratus</i> (D.C.) Stapf.	18628/HNC	Deulò	Leaves	Toothache, digestive disorders	Oral administration as decoction	3.68
Rutaceae	<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle.		Shin pè'	Bark	Stomach pains	Oral administration as decoction	2.45
Solanaceae	<i>Nicotina tabacum</i> L.	1863/SRF/Cam					
Sterculiaceae	<i>Cola acuminata</i> (P. Beauv.) Schott & Endl.	1729/SRF/Cam					

HNC: Cameroon National Herbarium.

SRF/Cam: Society of Forest Reserves of Cameroon.

**Table 3**  
Minimal inhibitory concentration (MIC) of plant extracts against *H. pylori*.

Scientific name	Plant part	MIC (mg/ml)
<i>Acanthus montanus</i> .	Leaves	50 ± 0.0
<i>Ageratum conyzoides</i>	Aerial parts	10 ± 0.0
<i>Alchornea laxiflora</i>	Leaves	20 ± 0.0
<i>Allanblackia floribunda</i>	Leaves	2 ± 0.0
<i>Annona muricata</i>	Leaves	20 ± 0.0
<i>Anthocleista schweinfurthii</i>	Bark	20 ± 0.0
<i>Carica papaya</i>	Leaves	50 ± 0.0
<i>Citrus aurantifolia</i>	Leaves	50 ± 0.0
<i>Cola acuminata</i>	Bark	20 ± 0.0
<i>Commelina diffusa</i>	Leaves	50 ± 0.0
<i>Croton macrostachyus</i>	Leaves	100 ± 0.0
<i>Cymbopogon ciratus</i>	Leaves	10 ± 0.0
<i>Dacryodes edulis</i>	Bark	20 ± 0.0
<i>Détarium microcarpum</i>	Bark	50 ± 0.0
<i>Elephantopus mollis</i>	Leaves	50 ± 0.0
<i>Emilia coccinia</i>	Leaves	20 ± 0.0
<i>Enantia chloranta</i>	Bark	50 ± 0.0
<i>Entada africana</i>	Bark	50 ± 0.0
<i>Erythrina senegalensis</i>	Leaves	100 ± 0.0
<i>Euphorbia hirta</i>	Aerial parts	20 ± 0.0
<i>Ficus exasperata</i>	Leaves	50 ± 0.0
<i>Garcinia kola</i>	Leaves	20 ± 0.0
<i>Khaya grandifoliola</i>	Bark	20 ± 0.0
<i>Macaranga hurifolia</i>	Leaves	20 ± 0.0
<i>Mangifera indica</i>	Bark	20 ± 0.0
<i>Millettia versicolor</i>	Leaves	50 ± 0.0
<i>Nicotina tabacum</i>	Leaves	1 ± 0.0
<i>Ocimum basilicum</i>	Leaves	100 ± 0.0

Scientific name	Plant part	MIC (mg/ml)
<i>Ocimum gratissimum</i>	Leaves	20 ± 0.0
<i>Persea americana</i>	Bark	50 ± 0.0
<i>Phragmentera capitata</i>	Leaves	20 ± 0.0
<i>Piper umbellatum</i>	Leaves	20 ± 0.0
<i>Polyscias fulva</i>	Bark	20 ± 0.0
<i>Psidium guayava</i>	Leaves	50 ± 0.0
<i>Senna alata</i>	Leaves	50 ± 0.0
<i>Spathodea companulata</i>	Bark	0,125 ± 0.0
<i>Spilanthes africana</i>	Flowers	2 ± 0.0
<i>Triumfetta pentandra</i>	Whole plant	20 ± 0.0
<i>Vernonia guineensis</i>	Rhizomes	50 ± 0.0
<i>Voacanga africana</i>	Bark	10 ± 0.0

Data represent MIC values observed from three independent experiments.

NaCl and 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9.0, in double-distilled water. Bacterial titers were adjusted to  $3.0 \times 10^7$  CFU/ml by measuring the optical density at 550 nm. Ten microliters of freshly prepared 1% fluorescein-isothiocyanate (FITC, Sigma) in dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to the suspension, which was then incubated for 1 h at room temperature (RT) in the dark. Bacteria were recovered by centrifugation at 3000 g for 5 min, washed with 1 ml PBS resuspended by gently pipetting in 1 ml of PBS-Tween 20 (0.05% v/v), and pelleted by centrifugation as above. The wash cycle was repeated three times. Aliquots of labeled *H. pylori* (100 µL) were taken from the final suspension and used immediately. Gastric mice tissues were sectioned by Pathologists from Lagos University Teaching Hospital (LUTH). The sections were taken from *Helicobacter*-negative individuals, and the antrum mucosa showed no major pathologic alteration. Tissue sections were deparaffinized in xylene and 2-propanol, rinsed in water followed by PBS, and then incubated for 15 min at room temperature in blocking buffer (0.2% BSA, 0.05% Tween 20 in PBS). The FITC-labeled bacteria were diluted 20-fold in blocking buffer of which aliquots (200 µL) were placed on tissue slides. The slides were incubated for 1 h at room temperature in a humidified chamber in the dark. Slides were subsequently washed three times with PBS prior to microscopic inspection. To analyze the anti-adhesive activity of test plant extract, aliquots (100 µL) of FITC-labeled bacteria were pre-incubated with plant extract (0.1% in blocking buffer) for 2 h at room temperature in the dark. Bacteria were washed

once in blocking buffer before aliquots (200 µL) were added to the gastric sections. After the sections had been carefully rinsed with PBS, FITC-labeled, untreated bacteria were added, and the assay was run as described above.

### 2.3.2. Validation of bacterial adherence

The validation of the bacterial adhesion was performed by fluorescence microscopy using a ranking list from 0, “no bacterial binding” to (25) for “very strong bacterial binding” (the numbers representing bacteria present in all the fields). Five microscopic fields of gastric sections were examined and the number of bacteria present counted. No bacterial binding, shows the efficacy of the extract to inhibit the binding of bacteria to mouse tissues.

## 2.4. RNA expression of gene of adhesion (*babA* and *hopZ*)

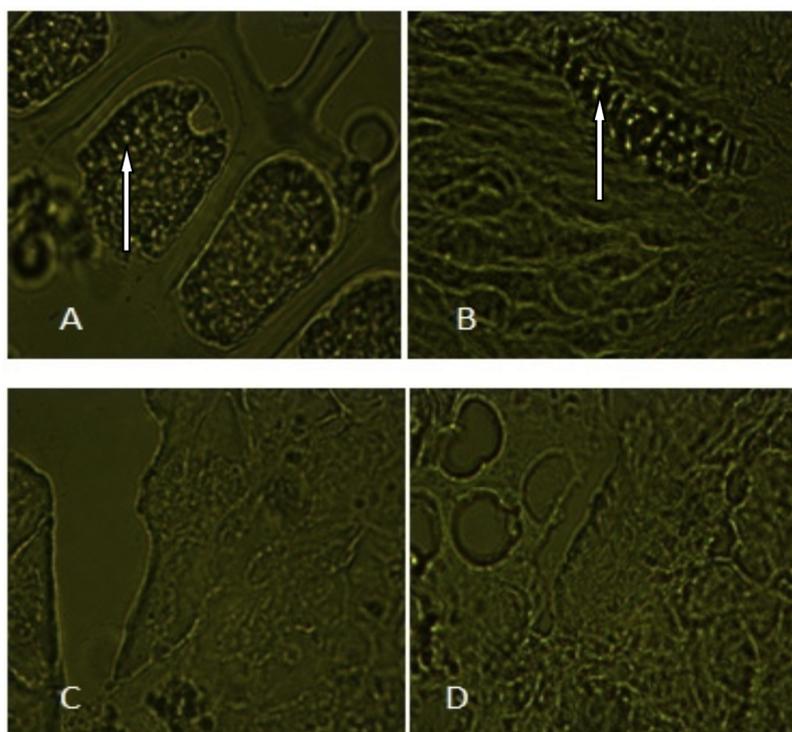
### 2.4.1. Culture and extraction of RNA

*H. pylori* P12 bacterial inoculum having a turbidity comparable to that of a 0.5 McFarland standard ( $1 \times 10^8$  cells/ml) was grown in *Brucella* broth supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in the presence or absence of plant extract for three days at 37 °C on a humidity chamber in a CO<sub>2</sub> incubator. After this period, plant extract (10 mg/ml) was added to the bacteria incubation and vehicle control was also maintained. The plates were incubated at 37 °C under

**Table 4**Effect of 4 h pretreatment with plant extract on the adhesion of FITC-labeled *H. pylori* to sections of mouse gastric tissue.

Plant extracts	Number of bacteria present	Plant extracts	Number of bacteria present
<i>Acanthus montanus</i>	0 ± 0	<i>Garcinia kola</i>	15 ± 2
<i>Ageratum Conyzoides</i>	0 ± 0	<i>Khaya grandifoliola</i>	5 ± 1.73
<i>Alchornea laxiflora</i>	25 ± 3	<i>Khaya grandifoliola Eth 70%</i>	5 ± 1
<i>Allanblackia floribunda</i>	15 ± 3.21	<i>Macaranga hurifolia Eth 70%</i>	1 ± 0.57
<i>Annona muricata</i>	0 ± 0.57	<i>Macaranga hurifolia MeOH</i>	1 ± 1
<i>Anthocleista schweinfurthii</i>	5 ± 1	<i>Mangifera indica</i>	0 ± 0.57
<i>Carica papaya</i>	25 ± 3.61	<i>Milletia versicolor</i>	20 ± 2.52
<i>Citrus aurantifolia</i>	5 ± 1.73	<i>Nicotina tabacum</i>	0 ± 0
<i>Cola acuminata</i>	5 ± 0.57	<i>Ocimum basilicum</i>	5 ± 1
<i>Commelina diffusa</i>	25 ± 2.64	<i>Ocimum gratissimum</i>	1 ± 1
<i>Croton macrostachyus</i>	1 ± 1	<i>Persea americana</i>	5 ± 2.52
<i>Cymbopogon citratus</i>	0 ± 0.57	<i>Phragmantera capitata</i>	5 ± 0.57
<i>Dacryodes edulis</i>	1 ± 0.57	<i>Ptilostigma thonnigii</i>	25 ± 2
<i>Détarium microcapium</i>	0 ± 0	<i>Piper umbellatum</i>	5 ± 2
<i>Draceana deisteliena</i>	6 ± 1.53	<i>Polyscias fulva</i>	5 ± 1
<i>Euphorbia hirta</i>	20 ± 2.08	<i>Psidium guayava</i>	25 ± 2
<i>Elephantopus mollis</i>	15 ± 1.52	<i>Senna alata</i>	20 ± 2.08
<i>Emilia coccinea</i>	1 ± 0.57	<i>Spathodea campanulata</i>	0 ± 0.0
<i>Enantia chlorantha</i>	0 ± 0.57	<i>Spilanthes africana</i>	15 ± 1.73
<i>Entada africana MeOH</i>	5 ± 2	<i>Triumfetta pentandra</i>	1 ± 0.57
<i>Erythrina senegalensis</i>	1 ± 0.57	<i>Vernonia guinensis</i>	5 ± 1
<i>Ficus exasperata</i>	25 ± 2	<i>Voacanga africana</i>	1 ± 1

Each test plant extract of a given concentration was examined at least in two or three independent experiments. Quantification of bacterial adhesion: 0, no bacterium present to 25, bacteria present in all examined field.



**Fig. 1.** Fluorescent microscopy of some representative in situ experiments with FITC-labeled *H. pylori* on mouse gastric tissue.

microaerophilic conditions for 4 h. Total RNA was extracted using silica-gel membrane adsorption for extraction of RNA (DATA SHEET, Jena Bioscience) according to the manufacturer's instruction. Expression of *H. pylori* adhesion molecules was determined by RT-PCR kit. cDNA was synthesized in a thermocycler using one step RT-PCR kit (DATA SHEET, Jena Bioscience) as directed by the manufacturer.

