



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

Moyens de diagnostique de *Helicobacter pylori*
et étude de la prévalence au sein d'un laboratoire d'analyses
médicales privé

Présenté par : Safae Rebhi

Encadré par : Pr Abdelali TAZI

Dr Salma BENJELLOUN

Soutenu le : 08-06-2017

Devant le jury composé de :

- Dr Salma BENJELLOUN
- Pr Abdelali TAZI
- Pr Mohamed Iraqui Housaini

Stage effectué au : Laboratoire d'analyses médicales BENJELLOUN

Année universitaire 2016-2017

Remerciements

Avant d'entamer ce rapport, je tiens à remercier du fond du cœur toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements au Dr Benjelloun Salma, Médecin Biologiste du laboratoire d'analyses médicales Benjelloun de m'avoir accepté au sein de son laboratoire et de m'avoir assuré toutes les conditions afin que je puisse effectuer ce stage dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier vivement mon encadrant à la Fst Pr Tazi Abdelali, pour sa disponibilité, son encouragement, son soutien et son aide précieux.

Au Pr Mohamed Iraqui Housaini, qui a accepté de participer et de juger mon projet de fin d'études.

Ainsi que le personnel du laboratoire qui m'ont toujours soutenu et aidé tout au long de mon stage.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont encouragé durant mon parcours : Mes parents, mes frères ma sœur et mes chers amis.

Merci

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| Introduction | 1 |
| 1^{ère} Partie : Etude Bibliographique | 2 |
| I. Généralités sur Helicobacter | 3 |
| 1. Les Familles d' <i>Helicobacter</i> | 3 |
| 2. Caractéristiques d' <i>Helicobacter pylori</i> | 4 |
| a. La Morphologie | 4 |
| b. L'Habitat | 5 |
| c. Le Pouvoir Pathogène | 5 |
| d. L'Epidémiologie | 6 |
| II. Atteinte de l'Estomac par Helicobacter Pylori | 7 |
| 1. Mode de Contamination | 7 |
| 2. Circonstances de Découverte | 7 |
| 3. Manifestations Cliniques | 7 |
| 4. Complication de l'Atteinte par l' <i>Helicobacter Pylori</i> | 8 |
| 5. Traitement et Prévention | 9 |
| a. Traitement | 9 |
| b. Prévention | 9 |
| III. Moyens de diagnostique | 10 |
| 1. Types de prélèvements | 10 |
| 2. Méthodes invasives | 10 |
| a. Examen histologique | 10 |
| b. Culture | 10 |
| c. Test à l'uréase | 11 |
| d. PCR | 11 |
| 3. Méthodes non invasives | 11 |
| a. Examen sérologique | 11 |
| b. Recherche dans les selles | 12 |
| c. Test respiratoire à l'urée | 12 |
| 4. Avantages et inconvénients de chaque méthode | 13 |
| 2^{ème} partie : Matériel et méthodes | 15 |

| | | |
|------|---|----|
| I. | Population d'étude | 16 |
| II. | <i>H.pylori</i> dans les selles (Hels) | 16 |
| 1. | Constituants du SD BIOLINE Ag | 16 |
| 2. | Prélèvement et manipulation des échantillons | 16 |
| 3. | Procédure de test | 17 |
| 4. | Interprétation du test : | 18 |
| III. | Test respiratoire (Hkit) | 18 |
| 1. | Constituants de Taukit : | 18 |
| 2. | Procédure du test | 18 |
| IV. | Test sérologique (Sheli) | 19 |
| | 3^{ème} partie : Résultats et discussion | 20 |
| I. | Résultats | 21 |
| 1. | Fréquence de l'infection par <i>Helicobacter pylori</i> | 21 |
| 2. | Répartition des infections selon l'âge et le sexe | 21 |
| a. | Selon le sexe | 21 |
| II. | Discussion | 23 |
| | 4^{ème} partie : conclusion | 24 |
| | Conclusion | 25 |
| | Références bibliographiques | 26 |

Liste Des abréviations

Sheli : *Sérologie de l'Helicobacter pylori*

Hels : antigène Helicobacter pylori dans les selles

Hkit : Helicobacter pylori – test respiratoire à l'urée ¹³C air expiré

H. pylori: *Helicobacter pylori*

AC: *Anticorps*

Ag: *Antigène*

IPP: Inhibiteur de la pompe à protons

PCR : Polymerase Chain Reaction

UBT : Test respiratoire à l'urée

IPM : l'institut pasteur du Maroc

Présentation du lieu de stage

Le laboratoire d'analyses médicales Benjelloun est un lieu où sont prélevés et analysés divers produits biologiques d'origine humaine sous la responsabilité du Médecin Biologiste Dr **BENJELLOUN Salma**.