#### 2.4.2. Analysis products

PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2.0% agarose gel containing 0.5 µg/ml of ethidium bromide and gel images were captured. The primer sequences are listed in Table 1.

*babA*, blood group antigen binding adhesion; *hopZ*, *H. pylori* outer membrane protein

#### 2.5. Western blot analysis

*H. pylori* P12 was used in this study. Three day old cultures of the *H. pylori* strain P12 were harvested into *Brucella* medium supplemented with 10% FBS to a McFarland standard of 2. 125 µl of the mixture was added to each well in a 96 well plate. One hundred and twenty five µl of plant extract at the minimum inhibitory concentration (MIC), and two concentrations below the MIC were used for this assay. The plates were

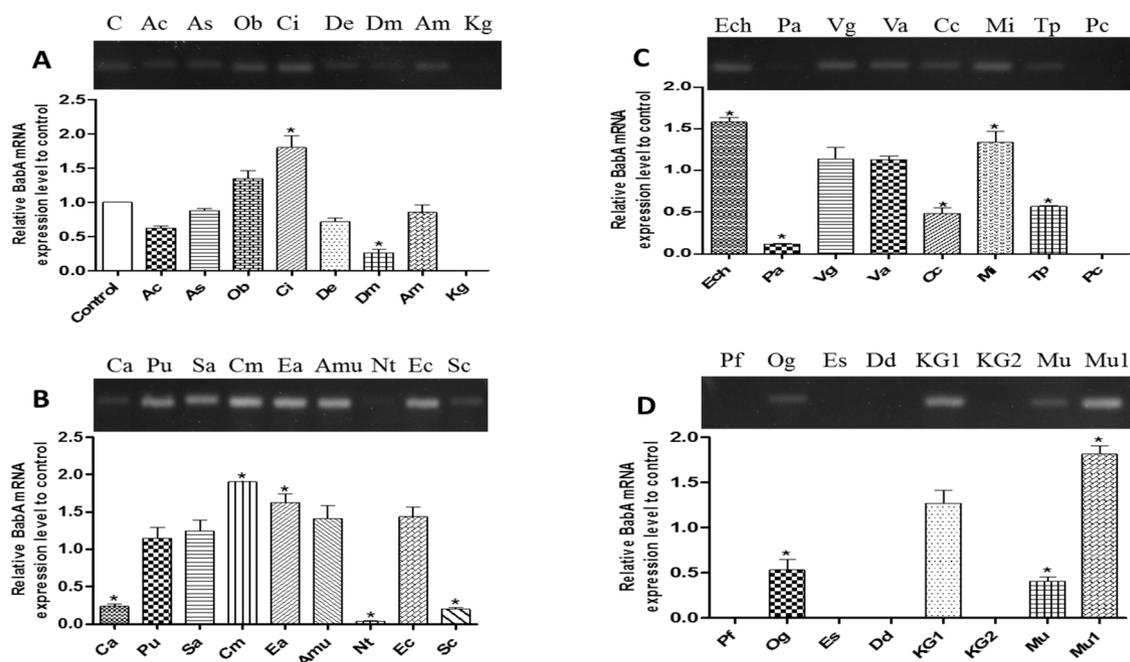


Fig. 2. Plant extract increased mRNA levels of babA gene.

*H. pylori* was treated with one concentration of plant extract (MIC) for 4 h and DMSO was used as loading control. RNA was extracted and relative mRNA expression level of babA was determined by reverse transcriptase-PCR. C: *H. pylori* + DMSO, the image is representative of two independent experiments. (A, B, C, D) effect of plant extract on relative BabA mRNA expression. Values are means  $\pm$  SD of two independent experiments. ANOVA analysis: \*P < 0.05 Values significantly different compared to control group. C: control; Ac: *Ageratum conyzoides*; As: *Anthocleista schweinfurthii*; Ob: *Ocimum basilicum*; De: *Dacryodes edulis*; Dm: *Détarium microcapium*; Am: *Acanthus montanus*; Kg: *Khaya grandifoliola*; Ech: *Enantia chlorantha*; Pa: *Persea americana*; Vg: *Vernonia guinensis*; Va: *Voacanga africana*; Cc: *Cymbopogon citratus*; Mi: *Mangifera indica*; Tp: *Triumfetta pentandra*; Pc: *Phragmantera capitata*; Ca: *Cola acuminata*; Pu: *Piper umbellatum*; Sa: *Spilanthes africana*; Cm: *Croton macrostachyus*; Ea: *Entada africana* MeOH; Amu: *Annona muricata*; Nt: *Nicotina tabacum*; Ec: *Emilia coccinea*; Sc: *Spathodea campanulata*; Pf: *Polyscias fulva*; Og: *Ocimum gratissimum*; Es: *Erythrina senegalensis*; Dd: *Draceana deisteliena*; KG1: *Khaya grandifoliola*; KG2: *Khaya grandifoliola* Eth 70%; Mu: *Macaranga hurifolia* Eth 70%; Mu1: *Macaranga hurifolia* MeOH.

incubated at 37 °C under microaerophilic conditions for 4 h. After incubation, 250  $\mu$ l of the mixture was transferred into a microcentrifuge tube and centrifuged at 14,000 rpm for 5 min at 4 °C. The supernatant was discarded, and the pellet was washed with phosphate buffer saline (PBS). Protein in Laemmli loading buffer was separated by 12% Sodium-Dodecyl-Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and electro-transferred into a Polyvinylidene difluoride paper (PVDF) Blotting Membrane (GE Healthcare, Germany). The membranes were blocked with 5% w/v nonfat milk in Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST: 10 mM TrisHCl; 150 mM NaCl; 0.05% tween-20; pH 7.6); incubated overnight at 4 °C with primary antibodies, rinsed, and then incubated for 1 h at 25 °C with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. The blots were then developed by using developing buffer 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) (Sigma, Germany). Densitometry analysis of the protein bands was performed using ImageJ Software.

## 2.6. Statistical analysis

Data analysis was carried out using the GraphPad Prism 5.03 software. Excel was used to cited all the plants of the survey. For the MIC and bacteria adhesion, the results were expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Regarding gene and protein expression, data were presented as mean  $\pm$  SEM and analyzed by one-way ANOVA using GraphPad Prism 5.0 followed by the Bonferroni's post hoc test whenever significant differences were observed between the variances. Comparisons were made between untreated group and DMSO control groups. Differences between compared groups were considered significant for p < 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Ethnopharmacological survey

A total of 28 traditional physicians (15 males and 13 females) was interviewed in this study. Sixteen were from Bafia (10 males and 6 females), 7 from Bazou (2 males and 5 females) and 5 from Foubot (3 males and 2 females). The age of the traditional physicians ranged 30 to 65 years. Table 2 below presented the botanical name, family, local name, plants parts, administration route and frequency of citation of all collected plants. Forty-one plant species belonging to 27 families were collected from the study area. The largest number of species was noted from family Asteraceae (5 species), followed by Euphorbiaceae (4 species).

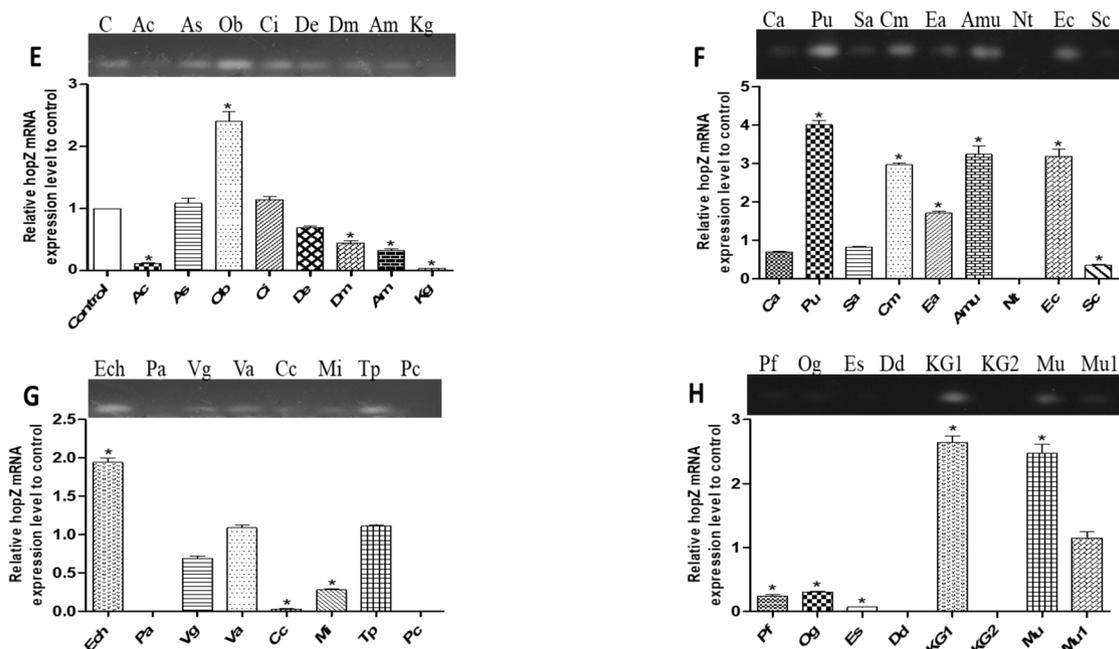
### 3.2. Effect of plant extracts on growth inhibition

The anti-*H. pylori* activities of plant extract, represented by the minimum inhibitory concentration (MIC) are shown in (Table 3). The MIC values of plant extracts ranged from 0.125 to 100 mg/ml. *Spathodea campanulata* and *Nicotina tabacum* have high potential because the MICs were 0.125 and 1 mg/ml respectively.

### 3.3. Adherence of *H. pylori* to sections of mouse stomach tissue

Seventeen plant extracts completely and strongly reduced the adhesion of *H. pylori* (Table 4). Fig. 1 displays characteristic binding with pretreated and none treated *H. pylori* on sections of mouse gastric tissue.

adhesion of non-treated bacteria, (B) adhesion of pretreated bacteria with DMSO, (C, D) adhesion of pretreated bacteria with plant



**Fig. 3.** Plant extract increased mRNA levels of hopZ gene.

*H. pylori* was treated with one concentration of plant extract (MIC) for 4 h and DMSO was used as loading control. RNA was extracted and relative mRNA expression level of *hopZ* was determined by reverse transcriptase-PCR. C: *H. pylori* + DMSO, the image is representative of two independent experiments. (E, F; G, H) effect of plant extract on relative *hopZ* mRNA expression. Values are means  $\pm$  SD of two independent experiments. ANOVA analysis: \* $P < 0.05$  Values significantly different compared to control group. C: control; Ac: *Ageratum conyzoides*; As: *Anthocleista schweinfurthii*; Ob: *Ocimum basilicum*; De: *Dacryodes edulis*; Dm: *Détarium microcapium*; Am: *Acanthus montanus*; Kg: *Khaya grandifoliola*; Ech: *Enantia chlorantha*; Pa: *Persea americana*; Vg: *Vernonia guinensis*; Va: *Voacanga Africana*; Cc: *Cymbopogon citratus*; Mi: *Mangifera indica*; Tp: *Triumfetta pentandra*; Pc: *Phragmantera capitata*; Ca: *Cola acuminata*; Pu: *Piper umbellatum*; Sa: *Spilanthes africana*; Cm: *Croton macrostachyus*; Ea: *Entada africana* MeOH; Amu: *Annona muricata*; Nt: *Nicotina tabacum*; Ec: *Emilia coccinea*; Sc: *Spathodea campanulata*; Pf: *Polyscias fulva*; Og: *Ocimum gratissimum*; Es: *Erythrina senegalensis*; Dd: *Draceana deisteliena*; KG1: *Khaya grandifoliola*; KG2: *Khaya grandifoliola* Eth 70%; Mu: *Macaranga hurifolia* Eth 70%; Mu1: *Macaranga hurifolia* MeOH.

extract. The image is representative of three independent experiments.