Le laboratoire d'analyses médicales Benjelloun dispose de plusieurs services :

Hématologie cytologie, sérologie, biochimie, hormonologie, immunologie, bactériologie, virologie, parasitologie, mycologie et biologie de la reproduction.

Le Laboratoire est composé du bureau du médecin, d'un secrétariat, de deux salles de prélèvement et d'un plateau technique réservé aux analyses demandées.

Le secrétariat : c'est le local de réception où le personnel accueille les patients et enregistre les informations nécessaires à la constitution de leur dossier (Nom, prénom, âge, sexe, analyses demandées ...).

Les salles de prélèvement : ces espaces permettent l'isolement du patient et la réalisation des différents actes de prélèvement.

Le plateau technique est composé d'une salle de microbiologie où sont traités les différents prélèvements de bactériologie de parasitologie et de virologie et de deux grandes salles techniques comportant les automates des différentes paillasse :

Paillasse d'hématologie « HORIBAS Micros XS, SYSMEX XN ».

Paillasse d'hémostase « satellite Stago ».

Paillasse de biochimie « conelab 30i thermo, D10 Biorad ».

Paillasse d'immuno-hormonologie et sérologie « Vidas Biomérieux, Architect i 1000 Abott ».

Paillasse d'auto-immunité « chorus trio diesse ».

Le personnel : Les différentes activités analytiques sont assurées par une équipe du laboratoire composée du médecin biologiste et des techniciens de laboratoire

Introduction

Actuellement, l'analyse médicale est un outil incontournable dans le diagnostique, prévention, pronostique, surveillance et dépistage des maladies, elle est indispensable pour déterminer le type d'atteinte et ainsi prescrire un traitement bien précis.

Ces dernières comportent plusieurs types d'exams : Biochimiques, Hématologique, Bactériologiques, Parasitologiques, Mycologiques, Virologiques et Sérologiques.

De nos jours l'infection par *H.pylori* est mondialement répandue, son traitement nécessite un diagnostique préalable qui s'effectue par différentes méthodes certaines sont invasives d'autre non. Quelque soit la méthode, le but reste le même : vérifier sa présence au niveau de l'estomac et ainsi donner un traitement pour l'éradiquer.

Dans ce sens, l'objectif du stage est d'une part de comprendre les méthodes utilisées dans le laboratoire afin de diagnostiquer l'atteinte par *Helicobacter pylori*. D'autre part d'étudier la prévalence de l'infection sur une période de 12 mois (du 1^{er} AVRIL 2016 au 1^{er} AVRIL 2017).

1^{ère} Partie : Etude Bibliographique

I. Généralités sur *Helicobacter*

1. Les Familles d'*Helicobacter*

Helicobacter pylori est sans conteste le chef de file des bactéries du genre *Helicobacter*. De nombreuses espèces sont maintenant caractérisées (figure 1) et classiquement divisées en deux grands groupes: les *Helicobacters* gastriques et les *Helicobacters* entérohépatiques. Dans ces deux groupes, seules certaines espèces ont pu être isolées chez l'homme, les autres étant uniquement rencontrées chez les animaux.

La pathogénicité de *Helicobacter pylori* est maintenant bien étudiée. Deux souches ont été séquencées, l'une isolée d'un patient atteint d'ulcère, l'autre associée à une gastrite. Une des caractéristiques la plus frappante de *H. pylori* réside dans sa diversité génétique.

Le rôle des *Helicobacters entérohépatiques* dans les maladies hépatobiliaires commence à être bien documenté, en particulier pour *Helicobacter hepaticus* dont le génome vient d'être séquencé. À l'inverse, nos connaissances sur la pathogénicité d'autres espèces se heurtent à la difficulté de les isoler et donc d'accéder à leur information génétique.

Cependant, des modèles animaux d'infection nous permettent de disposer d'outils pour évaluer une infection naturelle par des bactéries du genre *Helicobacter*, voire de tester des vaccins anti- *Helicobacter*.

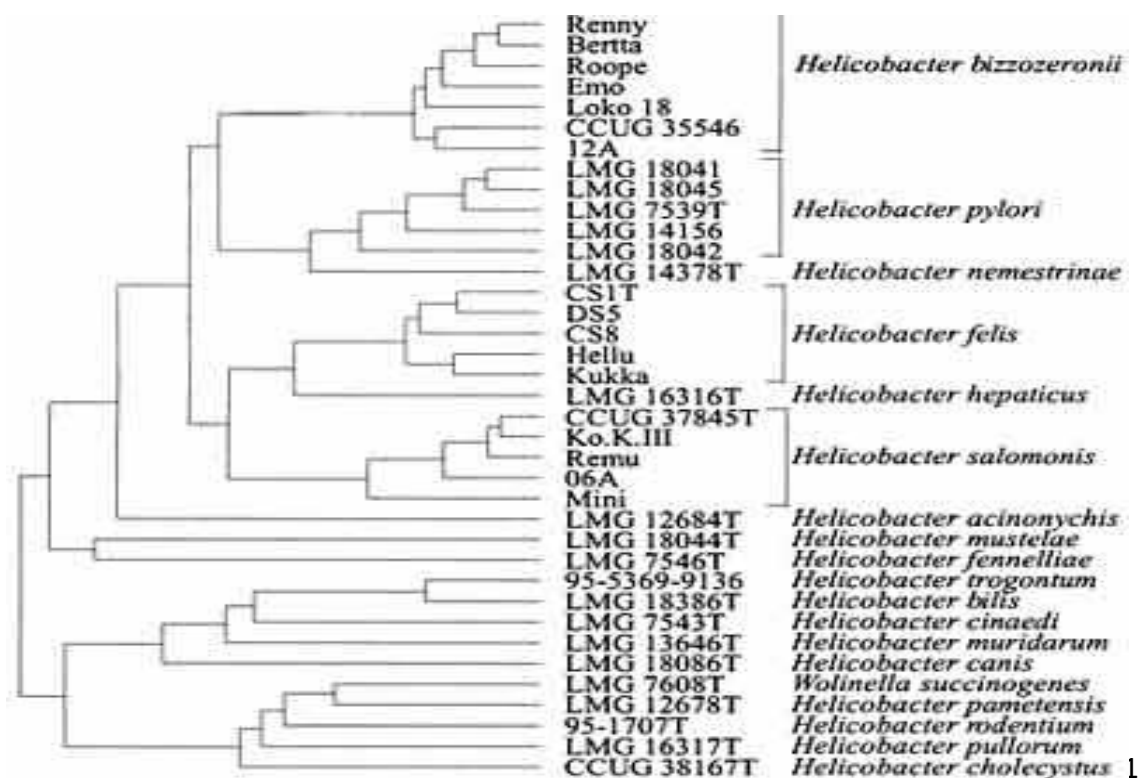


Figure 1 Famille des *Helicobacter*

2. Caractéristiques d'*Helicobacter pylori*

a. La Morphologie

Hélico – signifie hélicoïdale (sa forme en hélice).

Bacter – vient de bactérie.

Helicobacter pylori est une bactérie à Gram négatif incurvé, présentant cinq à six flagelles polaires. La morphologie habituelle de *H. pylori* est bacillaire, mais elle prend une forme coccoïde au cours de la culture. Cette forme coccoïde est plus résistante permettant à *H. pylori* de survivre dans un environnement hostile.

La bactérie est microaérophile avec une croissance optimale dans une atmosphère contenant 5% d'oxygène et 5 à 10% de dioxyde de carbone. Les cultures de *H. pylori* poussent de façon optimale à une température de 37°C après 3 à 5 jours d'incubation.