### 3.4. Effect of plant extracts on adhesion gene expression

*H. pylori* adhesion to the gastric epithelium is mediated by the adhesin molecules. As demonstrated in the adhesion assay, *H. pylori* adhesion to mouse gastric tissue sections was inhibited by the action of some plant extracts.

Therefore, RT-PCR was performed to determine whether expressions of the adhesion genes was influenced by the plant extract. The levels of the expression of adhesins genes *babA* and *hopZ* (Figs. 2 and 3) on bacterium treated with plant extract were evaluated. Ten plant extracts inhibited *hopZ* expression and five plant extracts inhibited *babA* expression.

### 3.5. Plant extract regulation of BabA and HopZ protein expression

Western blot results revealed that expression of *BabA* and *HopZ* was reduced by some plant extracts treatment. To confirm this binding of bacteria on the mouse gastric tissue sections, we performed western blot to determine whether the protein level of both protein molecules was diminished. As shown in Fig. 4 and 5, exposure of *H. pylori* to the plant extract for 4 h resulted in a marked decrease of *BabA* and *HopZ*-protein level. The molecular weights of the *H. pylori* *BabA* and *HopZ* are 78KDa and 74KDa. Based on the predicted molecular weight, we observed the suppression of both *BabA* and *HopZ* protein synthesis in plant extract treated cells.

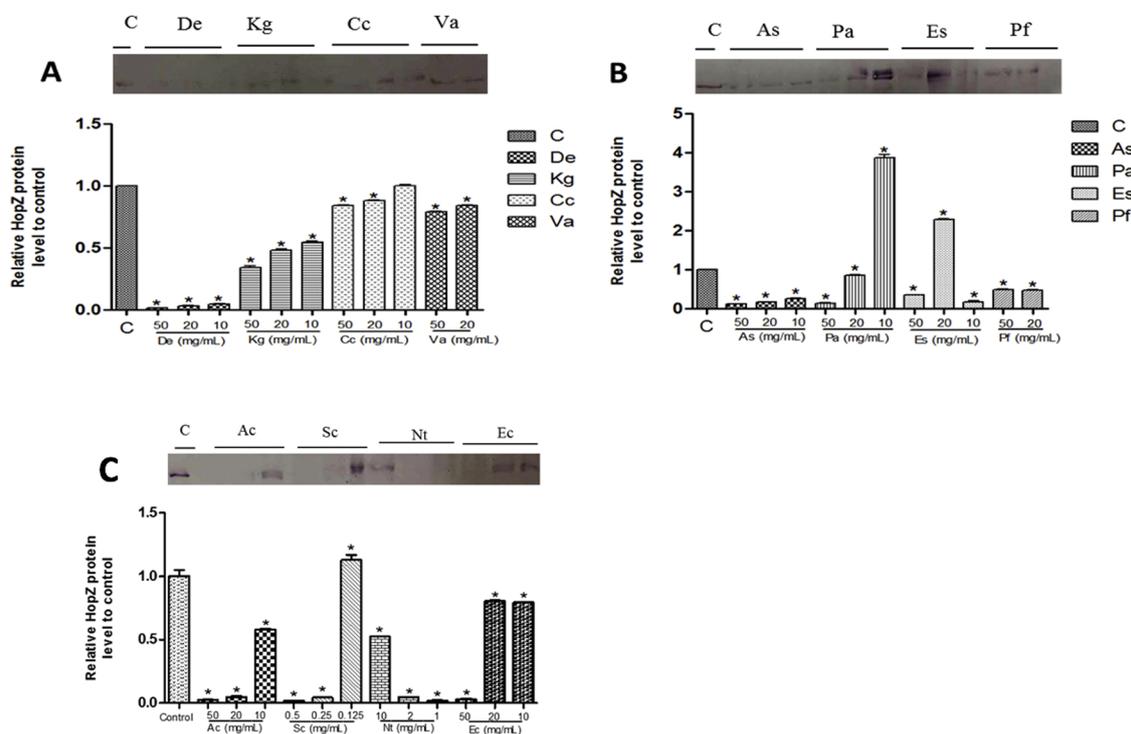
## 4. Discussion

In Cameroon, various studies have shown that plant extracts have *H.*

*pylori* inhibitory effects [19,20,24,25]. These suggest that plants from Cameroonian pharmacopoeia could be potential sources of new bioactive molecules against *H. pylori*. The purpose of this work was to determine the anti *H. pylori* and anti-adhesion effects of some plant extracts from Cameroon. We demonstrated that the extracts of plants of Cameroonian pharmacopoeia exhibited anti-*H. pylori* activity at minimum inhibitory concentrations ranging from 0.125 to 100 mg/ml (Table 3). The screening of the best plant extracts with anti-*H. pylori* and anti-adhesion activities was determined respectively by broth micro-dilution, agar dilution and FITC-label. From this methodology, we found that extracts of *Spathodea campanulata* and *Nicotina tabacum* exhibited higher anti-*H. pylori* activity *in vitro* with MIC values of 0.125 and 1 mg/ml respectively. We also found that seventeen plant extracts totally inhibited *H. pylori* adhesion to the mouse stomach tissue. Similar results were obtained by Zheng et al. [26] who showed ethanolic extract of *Centella asiatica* inhibited *H. pylori* growth at effective concentration of 2 mg/mL.

Similar work was carried out by Ndir et al. [24] on inhibitory activity of plants extracts from *Ageratum conyzoides*, *Acanthus montanus*, *Emilia coccinea* and *Euphorbia hirta* on *H. pylori*. From the results obtained by these authors, the activity of the plant extract *Ageratum conyzoides* was confirmed in the present study. Moreover, this plant extract showed inhibitory activity of gene expression experiments carried out in this study.

The bactericidal activity could be related to the presence of secondary metabolites polyphenolic compounds, flavonoids and tannins in plants [27–29]. Indeed, these groups of metabolites could perform their bactericidal activities by inhibiting proton pumps, protein biosynthesis, peptidoglycan disruption or inhibition of nucleic acid synthesis or function. In addition, the anti-adhesive activity could be due to the presence of polysaccharides, polyphenols, tannins and flavonoids which



**Fig. 4.** Effect of plant extract on *H. pylori* P12 adhesin molecule HopZ.

*H. pylori* was treated with various concentrations of plant extract for 4 h and protein levels of adhesin molecule HopZ were determined. After treatment, total proteins were extracted and expression were determined by western blot. DMSO was used as loading control. Each blot represents one of two independent experiments. (A, B, C) effect of plant on HopZ expression. Densitometry analysis of blot for plant extracts. Values are means  $\pm$  SD of two independent experiments in triplicate. ANOVA analysis: Values significantly different compared to control group ( $P < 0.05$ ). Values significantly different compared to control group. *De*: *Dacryodes edulis*; *Kg*: *Khaya grandifoliola*; *Cc*: *Cymbopogon citratus*; *Va*: *Voacanga Africana*; *As*: *Anthocleista schweinfurthui*; *Pa*: *Persea Americana*; *Es*: *Erythrina senegalensis*; *Pf*: *Polyscias fulva*; *Ac*: *Ageratum conyzoides*; *Sc*: *Spathodea campanulata*; *Nt*: *Nicotina tabacum*; *Ec*: *Emilia coccinea*

have the capacity to mimic the specific receptor form of these adhesions [23,30,31].

After determining the anti-adhesive activity of the plant extracts, the type of adhesin responsible for this activity was investigated. For this purpose, we incubated the plants in the presence of the bacterium, and then the total proteins as well as the total RNAs were extracted to evaluate the gene expression responsible for the biosynthesis of *babA* and *hopZ* adhesins by RT-PCR as well as the expression of *BaBA* and *HopZ* proteins by western blot. Two adhesins were investigated *BaBA* and *HopZ*, we found that some plant extracts used at their MIC displayed strong inhibition of the synthesis of the two adhesins: *Anthocleista schweinfurthui*; *Ageratum conyzoides*, *Spathodea Campanulata* and *Nicotina tabacum*. The strongest inhibition was observed with extracts from *Spathodea Campanulata* and *Nicotina tabacum* which were effective at concentrations of 0.125 mg/ml and 1 mg/ml respectively for *babA* and *hopZ* (Fig. 3) when compared to control. It is important to notice that the results on the inhibition of *H. pylori* growth and anti-adhesion effect of extract match each other regarding *S. campanulata* and *N. tabacum*. These plant extract exhibited low MICs values (0.125 mg/ml and 1 mg/ml, respectively) and strongly inhibited adhesins expressions at the RNA and protein levels. This work provides information on inhibition of *H. pylori* adhesins and further studies need to be done to better understand the action of plant extracts in inhibiting *H. pylori* adhesion to epithelial cells.

In this study, we showed that plant extracts inhibited the growth of *H. pylori* and adherence to mouse stomach sections by inhibiting the expression of RNA and protein adhesion molecules *BabA* and *HopZ*. Our study suggests that these plant extracts could be good candidates for overcoming tolerance of antibiotics for the treatment of *H. pylori* mediated gastric disease.

A drawback of the study is that only organic extracts were used to

screening the efficacy of the plant extracts. Hence, it is possible that more potent phytochemicals present in the plants tested may have been obtained in different solvents used during the extraction process.

## 5. Conclusion

Cameroon plants inhibited *H. pylori* growth and adhesion. Our work has given additional scientific support to the traditional use of these plants in Cameroon to treat *H. pylori* related disorders. *S. campanulata* and *N. tabacum* were the plants presenting the strongest inhibitory effect. To the best of our knowledge, this is the first report showing inhibition of adhesion to gastric mouse tissue by plant extracts from Cameroon.

## Funding

Part of this work was carried out at Nigerian Institute of Medical Research, Nigeria when Ms Ngameko Corinne Raïssa was a visiting scientist supported by International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB, Italy) travel grant [grant number S/CMR16-03].

## Author contributions

CRN, FNN, SIS and PMF defined the research subject and its aims, conceived and designed the experiments. PMF and SIS provided facilities to perform the work. CRN, MF and FBS prepared the plant extracts and performed the experiments. CRN, FBS and PMF analyzed the data and wrote the paper. All the authors read and approved the final version of this manuscript.

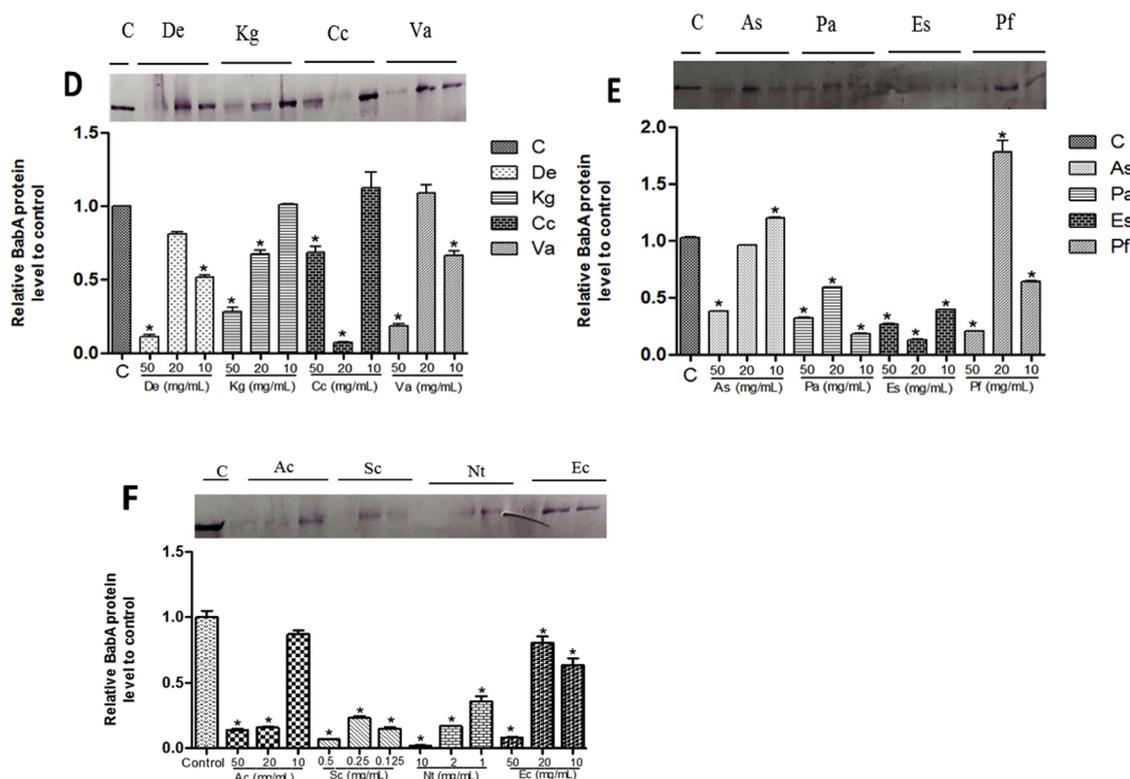


Fig. 5. Effect of plant extract on *H. pylori* P12 adhesin molecules BabA.

*H. pylori* was treated with various concentrations of plant extract for 4 h and protein levels of adhesin molecules BabA were determined. After treatment, total proteins were extracted and BabA expression were determined by western blot. DMSO was used as loading control. Each blot represents one of two independent experiments. (D, E, F) effect of plant on BabA expression. Densitometry analysis of blot for plant extracts. Values are means  $\pm$  SD of two independent experiments in triplicate. ANOVA analysis: Values significantly different compared to control group ( $P < 0.05$ ). Values significantly different compared to control group. De: *Dacryodes edulis*; Kg: *Khaya grandifoliola*; Cc: *Cymbopogon citratus*; Va: *Voacanga Africana*; As: *Anthocleista schweinfurthui*; Pa: *Persea Americana*; Es: *Erythrina senegalensis*; Pf: *Polyscias fulva*; Ac: *Ageratum conyzoides*; Sc: *Spathodea campanulata*; Nt: *Nicotina tabacum*; Ec: *Emilia coccinea*

## Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest

## Acknowledgments

Herbalists in the areas of Bafia (Center region Cameroon), Bazou and Foubot (West region Cameroon) are highly acknowledged for their participation. The authors also acknowledge Nguongoure Ndam Viviane from the University of Yaounde I for providing us with some plant extracts.

## References

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int. J. Cancer* 136 (2015) E359–386, <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- [2] M. Fiorentino, H. Ding, T.G. Blanchard, S.J. Czinn, M.B. Szein, A. Fasano, *Helicobacter pylori*-induced disruption of monolayer permeability and proinflammatory cytokine secretion in polarized human gastric epithelial cells, *Infect. Immun.* 81 (2013) 876–883, <https://doi.org/10.1128/IAI.01406-12>.
- [3] H. Momtaz, N. Souod, H. Dabiri, M. Sarshar, Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples, *World J. Gastroenterol.* WJG. 18 (2012) 2105–2111, <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i17.2105>.
- [4] U. Harrison, M.A. Fowora, A.T. Seriki, E. Loell, S. Mueller, M. Ugo-Ijeh, C.A. Onyekwere, O.A. Lesi, J.A. Otegbayo, A. Akere, D.A. Ndububa, O. Adekanle, E. Anomneze, F.B. Abdulkareem, I.A. Adeleye, A. Crispin, G. Rieder, W. Fischer, S.I. Smith, R. Haas, *Helicobacter pylori* strains from a Nigerian cohort show divergent antibiotic resistance rates and a uniform pathogenicity profile, *PLoS One* 12 (2017) e0176454, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176454>.
- [5] R.N. Ndir, A.E. Malange Takang, J.E.A. Ojongokpoko, H.N. Luma, A. Malongue, J.-F.T.K. Akoachere, L.M. Ndir, M. MacMillan, L.T. Weaver, *Helicobacter pylori* isolates recovered from gastric biopsies of patients with gastro-duodenal pathologies in Cameroon: current status of antibiogram: *helicobacter pylori* in Cameroon, *Trop. Med. Int. Health* 13 (2008) 848–854, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2008.02062.x>.
- [6] S.I. Smith, K.S. Oyedeji, A.O. Arigbabu, C.C. Chibututu, E.E. Anomneze, A.E. Agbakwuru, D.A. Ndububa, A.O. Coker, Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with gastritis and peptic ulcer in western Nigeria, *Br. J. Biomed. Sci.* 58 (2001) 97–100.
- [7] M. Amin, F. Anwar, F. Naz, T. Mehmood, N. Saari, Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibition activities of some traditional medicinal plants, *Mol. Basel Switz.* 18 (2013) 2135–2149, <https://doi.org/10.3390/molecules18022135>.
- [8] F.A. Andoulo, D. Noah Noah, M. Tagni-Sartre, E.C. Ndjitoyap, K. Ngu Blackett, Epidémiologie de l'infection à *Helicobacter pylori* à Yaoundé: de la particularité à l'énigme Africaine, *Pan Afr. Med. J.* 16 (2013), <https://doi.org/10.11604/pamj.2013.16.115.3007>.
- [9] M. Kivi, Y. Tindberg, *Helicobacter pylori* occurrence and transmission: a family affair? *Scand. J. Infect. Dis.* 38 (2006) 407–417, <https://doi.org/10.1080/00365540600585131>.
- [10] A. Walz, S. Odenbreit, J. Mahdavi, T. Borén, S. Ruhl, Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays, *Glycobiology.* 15 (2005) 700–708, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwi049>.
- [11] N. Hage, J.G. Renshaw, G.S. Winkler, P. Gellert, S. Stolnik, F.H. Falcone, Improved expression and purification of the *Helicobacter pylori* adhesin BabA through the incorporation of a hexa-lysine tag, *Protein Expr. Purif.* 106 (2015) 25–30, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.10.009>.
- [12] J.C. Atherton, P. Cao, R.M. Peek, M.K. Tummuru, M.J. Blaser, T.L. Cover, Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 17771–17777.
- [13] N.S. Akopyants, S.W. Clifton, D. Kersulyte, J.E. Crabtree, B.E. Youree, C.A. Reece, N.O. Bukanov, E.S. Drazek, B.A. Roe, D.E. Berg, Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, *Mol. Microbiol.* 28 (1998) 37–53.
- [14] J.-C. Yang, Treatment of *Helicobacter pylori* infection: current status and future concepts, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 5283, <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5283>.
- [15] M. Safavi, M. Shams-Ardakani, A. Foroumadi, Medicinal plants in the treatment of *Helicobacter pylori* infections, *Pharm. Biol.* 53 (2015) 939–960, <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.952837>.
- [16] D.M. Al-Eraky, O.M. Helmy, Y.M. Ragab, Z. Abdul-Khalek, E.A. El-Seidi,

- M.A. Ramadan, Prevalence of CagA and antimicrobial sensitivity of H. Pylori isolates of patients with gastric cancer in Egypt, *Infect. Agent. Cancer.* 13 (2018), <https://doi.org/10.1186/s13027-018-0198-1>.
- [17] M. Kiranmai, U. Sri, B.M. Ibrahim, M. Kumar, Antioxidant activity and total flavonoids content of different parts of *Azadirachta indica* A. Juss, *J. Med. Plants Res.* 6 (2012) 5737–5742, <https://doi.org/10.5897/JMPR12.766>.
- [18] B.V. Bonifácio, M.A. dos Santos Ramos, P.B. da Silva, T.M. Bauab, Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 13 (2014), <https://doi.org/10.1186/s12941-014-0054-0>.
- [19] P.V. Tan, M. Boda, B. Sonke, F.-X. Etoa, B. Nyasse, Susceptibility of *Helicobacter* and *Campylobacter* to crude extracts prepared from plants used in Cameroonian folk medicine, *Pharmacologyonline.* 3 (2006) 877–891.
- [20] L. Brigitte Kouitcheu Mabeku, B. Eyoum Bille, E. Nguépi, In Vitro and in Vivo Anti-*Helicobacter* Activities of *Eryngium foetidum* (Apiaceae), *Bidens pilosa* (Asteraceae), and *Galinsoga ciliata* (Asteraceae) against *Helicobacter pylori*, *Biomed Res. Int.* 2016 (2016), <https://doi.org/10.1155/2016/2171032>.
- [21] N. Tharmalingam, S.-H. Kim, M. Park, H.J. Woo, H.W. Kim, J.Y. Yang, K.-J. Rhee, J.B. Kim, Inhibitory effect of piperine on *Helicobacter pylori* growth and adhesion to gastric adenocarcinoma cells, *Infect. Agent. Cancer.* 9 (2014) 43.
- [22] D. Sgouras, P. Maragkoudakis, K. Petraki, B. Martinez-Gonzalez, E. Eriotou, S. Michopoulos, G. Kalantzopoulos, E. Tsakalidou, A. Mentis, In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain shirota, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 518–526, <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.518-526.2004>.
- [23] C. Lengsfeld, F. Titgemeyer, G. Faller, A. Hensel, Glycosylated compounds from okra inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 1495–1503, <https://doi.org/10.1021/jf030666n>.
- [24] R.N. Ndip, A.E. Malange Tarkang, S.M. Mbulah, H.N. Luma, A. Malongue, L.M. Ndip, K. Nyongbela, C. Wirmum, S.M.N. Efang, In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon, *J. Ethnopharmacol.* 114 (2007) 452–457, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.037>.
- [25] C. Njume, A. Afolayan, R. Ndip, An overview of antimicrobial resistance and the future of medicinal plants in the treatment of *Helicobacter pylori* infections, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 3 (2010) 685–699.
- [26] H.-M. Zheng, M.-J. Choi, J.M. Kim, K.W. Lee, Y.H. Park, D.H. Lee, In vitro and In vivo Anti-*Helicobacter pylori* Activities of *Centella asiatica* Leaf Extract, *Prev. Nutr. Food Sci.* 21 (2016) 197–201, <https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.3.197>.
- [27] J.-E. Shin, J.-M. Kim, E.-A. Bae, Y.-J. Hyun, D.-H. Kim, In vitro inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*, *Planta Med.* 71 (2005) 197–201, <https://doi.org/10.1055/s-2005-837816>.
- [28] K. Funatogawa, S. Hayashi, H. Shimomura, T. Yoshida, T. Hatano, H. Ito, Y. Hirai, Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*, *Microbiol. Immunol.* 48 (2004) 251–261.
- [29] B. Kaur, P.P. Balgir, B. Kumar, N. Garg, *Helicobacter pylori* infection: efficacy of probiotics and role of genome wide association studies, *Arch. Clin. Microbiol.* 1 (2010).
- [30] N. de Klerk, L. Maudsdotter, H. Gebreegziabher, S.D. Saroj, B. Eriksson, O.S. Eriksson, S. Roos, S. Lindén, H. Sjölander, A.-B. Jonsson, *Lactobacilli* reduce *Helicobacter pylori* attachment to host gastric epithelial cells by inhibiting adhesion gene expression, *Infect. Immun.* 84 (2016) 1526–1535, <https://doi.org/10.1128/IAI.00163-16>.
- [31] C. Thöle, S. Brandt, N. Ahmed, A. Hensel, Acetylated rhamnolacturonans from immature fruits of *Abelmoschus esculentus* inhibit the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric cells by interaction with outer membrane proteins, *Molecules* 20 (2015) 16770–16787, <https://doi.org/10.3390/molecules200916770>.