"*Helicobacter pylori*" tire son nom de sa forme en spirale et de ses flagelles qui lui permettent de se déplacer sur le mucus qui couvre la paroi de l'estomac. (Figure 2)

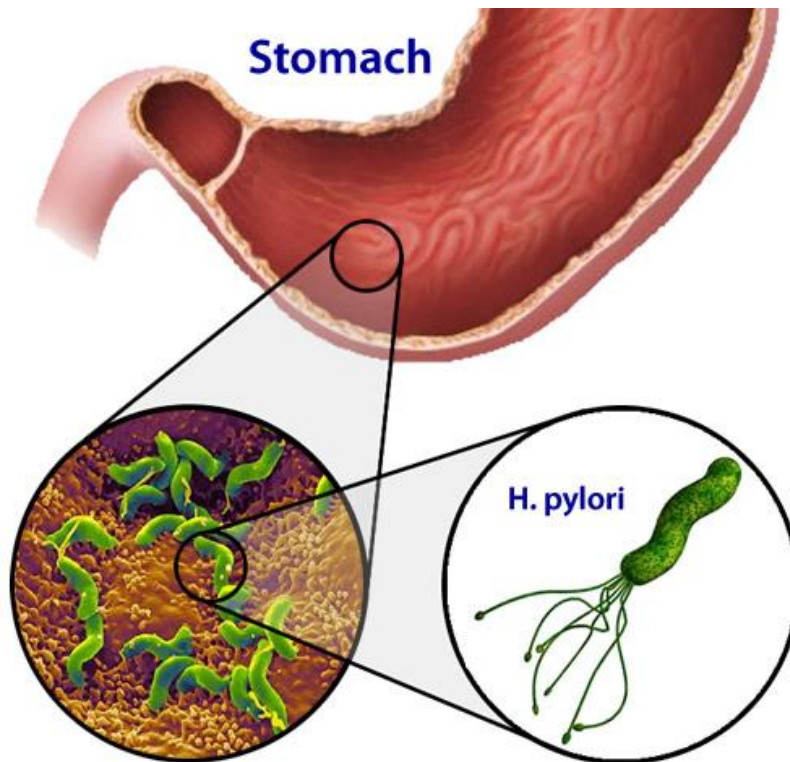


Figure 2 *Helicobacter pylori* dans l'estomac.

b. L'Habitat

Le réservoir exclusif de *Helicobacter pylori* est l'estomac de l'homme. Plusieurs animaux qui avaient été considérés comme des réservoirs potentiels (porc, chat, mouton, singe) sont maintenant disculpés. Les mouches et les cafards pourraient être impliqués si la bactérie était éliminée en quantité importante et sous forme viable dans les selles.

En 1982, les chercheurs australiens, JR Warren et BJ Marshall, isolent la bactérie. Cette découverte leur vaudra le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2005.

c. Le Pouvoir Pathogène

La gravité de la maladie et le résultat clinique sont associés aux facteurs hôtes, environnementaux et bactériens. Les déterminants les plus importants de la virulence sont la cytotoxine vacuolante (vacA) et le gène A associé à la cytotoxine (cagA). **(1)**

Helicobacter pylori est capable de survivre dans l'acide gastrique car elle sécrète des enzymes qui neutralisent l'acide. Ce processus s'appelle l'hydrolyse d'urée. Grâce à sa forme hélicoïdale et à ses flagelles, la bactérie se glisse à travers les muqueuses de l'estomac et s'ancre aux cellules épithéliales (tissu en plusieurs couches) grâce à des adhésines (protéines fixatrices).

Elle sécrète alors une enzyme appelée **uréase** (qui permet de tester sa présence) qui transforme l'urée de l'estomac en ammoniac et en dioxyde de carbone.

L'ammoniac va partiellement neutraliser l'acidité gastrique (qui sert entre autres à tuer les bactéries), cela crée un nuage neutralisant autour de *Helicobacter pylori*, la protégeant de l'acide dans l'estomac.

Cet ammoniac est toxique pour les cellules épithéliales et va, avec d'autres produits sécrétés par *Helicobacter pylori* (protéases, catalases, phospholipases etc.), attaquer les cellules gastriques, enclenchant de ce fait le processus de formation d'ulcère.

Ce n'est pas *Helicobacter pylori* qui cause un ulcère, mais l'inflammation en réponse à son agression.

d. L'Epidémiologie

L'infection par *Helicobacter pylori* est universellement répandue, susceptible d'atteindre toutes les populations, mais surtout rencontrée lorsque les conditions socio-économiques sont défavorables. La prévalence de cette infection est de 70 à 90% dans les pays en voie de développement, alors qu'elle ne représente que 20 à 30% dans les pays industrialisés. **(2)(3)**

Des rapports récents ont révélé que les souches virulentes de *Helicobacter pylori* varient considérablement dans leur répartition géographique. En effet, selon le statut *cagA* et les génotypes *vacA*, la distribution des souches en Europe et aux États-Unis est différente de l'Asie et d'autres pays en développement. Ainsi, du fait que l'incidence et la gravité de la maladie sont beaucoup plus élevées dans les pays en développement, la caractérisation des souches obtenues à partir de ces zones aidera à mieux comprendre les différences de pathogénèse et le rôle de chaque génotype dans la gravité de résultat de la maladie.

II. Atteinte de l'Estomac par *Helicobacter Pylori*

1. Mode de Contamination

Les sources de contamination potentielles sont les vomissures, la salive et les selles. Chez les sujets infectés, *Helicobacter pylori* est toujours présent au niveau des vomissures et va survivre quelques heures dans l'environnement. La salive est parfois positive, du fait de régurgitations, mais les selles ne renferment des formes viables qu'en cas de transit accéléré et de manière inconstante. La transmission survient essentiellement dans l'enfance et est le plus souvent intrafamiliale.

Dans les pays en développement, la voie fécale-orale est plausible en plus de la voie orale-orale. En effet, les diarrhées sont fréquentes, l'hygiène fécale mal réalisée et l'eau souvent non traitée. De plus, l'hygiène lors des vomissements peut ne pas être adéquate, du fait des conditions sanitaires déficientes des foyers. Dans les pays développés par contre, les facteurs de la transmission fécale-orale semblent avoir disparus, ce qui est en accord avec une transmission devenue rare et sans doute essentiellement orale-orale.

2. Circonstances de Découverte

Lorsque Barry Marshall et son jeune acolyte Robin Warren ont identifié et nommé la bactérie *Helicobacter pylori* en 1982, l'ulcère gastrique n'était pas considéré comme une maladie infectieuse, loin de là. Les habitudes alimentaires, le mode de vie, la consommation d'alcool ou de tabac, le stress, étaient considérés comme les principales causes de l'ulcère. Etablir qu'une bactérie en spirale soit responsable de 80 à 95% de ces inflammations de l'estomac ou du duodénum a profondément modifié et amélioré la prise en charge des ulcères. Eradiquer *Helicobacter pylori* grâce à un traitement antibiotique permet notamment de limiter les récives qui étaient très fréquentes et qui en faisaient un mal chronique.

3. Manifestations Cliniques

Helicobacter pylori provoque une inflammation, appelée **gastrite chronique**, qui évolue généralement sans manifestation particulière mais qui persiste tant que la bactérie est présente, et parfois toute la vie.

Par la suite des lésions gastriques liées à l'infection à *Helicobacter pylori*, telles que des ulcères ou un cancer gastrique, peuvent parfois se développer. Ces lésions se constituent sur plusieurs années et évoluent l'entement : il peut s'écouler parfois plus de 30 ans avant que des symptômes n'apparaissent. **(2)(3)**

4. Complication de l'Atteinte par l'*Helicobacter Pylori*

Helicobacter pylori peut être à l'origine de plusieurs maladies plus ou moins graves, suivant les individus:

- **Gastrite**

Elle résulte de la réponse inflammatoire et immunologique induite par *Helicobacter pylori*. **(4)**

- **Ulcère duodénal**

La présence de *Helicobacter pylori* est à l'origine d'une augmentation de la sécrétion acide gastrique en cas de gastrite antrale prédominante. Ainsi, la muqueuse duodénale, déjà affaiblie par la présence d'îlots de métaplasie gastrique est soumise à une concentration acide plus importante favorisant alors l'apparition de l'ulcère duodénal. **(4)**

- **Ulcère gastrique**

Il survient chez les patients présentant une atrophie gastrique fundique ou une pangastrite et chez qui la sécrétion acide est moins importante. Sur le plan histologique en effet, les lésions ulcéreuses sont localisées à la jonction de zones sécrétant de l'acide et des zones ne sécrétant pas d'acide. Une autre explication est la survenue d'infarctus au niveau de la muqueuse. En effet, l'ulcère gastrique est plus fréquemment situé au niveau de la petite courbure où la vascularisation est terminale. La survenue de l'ischémie est favorisée par la gastrite induite par *Helicobacter pylori* au cours de laquelle ce dernier, stimule la production de Platelet activating factor conduisant à une thrombose artérielle. **(4)**

- **Lymphome gastrique**

Au cours de la gastrite chronique induite par *Helicobacter pylori*, il existe un afflux chronique de lymphocytes dont l'activation peut favoriser l'apparition de lymphome. **(4)**

- **Adénocarcinome gastrique**

Helicobacter pylori induit une métaplasie intestinale au niveau de l'estomac, ce qui explique la fréquence du cancer gastrique de type intestinal.