Article

# New Insights into Bioactive Compounds from the Medicinal Plant *Spathodea campanulata* P. Beauv. and Their Activity against *Helicobacter pylori*

Corinne Raïssa Ngnamoko <sup>1,2</sup>, Lucia Marchetti <sup>1,3</sup> , Barbara Zambelli <sup>4</sup> , Antonio Quotadamo <sup>1,3</sup>, Davide Roncarati <sup>4</sup> , Davide Bertelli <sup>1</sup>, Frederic Nico Njyou <sup>2</sup>, Stella I. Smith <sup>5</sup>, Paul F. Moundipa <sup>2,\*</sup>, Maria Paola Costi <sup>1</sup>  and Federica Pellati <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Via G. Campi 103, 41125 Modena, Italy; corinnengnameko@yahoo.fr (C.R.N.); lucia.marchetti@unimore.it (L.M.); antonio.quotadamo@unimore.it (A.Q.); davide.bertelli@unimore.it (D.B.); mariapaola.costi@unimore.it (M.P.C.)

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Science, The University of Yaounde I, P. Box 812 Yaounde, Cameroon; njyou@yahoo.com

<sup>3</sup> Doctorate School in Clinical and Experimental Medicine (CEM), University of Modena and Reggio Emilia, 41125 Modena, Italy

<sup>4</sup> Department of Pharmacy and Biotechnology, Alma Mater Studiorum University of Bologna, Viale Fanin 44, 40127 Bologna, Italy; barbara.zambelli@unibo.it (B.Z.); davide.roncarati@unibo.it (D.R.)

<sup>5</sup> Nigerian Institute of Medical Research, PMB 2013, Yaba, Lagos 100001, Nigeria; stellaismith@yahoo.com

\* Correspondence: pmoundipa@hotmail.com (P.F.M.); federica.pellati@unimore.it (F.P.); Tel.: +237-222-314-527 (P.F.M.); +39-059-2058565 (F.P.)

Received: 21 March 2020; Accepted: 13 May 2020; Published: 15 May 2020



**Abstract:** The medicinal plant *Spathodea campanulata* P. Beauv. (Bignoniaceae) has been traditionally applied for the prevention and treatment of diseases of the kidney and urinary system, the skin, the gastrointestinal tract, and inflammation in general. The present work shows for the first time how chemical components from this plant inhibit *Helicobacter pylori* growth by urease inhibition and modulation of virulence factors. The crude extract and the main fractions of *S. campanulata* bark were tested on *H. pylori* isolated strains and the active ones were further fractionated. Fractions and sub-fractions of the plant crude extract were characterized by ultra-high-performance liquid chromatographic tandem high resolution-mass spectrometry detection (UHPLC-HRMS). Several phenolics and triterpenoids were identified. Among the sub-fractions obtained, SB2 showed the capacity to inhibit *H. pylori* urease in a heterologous bacterial model. One additional sub-fraction (SE3) was able to simultaneously modulate the expression of two adhesins (HopZ and BabA) and one cytotoxin (CagA). The flavonol kaempferol was identified as the most interesting compound that deserves further investigation as a new hit for its capacity to modulate *H. pylori* virulence factors.

**Keywords:** *Spathodea campanulata*; phenolics; UHPLC-MS; *Helicobacter pylori*; urease; adhesins; cytotoxins

## 1. Introduction

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a Gram-negative bacterium that persistently colonizes the stomach of more than half the human population and its prevalence is significantly higher in the developing countries [1,2]. It causes gastric inflammation, gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, and cancer. Due to its role in cancer, it was listed as a class I carcinogen by the World Health Organization (WHO) in 1994 [3].

Several meta-analyses have pointed out that the mass eradication of *H. pylori* would have beneficial effects, such as reduction in gastric cancer incidence, peptic ulcer development, dyspepsia symptoms, and anemia occurrence. Nonetheless, the efficacy of current treatments remains a major concern. The medical therapy for *H. pylori* still relies on a combination of antibiotics and anti-secretory agents, e.g., proton pump inhibitors (PPIs) [4]. However, several studies have described high resistance to antibiotic treatment [5–7]. Indeed, in 2017 WHO included *H. pylori* in the list of antibiotic resistant bacterium for which the identification and development of new antimicrobial drugs represent a global priority [8].

To grow in the gastric acid medium *H. pylori* takes advantage of the Ni(II)-dependent urease enzyme, which catalyzes the hydrolysis of urea to produce ammonia and carbamate, the latter subsequently decomposes to ammonia and bicarbonate. The effect of this process is the increase of the medium pH, hence making the environment comfortable for *H. pylori* colonization, despite the harsh acidic conditions of the stomach [9,10]. Urease is therefore a target for the development of alternative and specific antibacterial strategies to overcome *H. pylori* gastric infection.

*H. pylori* uses adhesins to bind and enter to the gastric mucosa. Adhesins are cell-surface proteins that enable bacterial adherence to cells. *H. pylori* major adhesive factors, which belong to the largest outer membrane protein (OMP) family, include blood group antigen-binding adhesion (BabA), sialic acid-binding adhesion (SabA), *H. pylori* outer membrane protein (HopZ), adherence-associated lipoprotein A and B (AlpA-B), *H. pylori* adhesin A (HpaA) and Lewis<sup>x</sup>-LPS. *H. pylori* adhesins are considered bacterial virulence factors and they are involved in several processes during the early and chronic phases of the infection. The most studied virulence factors of *H. pylori* are cytotoxin-associated protein A (CagA) and vacuolating cytotoxin A (VacA) [11,12]. CagA is able to initiate in host cells NF- $\kappa$ B, MAPK, and SHP-2/ERK pathways, producing inflammatory factors and pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ). These substances may cause extensive infection sites and inflammation, leading to gastritis or gastric cancer [11,12].

The capacity to inhibit the growth of this bacterium has been ascribed to a variety of medicinal plants and natural compounds [13,14]. However, only a few papers have described the mechanisms of action of natural products against *H. pylori* [13,14]. In general, these mechanisms include urease activity inhibition, anti-adhesion activity, DNA damage, protein synthesis inhibition, and oxidative stress [15–17].

*Spathodea campanulata* P. Beauv. (Bignoniaceae) is a medicinal plant traditionally used in Africa for the prevention and treatment of diseases of the kidney and urinary systems, the skin, the gastrointestinal tract, and inflammation in general [18,19]. Extracts of this plant have been found to be active against proliferative diseases, involving cancer cells and bacteria [20]. More recently, anti-*H. pylori*, anti-adhesive, and growth inhibitory activities of a methylene chloride (DCM)/methanol (MeOH) extract from the bark of the plant have been described [21]. Data about the chemical characterization of *S. campanulata* are limited. Nevertheless, previous studies undertaken on the stem bark and leaves have shown the presence of phenolic acids, flavonoids, triterpenoids, iridoids, and sterols [22–27].

Consequently, this is the first chemical characterization study of the main compounds present in the extracts, fractions and sub-fractions of *S. campanulata* bark using UHPLC-HRMS, which were also assessed for their anti-*H. pylori*, anti-urease, and anti-adhesins effects.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals and Solvents

Analytical grade solvents, HPLC grade solvents and ammonium formate were from Sigma–Aldrich (Milan, Italy). Ultrapure water (H<sub>2</sub>O) was obtained from a Millipore water purification system (Merck Life Science, Milan, Italy). Pre-coated aluminum Kieselgel 60 F<sub>254</sub> plates (layer thickness 0.2 mm, Merck, Darmstadt, Germany) were used for analytical thin-layer chromatography (TLC).

## 2.2. Plant Material and Preparation of the Crude Extract

The bark from *S. campanulata* was collected in July 2018 in Foumbot (West Region, Cameroon). A sample of the bark was deposited at the HNC-Cameroon National Herbarium, with the voucher number 50085/HNC. The bark used in this study was harvested from at least three different trees, in order to have a representative sample. The plant material was washed with H<sub>2</sub>O and dried at room temperature for several weeks. The dried plant material was then powdered using a grinder. The obtained powder was kept at 4 °C until the preparation of the extracts. A portion of 500 g of powdered plant material was soaked in 2 L of solvent solution composed by DCM/MeOH (1:1, *v/v*) for 48 h and paper filtered. The filtrate was dried using a rotary evaporator to obtain the crude extract.

## 2.3. Fractionation Procedure

The crude extract was purified on silica gel by preparative flash column chromatography using in sequence *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), and MeOH. Eight stages of polarity were used: Hex (fraction A), Hex/EtOAc 25% (fraction B), Hex/EtOAc 50% (fraction C), Hex/EtOAc 75% (fraction D), EtOAc (fraction E), and MeOH (fraction F). The fractions were further partitioned using a silica gel column chromatography with an Isolera apparatus (Biotage, Charlotte, NC, USA) with different solvents, according to the result of TLC. In this way, different sub-fractions were collected: SA1 (90% Cyhex/EtOAc) from fraction A, SB1 and SB2 (70% Cyhex/EtOAc and 90% Cyhex/EtOAc, respectively) from fraction B, SC1 and SC2 (95% DCM/MeOH) from fraction C, SD1 and SD2 (20% Cyhex/EtOAc) from fraction D, SE1 and SE3 (50% MeOH/H<sub>2</sub>O and 70% MeOH/H<sub>2</sub>O, respectively) from fraction E, and SF (80% Cyhex/EtOAc) from fraction F. The solvent was removed from the collected fractions and sub-fractions by using a rotary evaporator.

## 2.4. Determination of Total Polyphenols and Total Flavonoids

For the determination of total polyphenols and total flavonoids, the crude extract and its fractions were dissolved in MeOH at a concentration of 100 µg/mL. The content of total polyphenols was analyzed according to the Folin–Ciocalteu's method, as previously described [28]. Briefly, 50 µL of sample was added to a solution composed of 2.4 mL of distilled water, 200 µL of Folin–Ciocalteu's reagent (2 N), and 500 µL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%. The reaction mixture was incubated at 25 °C in dark for 1 h, and the absorbance was read at 765 nm. The results were compared to a gallic acid calibration curve, and the total phenolic content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of extract.

The total flavonoid content was analyzed according to the aluminum chloride method [28]. Briefly, 50 µL of sample was mixed with 0.95 mL of MeOH and 1.0 mL of AlCl<sub>3</sub> (2%). The reaction mixture was incubated at 25 °C for 30 min, and the absorbance was read at 420 nm. The results were compared to quercetin calibration curve and the total flavonoids content was expressed as milligrams of quercetin equivalents (QE) per gram of extract.

## 2.5. UHPLC-HRMS Analysis

For UHPLC-HRMS analysis, 2 mg of each fraction and sub-fraction obtained from the crude plant extract were dissolved in 1.0 mL of acetonitrile (ACN), filtered using a PTFE filter, and vortex mixed for 20 s, spun at 5000 g for 5 min. Then, 5 µL of this solution were injected in duplicate, for the analysis. A Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC system was used, equipped with an autosampler, a quaternary pump and a thermostated column compartment controlled by the Chromeleon 7.2 Software (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The UHPLC system was coupled to a high-resolution Q Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany). The mass spectrometer was calibrated before the analyses. Nitrogen (N<sub>2</sub>) (purity > 99.999%), obtained from a Zefiro zero 60 LC-MS nitrogen generator (CINEL, Vigonza, Italy), was employed both as the source gas and the collision gas. The chromatographic system was hyphenated to the MS with an electrospray ionization (ESI) source,

which was operated both in the positive and in the negative ion modes. The capillary temperature was set at 270 °C and the following N<sub>2</sub> flows (arbitrary units) were used: sheat gas 40, auxiliary gas 30, and sweep gas 3. The capillary voltage was set at −3.5 and +3 kV. The chromatographic separation was performed on an Ascentis Express C<sub>18</sub> (10 cm × 2.1 mm i.d., 2.7 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The column was kept at 25 °C. The mobile phase was composed of 80% H<sub>2</sub>O + 0.1% formic acid (FA) (A) and 20% ACN (B) at 0.3 mL/min. The following gradient was used: from 0.1 to 10.1 min from 20% to 98% B, which was kept constant for 8.8 min, before the reconditioning step, for a total analysis time of 25 min.