Helicobacter pylori est également à l'origine d'une atrophie gastrique étendue avec une diminution des cellules pariétales gastriques favorisant l'apparition du cancer gastrique. Ceci est d'autant plus probable que l'infection est acquise avant l'âge de 5 ans, le régime alimentaire est hyper salé et la faible consommation de vitamines antioxydants (A, C, E). Par ailleurs, la persistance de l'inflammation chronique, une diminution de la sécrétion d'acide ascorbique et la diminution de la sécrétion acide permettent la croissance d'autres bactéries qui ont une propriété mitogène. (4)

5. Traitement et Prévention

a. Traitement

Le traitement recommandé pour éradiquer *Helicobacter pylori* associe un agent anti sécrétoire IPP (inhibiteur de la pompe à protons à double dose) à deux antibiotiques, amoxicilline et clarithromycine, durant 7 jours. En cas d'échec, une résistance à la clarithromycine est souvent en cause et cet antibiotique peut être remplacé par le métronidazole dans la trithérapie donnée alors durant 14 jours.

La surveillance de l'efficacité du traitement est réalisée par un test respiratoire à l'urée marquée, 4 à 5 semaines après l'arrêt du traitement.

Les indications majeures pour l'éradication sont: la maladie ulcéreuse gastrique et duodénale, le lymphome gastrique du MALT et les lésions précancéreuses de l'estomac. L'éradication à visée prophylactique pour le carcinome gastrique est actuellement en discussion. Il n'y a actuellement pas de vaccin disponible.

b. Prévention

Les mesures préventives consistent au lavage des mains, à la consommation d'aliments propres, de boissons provenant de sources d'eau propre. Ces mesures concernent toute la population.

III. Moyens de diagnostique

1. Types de prélèvements

Les méthodes invasives : elles font suite à des prélèvements biopsiques réalisés au cours d'une endoscopie, de préférence au niveau antral à deux centimètres du pylore voire au niveau fundique ou duodéal. Ces biopsies sont le complément d'un examen endoscopique de la muqueuse gastrique. Parmi les méthodes pratiquées sur la biopsie on peut citer : l'examen microscopique et histologique après coloration argentique, le test colorimétrique à l'urée et la PCR (Polymerase Chain Reaction). (5)

Les méthodes non invasives : Elles recherchent la présence de *Helicobacter pylori* au niveau de différents fluides biologiques : sang, air expiré, urines, fèces. Les deux techniques les plus utilisées sont la sérologie et le test respiratoire. (5)

2. Méthodes invasives

La réalisation d'une endoscopie digestive haute est recommandée en présence de l'un des signes d'alarme suivants quel que soit l'âge du patient : amaigrissement, dysphagie, vomissement persistant, anémie ferriprive ou hémorragie digestive.

Dans les pays développés, chez les patients de plus de 55 ans présentant une dyspepsie une endoscopie digestive haute est également indiquée.

Dans les pays en voie de développement, cette endoscopie pourrait être proposée plus précocement. Les techniques directes pour rechercher *H. pylori* comprennent : le test à l'uréase, l'histologie et la culture.

a. Examen histologique

Cette technique est non seulement dotée d'une bonne sensibilité et d'une bonne spécificité (supérieure à 95%) mais également et surtout, elle renseigne sur la présence de gastrite, d'atrophie gastrique, de métaplasie ou de cancer.

b. Culture

Elle a l'inconvénient d'être peu sensible. Néanmoins, sa spécificité est élevée. Son autre avantage est de permettre l'évaluation de la sensibilité de *Helicobacter pylori* vis-à-vis des différents antibiotiques.

Ainsi, en cas d'échec répété d'un traitement d'éradication cette méthode permettra d'adapter le traitement antibiotique.

La culture est réalisée dans des centres spécialisés.

c. Test à l'uréase

Il consiste à immerger le prélèvement biopsique dans une solution ou un gel contenant de l'urée en présence d'un indicateur de pH. Si *Helicobacter pylori* est présent dans le prélèvement, l'uréase qu'il produit hydrolysera l'urée en ammonium augmentant ainsi le pH du milieu, à l'origine d'un changement de couleur de l'indicateur de pH.

La sensibilité du test est supérieure à 98% et la spécificité de 99%. Néanmoins, la sensibilité après l'éradication est diminuée.

d. PCR

Une alternative à la culture est l'amplification génique de l'ADN d'*Helicobacter pylori* qui détecte de faibles quantités de bactérie. L'intérêt de la méthode est de simplifier les conditions d'acheminement de la biopsie au laboratoire et d'offrir une sensibilité et une spécificité de plus de 90%, il faut réaliser ce test à distance d'un traitement d'éradication « au moins 15 jours » car la méthode détecte les fragments d'ADN lysés.

Le développement d'une méthode de PCR en temps réel, réalisable sur les biopsies gastriques ou les selles permet de détecter une résistance à la clarithomycine de façon beaucoup plus rapide que par culture.

3. Méthodes non invasives

a. Examen sérologique

La sérologie est basée sur la recherche d'IgG, anticorps circulants, produits lors de la réaction de l'organisme face à la stimulation antigénique de *Helicobacter pylori*.

La recherche de l'Ac de *Helicobacter pylori* dans le sang « Sheli » a peu d'intérêt en pratique. En effet, elle explore une exposition antérieure et non une infection actuelle. Ainsi, cette méthode diagnostique est utilisée dans des études épidémiologiques notamment dans les pays où la prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* est élevée Elle souffre d'une faible sensibilité et d'une faible spécificité, respectivement 85 à 92% et 79 à 83%. La cinétique des Ac est longue car la décroissance du taux des Ac se produit 4 à 6 mois après le

traitement d'éradication. La recherche de l'Ac de *Helicobacter pylori* dans la salive et dans les urines n'ont actuellement pas de place en pratique. La recherche de l'Ac de *Helicobacter pylori* dans le sang est disponible. **(6)**

b. Recherche dans les selles

Les premiers tests étaient fondés sur la détection d'Ag avec Ac polyclonaux, puis AC monoclonaux.

Elle utilise actuellement des Ac monoclonaux augmentant ainsi le rendement diagnostique.

Sa sensibilité est de 95% et sa spécificité de 94%. Ce test est à privilégier dans les pays à faible ressources pour le diagnostic de *Helicobacter pylori* et le contrôle d'éradication du fait de son faible coût. **(7) (8)**

c. Test respiratoire à l'urée

Les tests de respiration sont utilisés dans la pratique de la gastro-entérologie pour étudier les processus physiologiques et métaboliques de manière indirecte. Ces tests ont été utilisés pour mesurer la vidange gastrique, la prolifération bactérienne de l'intestin grêle, la fonction pancréatique exocrine, la capacité métabolique du foie et enfin la présence de *H. pylori* dans l'estomac.

Le test respiratoire à l'urée (UBT) s'est avéré être l'une des méthodes les plus précises pour évaluer le statut de *Helicobacter pylori*. L'UBT est simple, inoffensif, facile à répéter et très précis.

Le principe de l'UBT repose sur la capacité de *Helicobacter pylori*, lorsqu'il est présent dans l'estomac, à hydrolyser l'urée marquée administrée par voie orale.

En présence d'*Helicobacter pylori* l'urée est scindée en ammonium et bicarbonate. Puis les bicarbonates sont transformés sous l'influence de l'acidité gastrique, en gaz carbonique marqué au ^{13}C , qui sera ensuite éliminé dans l'air expiré. Les taux de gaz carbonique marqué au ^{13}C sont mesurés par spectrométrie de masse isotopique couplée à la chromatographie en phase gazeuse (méthode de référence) ou par spectrophotométrie infrarouge.

Ce test est devenu, ces dernières années, de plus en plus populaire dans la pratique clinique tant pour le dépistage des patients avant l'endoscopie que pour l'évaluation du succès des traitements d'éradication de *Helicobacter pylori*.