MS and MS<sup>2</sup> spectra were recorded from 100 to 1000 *m/z*, at a resolution of 70,000 and 17,500, respectively. The three most intense ions were selected for MS<sup>2</sup> N<sub>2</sub>-promoted collision-induced dissociation (CID) (stepped CE = 20, 28 eV). A precursor active exclusion of 6 s was set. In parallel, an all ion fragmentation experiment (CE = 28 eV) was scheduled for post-hoc analysis. The mass calibration was performed weekly, both in the negative and in the positive ion modes, to ensure a mass accuracy ≤ 2 ppm. XCalibur 2.9 (Thermo Scientific, Bremen, Germany) and FreeStyle 1.3 software (Thermo Scientific, San José, CA, USA) were used for UHPLC control and MS data processing, respectively.

## 2.6. Antimicrobial Disk Diffusion Test

*H. pylori* strain G27 was obtained from the University of Bologna, Italy. *H. pylori* cells were recovered from glycerol stocks on Brucella broth agar plates, containing 5% fetal calf serum (FCS), added with Dent's antibiotic supplement in an atmosphere of 9% CO<sub>2</sub>/91% air, maintained at 37 °C, and 95% humidity in water-jacketed incubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All reagents were purchased from Oxoid, United Kingdom. The assay was carried out following the method described by Balouiri et al. [29]. *H. pylori* cells were collected from Brucella broth agar plates, suspended in 500 μL of liquid Brucella broth with 5% Dent's antibiotic supplement and subsequently the cell density (OD<sub>600</sub>) of bacterial suspension was determined. Then, *H. pylori* cells were diluted in melted Brucella broth Soft Agar medium (Brucella broth agar plates containing 0.5% agar) to obtain a final OD<sub>600</sub> of 0.07 and 6.5 mL of this suspension was poured into a sterile standard Brucella broth agar plate. After that, 5 mm sterile paper disks were deposited into the agar. A total of 4 μL of the crude extract, fractions, and sub-fractions (10 mg/mL), prepared using DMSO/H<sub>2</sub>O (25% v/v), were dropped into the disk. The DMSO/H<sub>2</sub>O solution was used as the negative control. Kanamycin (10 μg) was used as the reference antibiotic. The plates were incubated under microaerophilic conditions at 37 °C for 72 h. The products that showed a diameter of inhibition ≥ 8 mm were considered to be active [29]. The active products were serially diluted using sterile DMSO/H<sub>2</sub>O (25% v/v) to obtain three decreasing concentrations, which were re-tested in triplicate and the results expressed as a mean diameter of inhibition zone. The minimum active quantity (MAQ) for each extract was determined as the minimum quantity that produced an inhibition zone ≤ 8 mm.

## 2.7. In-Cell Urease Activity Test

*Escherichia coli* TOP10 cells harboring pGEM-ureOP plasmid were pre-cultured at 37 °C in 1 mL of lysogeny broth (LB), containing 100 μg/mL of ampicillin (Ap). After 16 h, 40 μL of pre-culture were used to inoculate 2 mL of LB medium containing 100 μg/mL of Ap and 10 μg/L of cresol red pH indicator. When OD<sub>600</sub> reached 0.7–0.9, 90 μL of each culture was inoculated in 96-well plates with 80 mM urea, with and without 10 μL of different concentrations of either the fractions or the sub-fractions of the plant extract or DMSO. Immediately before running the experiment, 2.5 μL of 10 mM NiSO<sub>4</sub> was added to each culture to a final concentration of 250 μM. In each well, 30 μL of mineral oil was added to prevent the medium evaporation during the culture. The color change of cresol red indicator was monitored over time spectrophotometrically in a multi-plate reader, measuring the absorption at 430 and 580 nm.

## 2.8. Western Blot Analysis

Three days old cultures of the *H. pylori* G27 strain were harvested into Brucella broth medium supplemented with 10% FBS to 0.8 OD600. Then, 100  $\mu$ L of the mixture was added to each well in a 96-well plate. A total of 100  $\mu$ L of the plant extract at the three concentrations was used. The plates were incubated at 37 °C under microaerophilic conditions for 4 h. After incubation, 200  $\mu$ L of the mixture was transferred into a microcentrifuge tube and centrifuged at 14,000 rpm for 5 min at 4 °C. The supernatant was discarded, and the pellet was washed with phosphate buffer saline (PBS). Protein in Laemmli loading buffer was separated by 12% sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electro-transferred into a polyvinylidene difluoride paper (PVDF) blotting membrane (GE Healthcare, Germany). The membranes were blocked with 5% w/v non-fat milk in phosphate buffered saline Tween-20, incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (BabA, CagA, HopZ, and HP1043 as the loading control), rinsed, and then incubated for 1 h at 25 °C with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. The blots were then developed by using a chemiluminescent method (Sigma, Germany). The densitometric analysis of the protein bands was performed using the ImageJ Software (NIH, USA).

## 2.9. Statistical Analysis

Data analysis was carried out using the GraphPad Prism 5.0 software. For the diameter of inhibition, the results were reported as mean  $\pm$  standard deviation (SD). For the IC<sub>50</sub> of urease and adhesion, the results were expressed as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Regarding protein expression, data were presented as mean  $\pm$  SD. Comparisons were made between untreated group and DMSO control groups.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Chemical Composition of *S. campanulata* Fractions and Sub-Fractions

To identify new anti-*H. pylori* growth inhibitors, we first tested fractions and sub-fractions of bark of *S. campanulata* against the bacterium and then we focused on the urease enzyme and adhesin proteins involved in adhesion to gastric mucosa.

After the extraction of the plant material, its fractionation and further sub-fractionation were performed by means of preparative flash column chromatography. Six fractions were obtained, which were further sub-fractioned using silica gel column chromatography to provide 10 sub-fractions. The content of total polyphenols and total flavonoids in the crude plant extract and in the six fractions is shown in Table 1.

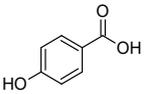
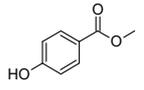
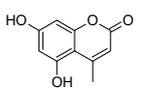
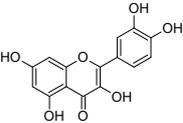
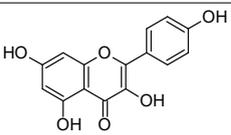
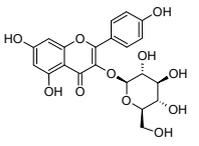
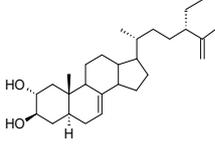
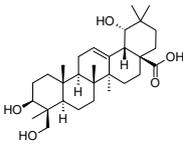
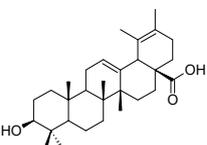
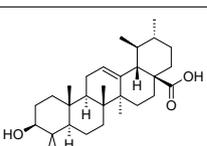
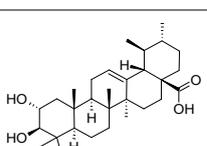
**Table 1.** Total polyphenols and total flavonoids content in *Spathodea campanulata* crude extract and fractions (A–F).

Total Polyphenols (mg GAE/g) <sup>a</sup>						
Crude extract	A	B	C	D	E	F
51.4 <sup>b</sup>	46.4 $\pm$ 0.5	43.0 $\pm$ 0.1	53.0 <sup>b</sup>	48.3 <sup>b</sup>	68.8 $\pm$ 0.3	56.3 $\pm$ 1.1
Total Flavonoids (mg QE/g) <sup>a</sup>						
Crude extract	A	B	C	D	E	F
5.2 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.1	1.8 <sup>b</sup>	1.9 <sup>b</sup>	2.0 <sup>b</sup>	7.1 <sup>b</sup>	1.9 $\pm$ 0.1

<sup>a</sup> Data of total polyphenols are expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/g; data of total flavonoids as mg of quercetin equivalents (QE)/g ( $\pm$  SD). <sup>b</sup> SD < 0.05.

MS and MS/MS data of all the identified compounds are shown in Table S1. The chemical structure of the 11 characterized compounds, which was confirmed by comparison with existing structures [22–27,30], is shown in Table 2. Compound 5,7-dihydroxy-4-metilcoumarin was detected in this plant for the first time, through the mass spectral database mzCloud.

**Table 2.** Chemical structures of the identified compounds and their distribution in the active fractions and sub-fractions of *Spathodea campanulata*.

Compound	Structure	Fraction/Sub-Fraction							
		C	E	SA1	SB1	SC2	SD2	SE1	SE3
4-Hydroxy Benzoic Acid		■				■			
Methyl-4-Hydroxybenzoate			■		■				
5,7-Dihydroxy-4-Metilcoumarin		■	■			■			
Quercetin		■							
Kaempferol		■	■			■			■
Kaempferol 3-O-Glucoside			■					■	
Spathodol			■						
Spathodic Acid			■						
Tomentosolic Acid			■		■				
Ursolic Acid			■		■		■		
Corosolic Acid					■				

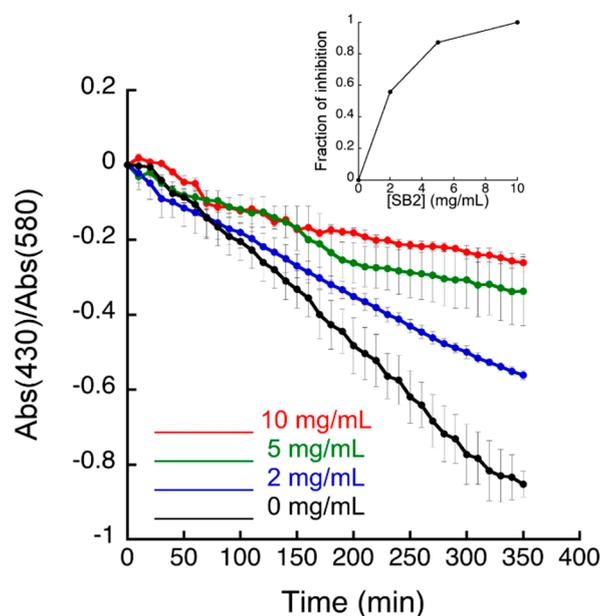
### 3.2. Inhibitory Activity of *S. campanulata* Fractions and Sub-Fractions against *H. pylori*

The inhibitory activity on *H. pylori* of all the fractions and sub-fractions is shown in Table 3. The minimum active quantity (MAQ) values ranged from 0.1 mg to 10 mg/mL. The lowest MAQ value of 0.1 mg/mL was obtained with fractions B, C, and E and sub-fractions SA1 and SB1 on *H. pylori*.

**Table 3.** Mean diameter of inhibition (mm  $\pm$  SD) and minimum active quantity (MAQ) values (mg/mL) of *Spathodea campanulata* crude plant extract, active fractions and sub-fractions against *Helicobacter pylori*.

Sample.	Concentration			
	0.1 mg/mL	1.0 mg/mL	10.0 mg/mL	MAQ (mg/mL)
Crude extract	ND	8.6 $\pm$ 0.8	11.6 $\pm$ 0.7	1.0
B	11.3 $\pm$ 1.2	11.7 $\pm$ 2.1	12.1 $\pm$ 1.0	0.1
C	10.0	12.0	16.3 $\pm$ 2.5	0.1
E	10.0	11.7 $\pm$ 0.6	15.8 $\pm$ 0.3	0.1
SA1	9.8 $\pm$ 0.4	10.0 $\pm$ 1.0	10.7 $\pm$ 1.2	0.1
SB1	9.3 $\pm$ 0.6	9.7 $\pm$ 0.6	10.7 $\pm$ 0.6	0.1
SB2	ND	8.7 $\pm$ 2.3	11.3 $\pm$ 2.5	1.0
SC2	ND	8.0	10.0	1.0
SD1	ND	ND	10.3 $\pm$ 0.6	10.0
SE3	ND	ND	13.0 $\pm$ 1.0	10.0
SF	ND	9.3 $\pm$ 1.2	10.7 $\pm$ 0.6	1.0
Kanamycin (2.5 mg/mL)	35.7 $\pm$ 0.6	-	-	-

The measurement of the cellular urease activity was performed in a heterologous *E. coli* bacterial model overexpressing the enzyme (Figure 1, Figures S1–S3), as previously described [31].

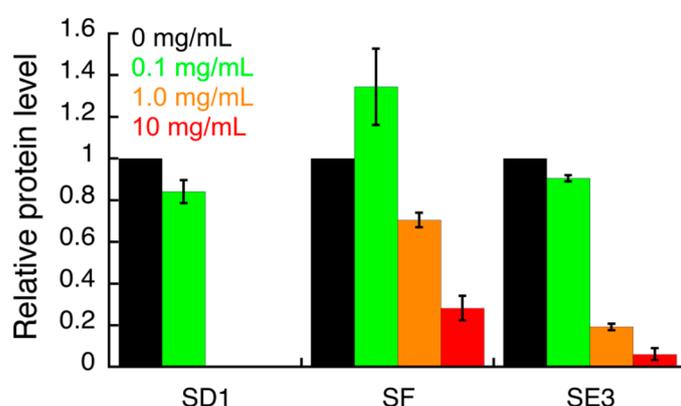


**Figure 1.** Urease activity of recombinant *Escherichia coli* cells in the presence of 250  $\mu$ M Ni(II) and of 80 mM urea, measured as a change of pH detected by the cresol red indicator. Increasing concentrations of the sub-fraction SB2 were added to the *E. coli* culture before performing the colorimetric assay. Data are shown as mean  $\pm$  SD of the triplicates. The insert represents the dose-response plot for the SB2 sub-fraction. Sub-fraction SB2 (90% Cyhex/EtOAc) was obtained from fraction B.

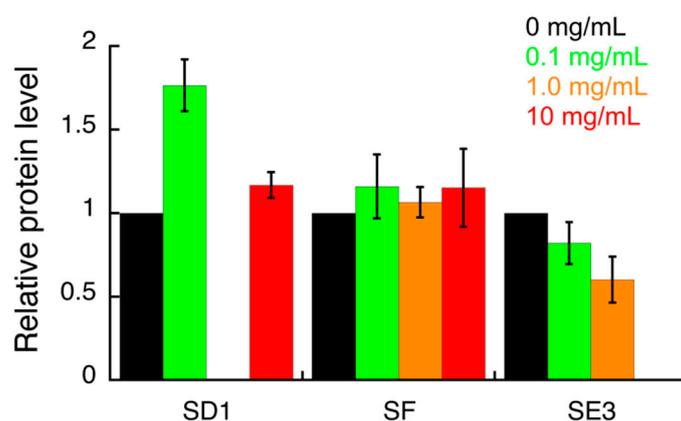
The results indicated that sub-fractions SD2, SE1 and SE3 produced minor urease inhibition (Figures S1–S3), while the sub-fraction SB2 inhibited urease in living bacteria with an  $IC_{50}$  value of 3.3 mg/mL (Figure 1). All the other fractions showed either low solubility or limited activity.

### 3.3. Effect of *S. campanulata* Fractions and Sub-Fractions on *H. pylori* Virulence Factors

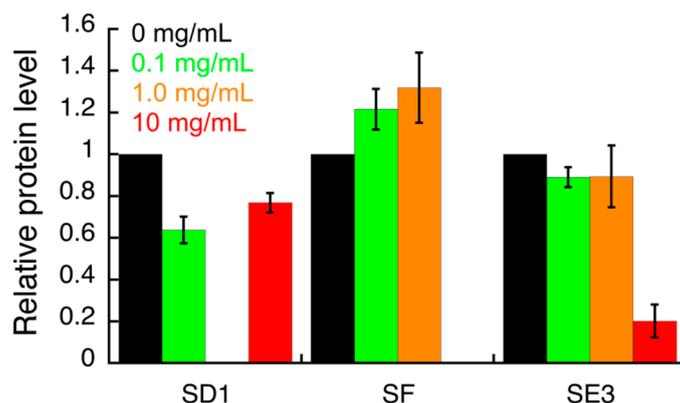
The effect of all *S. campanulata* fractions and sub-fractions on the expression of specific *H. pylori* virulence factors, including the two adhesins BabA and HopZ, and the cytotoxin-associated gene A (CagA), was investigated by Western blot. The samples that showed a significant effect in this preliminary assay were further investigated (Figure S4; Figures 2–4). HP1043 staining was used as the loading control. Densitometric analysis of blot was performed and quantification data are reported in the bar chart. Values are expressed as means  $\pm$  SD of two independent experiments. Specifically, sub-fractions SD1, SE3, and SF were able to inhibit HopZ expression (Figure 2). Sub-fractions SD1 and SE3 were found to slightly inhibit the expression of BabA (Figure 3). As for CagA expression, only sub-fraction SE3 inhibited the expression of this cytotoxin (Figure 4).



**Figure 2.** Densitometric analysis of the Western blot images (shown in the Supplementary Materials) indicating the effects of *S. campanulata* on *H. pylori* G27 HopZ adhesin expression. *H. pylori* cells were treated with different concentrations of *S. campanulata* sub-fractions for 4 h and protein level of HopZ adhesin was determined by Western blot, using a specific anti-HopZ antibody. Values are expressed as means  $\pm$  SD of two independent experiments. Sub-fraction SD1 (20% Cyhex/EtOAc), sub-fraction SE3 (70% MeOH/H<sub>2</sub>O), and sub-fraction SF (80% Cyhex/EtOAc) were from fractions D, E, and F, respectively.



**Figure 3.** Densitometric analysis of the Western blot images (shown in the Supplementary Materials) indicating the effects of *S. campanulata* on *H. pylori* G27 BabA adhesin expression. *H. pylori* cells were treated with different concentrations of *S. campanulata* sub-fractions for 4 h and protein level of BabA adhesin was determined by Western blot, using a specific anti-BabA antibody. Values are expressed as means  $\pm$  SD of two independent experiments. Sub-fraction SD1 (20% Cyhex/EtOAc), sub-fraction SE3 (70% MeOH/H<sub>2</sub>O), and sub-fraction SF (80% Cyhex/EtOAc) were from fractions D, E, and F, respectively.



**Figure 4.** Densitometric analysis of the Western blot images (shown in the Supplementary Materials) indicating the effects of *S. campanulata* on *H. pylori* G27 CagA expression. *H. pylori* cells were treated with different concentrations of *S. campanulata* sub-fractions for 4 h and protein level of the virulence factor CagA was determined by Western blot, using a specific anti-CagA antibody. Values are expressed as means  $\pm$  SD of two independent experiments. Sub-fraction SD1 (20% Cyhex/EtOAc), sub-fraction SE3 (70% MeOH/H<sub>2</sub>O), and sub-fraction SF (80% Cyhex/EtOAc) were from fractions D, E, and F, respectively.

The compounds identified in this work by UHPLC-HRMS may be involved in the observed biological activity either by inhibiting urease activity or by modulating the expression of the virulence factors mentioned above. The plant sub-fraction SE3, able to simultaneously modulate the expression of two adhesins (HopZ and BabA) and one cytotoxin (CagA), was obtained from fraction E, which was the richest one in total polyphenols and total flavonoids (Table 1); the flavonol kaempferol was identified in sub-fraction SE3 by UHPLC-HRMS analysis. As for the other two sub-fractions SD1 and SF, their chemical composition was not disclosed by UHPLC-HRMS analysis.

Phenolics have general antimicrobial activity and some of them are also active against *H. pylori* [13,32]. Several phytochemicals may act by inhibiting enteric microbial growth, inducing cellular membrane perturbations, interfering with certain microbial metabolic processes and modulating signal transduction or gene expression pathways [32]. Notably, it has been recently observed that the flavonoid kaempferol, a widely diffused natural flavonol, has an anti-inflammatory effect on *H. pylori*-induced inflammation by suppressing the translocation of CagA and VacA proteins and leading to the downregulation of pro-inflammatory cytokines [33]. Recently, kaempferol has been found to inhibit the *in vitro* DNA binding activity of the homeostatic stress regulator (HsrA), a protein which plays as a global homeostatic regulator, synchronizing metabolic functions and virulence with availability of nutrients and cell division, mediating also the response to oxidative stress. HsrA represents a novel and effective therapeutic target in *H. pylori* infection [34]. In the present work, the sub-fraction SE3 from *S. campanulata*, which contains kaempferol, was found to simultaneously modulate the expression of the two *H. pylori* adhesins HopZ and BabA and the cytotoxin CagA; in addition, this sub-fraction showed a mild urease inhibition. Regarding the effect of natural compounds on the expression of HopZ, to the best of our knowledge no information is available in the literature. N-phenylpropenoyl-L-amino acids (NPAs) has been identified as polyphenol/amino acid conjugates in the seeds of theobroma cacao as well as in a variety of herbal drugs; they have been described for their inhibitors of *H. pylori* BabA outer membrane protein [35]. As for CagA, in addition to kaempferol, binding interactions between this virulence factor and natural compounds have been investigated by molecular docking and four hit compounds have been identified, including one phytosterol, one chalcone, and two carotenoids [36]. Due to the reduced number of natural compounds able either to inhibit urease enzymatic activity or to modulate the expression of *H. pylori* virulence factors, the research in this field deserves a great attention in the medicinal chemistry field in order to develop the identified hit kaempferol, alone or in combination with known drugs. This outcome is in agreement with a recent study [34], where kaempferol has exhibited a potent bactericidal activity against *H. pylori*,

with an MBC value from 28 to 56  $\mu\text{M}$ , the latter in resistant strains. However, the wide group of intracellular targets and the high number of natural compounds potentially effective as therapeutic agents against *H. pylori* present in this plant extract require further evidence to better understand the role of these substances using in vivo models, as previously described in the literature for kampferol isolated from *Polygonum tinctorium* Lour. [37].

#### 4. Conclusions

It can be assumed from this study that natural compounds present in *S. campanulata* bark extract could be effective as potential therapeutic agents against *H. pylori*, by inhibiting urease activity and some virulence factors and by modulating the expression of the adhesins BabA and HopZ and the cytotoxin CagA. These results suggest that enriched extracts from this plant could be useful for the treatment of *H. pylori* mediated gastric diseases and they could be used synergistically with antibiotics in conventional therapy. The flavonol kaempferol, identified by UHPLC-HRMS, has to be further assessed as a new hit for its potential therapeutic activity against *H. pylori* infection.

**Supplementary Materials:** The following files are available online at <http://www.mdpi.com/2079-6382/9/5/258/s1>, Figure S1: Urease activity of recombinant *E. coli* cells in the presence of 250  $\mu\text{M}$  Ni(II) and of 80 mM urea, measured as a change of pH detected by the cresol red indicator. Increasing concentrations of the sub-fraction SD2 were added to the *E. coli* culture before performing the colorimetric assay. Data are shown as mean  $\pm$  SD of the triplicates. Sub-fraction SD2 (20% Cyhex/EtOAc) was obtained from fraction D. Figure S2: Urease activity of recombinant *E. coli* cells in the presence of 250  $\mu\text{M}$  Ni(II) and of 80 mM urea, measured as a change of pH detected by the cresol red indicator. Increasing concentrations of the sub-fraction SE1 were added to the *E. coli* culture before performing the colorimetric assay. Data are shown as mean  $\pm$  SD of the triplicates. Sub-fraction SE1 (50% MeOH/H<sub>2</sub>O) was obtained from fraction E. Figure S3: Urease activity of recombinant *E. coli* cells in the presence of 250  $\mu\text{M}$  Ni(II) and of 80 mM urea, measured as a change of pH detected by the cresol red indicator. Increasing concentrations of the sub-fraction SE3 were added to the *E. coli* culture before performing the colorimetric assay. Data are shown as mean  $\pm$  SD of the triplicates. Sub-fraction SE3 (70% MeOH/H<sub>2</sub>O) was obtained from fraction E. Figure S4: Western blot analysis of *H. pylori* cells, treated with various concentrations of sub-fractions, to quantify the expression levels of HopZ, BabA and CagA proteins. DMSO was used as the control treatment (C), while HP1043 staining was used as the loading control. Sub-fraction SD1 (20% Cyhex/EtOAc), sub-fraction SE3 (70% MeOH/H<sub>2</sub>O) and sub-fraction SF (80% Cyhex/EtOAc) were from fractions D, E and F, respectively. Table S1: Compounds identified in the active fractions and sub-fractions from *Spathodea campanulata* by UHPLC-HRMS.

**Author Contributions:** Conceptualization, P.F.M., M.P.C. and F.P.; methodology, C.R.N., L.M., B.Z., A.Q., D.R. and D.B.; software, D.B.; validation, M.P.C. and F.P.; formal analysis, B.Z., D.R., M.P.C. and F.P.; investigation, C.R.N., L.M., B.Z., A.Q. and D.R.; resources, M.P.C., D.B. and F.P.; data curation, B.Z., D.R., M.P.C. and F.P.; writing—original draft preparation, C.R.N., L.M., B.Z., A.Q. and D.R.; writing—review and editing, F.N.N., S.I.S., P.F.M., M.P.C. and F.P.; visualization, C.R.N., L.M., B.Z. and D.R.; supervision, P.F.M., M.P.C. and F.P.; project administration, P.F.M., M.P.C. and F.P.; funding acquisition, M.P.C., D.B. and F.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** Rainer Haas from Max von Pettenkofer (Institute Pettenkoferstr, Munich, Germany) is kindly acknowledged for providing the antibodies. The authors also acknowledge the Fondazione Cassa di Risparmio di Modena for funding the UHPLC-ESI-Q Exactive system at the Centro Interdipartimentale Grandi Strumenti (CIGS) of the University of Modena and Reggio Emilia, Italy. The authors are grateful to the Erasmus+ program (action KA 107) for providing Corinne Raïssa Ngnameko a grant for her research work at the University of Modena and Reggio Emilia and at the University of Bologna in Italy. Part of the work was funded by Research Modernization Fund of Ministry of Higher Education (Cameroon) and by the FAR2018 Fund of the University of Modena and Reggio Emilia (Italy).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Cover, T.L.; Blaser, M.J. *Helicobacter pylori* in Health and Disease. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 1863–1873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Testerman, T.L.; Morris, J. Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 12781–12808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in Globocan 2012: Globocan 2012. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E359–E386. [CrossRef] [PubMed]
4. Safavi, M.; Shams-Ardakani, M.; Foroumadi, A. Medicinal plants in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Pharm. Biol.* **2015**, *53*, 939–960. [CrossRef] [PubMed]
5. Al-Eraky, D.M.; Helmy, O.M.; Ragab, Y.M.; Abdul-Khalek, Z.; El-Seidi, E.A.; Ramadan, M.A. Prevalence of CagA and antimicrobial sensitivity of *H. pylori* isolates of patients with gastric cancer in Egypt. *Inf. Agents Cancer* **2018**, *13*, 24. [CrossRef] [PubMed]
6. Harrison, U.; Fowora, M.A.; Seriki, A.T.; Loell, E.; Mueller, S.; Ugo-Ijeh, M.; Onyekwere, C.A.; Lesi, O.A.; Otegbayo, J.A.; Akere, A.; et al. *Helicobacter pylori* strains from a Nigerian cohort show divergent antibiotic resistance rates and a uniform pathogenicity profile. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0176454. [CrossRef] [PubMed]
7. Ndip, R.N.; Takang, A.E.M.; Ojongokpoko, J.E.A.; Luma, H.N.; Malongue, A.; Akoachere, J.-F.T.K.; Ndip, L.M.; MacMillan, M.; Weaver, L.T. *Helicobacter pylori* isolates recovered from gastric biopsies of patients with gastro-duodenal pathologies in Cameroon: Current status of antibiogram. *Trop. Med. Int. Health* **2008**, *13*, 848–854. [CrossRef]
8. WHO Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Available online: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/> (accessed on 6 November 2019).
9. Konieczna, I.; Żarnowiec, P.; Kwinkowski, M.; Kolesińska, B.; Fraczyk, J.; Kamiński, Z.; Kaca, W. Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2012**, *13*, 789–806. [CrossRef]
10. Rutherford, J.C. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004062. [CrossRef]
11. Hage, N.; Howard, T.; Phillips, C.; Brassington, C.; Overman, R.; Debreczeni, J.; Gellert, P.; Stolnik, S.; Winkler, G.S.; Falcone, F.H. Structural basis of Lewis<sup>b</sup> antigen binding by the *Helicobacter pylori* adhesin BabA. *Sci. Adv.* **2015**, *1*, 1–9. [CrossRef]
12. Kalali, B.; Mejías-Luque, R.; Javaheri, A.; Gerhard, M. *H. pylori* Virulence Factors: Influence on Immune System and Pathology. *Med. Inflamm* **2014**, *2014*, 426309. [CrossRef] [PubMed]
13. Escandón, R.A.; del Campo, M.; López-Solis, R.; Obrequé-Slier, E.; Toledo, H. Antibacterial effect of kaempferol and (–)-epicatechin on *Helicobacter pylori*. *Eur. Food Res. Technol.* **2016**, *242*, 1495–1502. [CrossRef]
14. Hassan, S.T.S.; Žemlička, M. Plant-derived urease inhibitors as alternative chemotherapeutic agents. *Archiv. Pharmazie* **2016**, *349*, 507–522. [CrossRef] [PubMed]
15. Flavonoid glycosides of *Polygonum capitatum* protect against inflammation associated with *Helicobacter pylori* infection. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0126584.
16. Ghasemian, A.; Fattahi, A.; Mostafavi, S.K.S.; Almarzoqi, A.H.; Memariani, M.; Braiek, O.B.; Yassine, H.M.; Mostafavi, N.S.S.; Ahmed, M.M.; Mirforoughi, S.A. Herbal medicine as an auspicious therapeutic approach for the eradication of *Helicobacter pylori* infection: A concise review. *J. Cell. Phys.* **2019**, *234*, 16847–16860. [CrossRef] [PubMed]
17. Wang, Y.-C. Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 10368–10382. [CrossRef]
18. Ildigwe, E.E.; Akah, P.A.; Nworu, C.S. Anticonvulsant activity of ethanol leaf extract of *Spathodea campanulata* P. Beauv (Bignoniaceae). *J. Med. Food* **2010**, *13*, 827–833. [CrossRef] [PubMed]
19. Ofori-Kwakye, K.; Kwapong, A.A.; Adu, F. Antimicrobial activity of extracts and topical products of the stem bark of *Spathodea campanulata* for wound healing. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2009**, *6*, 168–174. [CrossRef]
20. Teinkela, J.E.M.; Nguedia, J.C.A.; Meyer, F.; Donfack, E.V.; Ndjakou, B.L.; Ngouela, S.; Tsamo, E.; Adiogo, D.; Azebaze, A.G.B.; Wintjens, R. In vitro antimicrobial and anti-proliferative activities of plant extracts from *Spathodea campanulata*, *Ficus bubu*, and *Carica papaya*. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 1086–1095. [CrossRef] [PubMed]
21. Nngameko, C.R.; Njayou, F.N.; Fowora, M.; Neng, F.B.S.; Moundipa Fewou, P.; Smith, S.I. Inhibitory effect of medicinal plants from Cameroon on the growth and adhesion of *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Int. Med.* **2019**, *30*, 100957. [CrossRef]
22. Amusan, O.O.G.; Adesogan, E.K.; Makinde, J.M. Antimalarial Active Principles of *Spathodea campanulata* Stem Bark. *Phytother. Res.* **1996**, *10*, 692–693. [CrossRef]

23. Boniface, P.K.; Singh, M.; Verma, S.; Shukla, A.; Khan, F.; Srivastava, S.K.; Pal, A. RP-HPLC-DAD method for the identification of two potential antioxidant agents namely verminoside and 1-O-(E)-caffeoyl- $\beta$ -gentiobiose from *Spathodea campanulata* leaves. *Nat. Prod. Res.* **2015**, *29*, 676–680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Heim, S.C.; Guarnier, F.A.; Ferreira, D.T.; Braz-Filho, R.; Cecchini, R.; Cecchini, A.L. Antioxidant activity of *Spathodea campanulata* (Bignoneaceae) extracts. *Rev. Bras. Plantas Med.* **2012**, *14*, 287–292. [[CrossRef](#)]
25. Lifongo, L.L.; Simoben, C.V.; Ntie-Kang, F.; Babiaka, S.B.; Judson, P.N. A bioactivity versus ethnobotanical survey of medicinal plants from Nigeria, west Africa. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2014**, *4*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Nazif, N.M. Phytochemical and antioxidant activity of *Spathodea campanulata* P. beauvois. Growing in Egypt. *Nat. Prod. Sci.* **2007**, *13*, 11–16.
27. Ngouela, S.; Tsamo, E.; Sondengam, B.L.; Connolly, J.D. Spathodol, a New Polyhydroxysterol from the Leaves of *Spathodea campanulata*. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 873–876. [[CrossRef](#)]
28. Ngougoure, V.L.N.; Mfotie Njoya, E.; Ngamli Fewou, S.; Ella, A.F.; McGaw, L.J.; Moundipa, P.F. Acetylcholinesterase inhibitory, anti-inflammatory and antioxidant properties of some Cameroonian medicinal plants used to treat some neurological disorders. *Investig. Med. Chem. Pharmacol.* **2019**, *2*, 33–46. [[CrossRef](#)]
29. Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibensouda, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6*, 71–79. [[CrossRef](#)]
30. Pianaro, A.; Pinto, J.; Trevisan Ferreira, D.; Ishikawa, N.; Braz-Filho, R. Iridoid glucoside and antifungal phenolic compounds from *Spathodea campanulata* roots. *Semin. Cienc. Agrar.* **2007**, *28*, 251–255. [[CrossRef](#)]
31. Tarsia, C.; Danielli, A.; Florini, F.; Cinelli, P.; Ciurli, S.; Zambelli, B. Targeting *Helicobacter pylori* urease activity and maturation: In-cell high-throughput approach for drug discovery. *Biochim. Biophysica Acta (BBA) Gen. Subj.* **2018**, *1862*, 2245–2253. [[CrossRef](#)]
32. Godstime, O.C.; García, A.; Augustina, J.O.; Christopher, E. Mechanisms of Antimicrobial Actions of Phytochemicals against Enteric Pathogens—A Review. *J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* **2014**, *2*, 77–85.
33. Yeon, M.J.; Lee, M.H.; Kim, D.H.; Yang, J.Y.; Woo, H.J.; Kwon, H.J.; Moon, C.; Kim, S.-H.; Kim, J.-B. Anti-inflammatory effects of Kaempferol on *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2019**, *83*, 166–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. González, A.; Salillas, S.; Velázquez-Campoy, A.; Espinosa Angarica, V.; Fillat, M.F.; Sancho, J.; Lanas, Á. Identifying potential novel drugs against *Helicobacter pylori* by targeting the essential response regulator HsrA. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Niehues, M.; Stark, T.; Keller, D.; Hofmann, T.; Hensel, A. Antiadhesion as a functional concept for prevention of pathogens: N-Phenylpropenoyl-L-amino acid amides as inhibitors of the *Helicobacter pylori* BabA outer membrane protein. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 1104–1117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Racha, S.; Wongrattanakamon, P.; Raiwa, A.; Jiranusornkul, S. Discovery of novel potent small natural molecules able to enhance attenuation of the pathobiology of gastric cancer-associated *Helicobacter pylori* by molecular modeling. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2019**, *25*, 881–896. [[CrossRef](#)]
37. Kataoka, M.; Hirata, K.; Kunikata, T.; Ushio, S.; Iwaki, K.; Ohashi, K.; Ikeda, M.; Kurimoto, M. Antibacterial action of tryptanthrin and kaempferol, isolated from the indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.), against *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *J. Gastroenterol.* **2001**, *36*, 5–9. [[CrossRef](#)]