L'urée peut être marquée avec deux isotopes différents, ^{14}C (isotope radioactif) ou ^{13}C (isotope stable non radioactif). L'étiquetage de l'urée avec ^{13}C est devenu de plus en plus populaire car l'isotope non radioactif est inoffensif, de sorte que le test peut être répété aussi souvent que nécessaire chez le même patient et peut également être exécuté en toute sécurité chez les enfants, les femmes enceintes et les femmes âgées. Au contraire, le test respiratoire qui utilise ^{14}C , une technique qui n'est pas autorisée par la plupart des autorités sanitaires pour le diagnostic de *Helicobacter pylori*, est associée à une dose de rayonnement pour laquelle, bien que considérablement faible, une licence à manipuler est nécessaire, il faut un stockage adéquat et son utilisation n'est pas permise pour les femmes enceintes ou les enfants. (Figure3)

Le principal inconvénient du test respiratoire avec ^{13}C -urée est qu'il nécessite habituellement un spectromètre de masse pour obtenir les résultats, avec un investissement économique initial élevé. Cependant, comme l'isotope n'est pas radioactif, un seul.

Spectromètre partagé par plusieurs centres permet d'envoyer les échantillons au centre de référence, ce qui réduit considérablement le coût de la technique.

La figure 3 représente une illustration du principe du test respiratoire.

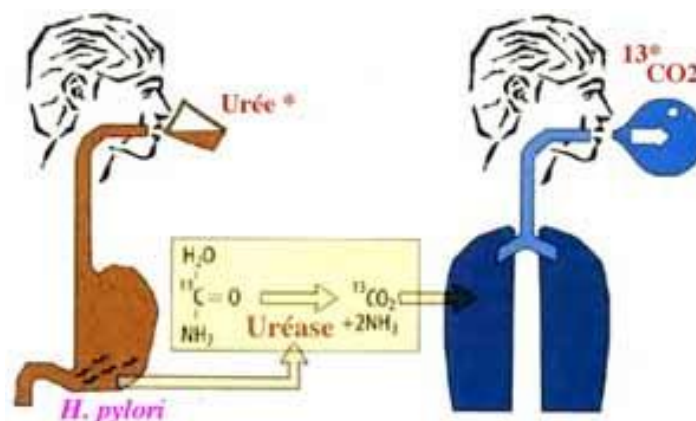


Figure 3 : Test respiratoire d'*Helicobacter pylori*.

4. Avantages et inconvénients de chaque méthode

Dans le tableau 1, sont résumés les avantages et inconvénients de différentes méthodes de diagnostic de l'infection à *H.pylori* sur les biopsies gastriques.

Tableau 1

| Méthodes diagnostiques de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> sur biopsies gastriques | | |
|---|--|--|
| Tests biopsies gastriques | Avantages | Inconvénients |
| Anatomie pathologique | Test habituel Bonnes sensibilité, spécificité et disponibilité Typage de la gastrite | Relativement coûteux Sensibilité diminuée si : IPP, antibiotiques, hémorragie... |
| Test rapide de l'uréase | Peu coûteux Résultat rapide (< 1 h) Très bonne spécificité | Non remboursé Sensibilité insuffisante surtout en post-éradication et si : IPP, antibiotiques, hémorragie... |
| Culture | Test de référence (spécificité 100 %) Possibilité d'antibiogramme et de recherche génotypique | Coûteux, centre spécialisé Milieu de transport Sensibilité diminuée si : IPP, antibiotiques, hémorragie... |
| Amplification génique | Sensibilité et spécificité élevées Pas de milieu de transport particulier Détection mutations de résistance macrolides et quinolones | Centre spécialisé Sensibilité diminuée si : IPP, antibiotiques, hémorragie |

IPP : inhibiteurs de la pompe à protons.

Dans le tableau 2 sont résumés les avantages et inconvénients des méthodes de diagnostic de *H.pylori* qui ne reposent pas sur des biopsies gastriques.

Tableau 2 :

| Méthodes diagnostiques de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> ne nécessitant pas de biopsies gastriques | | |
|---|---|--|
| Tests sans endoscopie | Avantages | Inconvénients |
| Sérologie | Peu coûteuse, disponibilité Très bonne valeur prédictive négative Sensibilité conservée si : IPP, antibiotiques, hémorragie... | Valeur prédictive positive dépendante de la prévalence de <i>H. pylori</i> Non utilisable en post-éradication |
| Test respiratoire à l'urée ¹³ C | Identifie infection active Excellentes valeurs prédictives négative et positive avant et après traitement d'éradication chez l'enfant et l'adulte | Remboursement si contrôle éradication Sensibilité diminuée si : IPP, antibiotiques, hémorragie, estomac opéré |
| Détection antigénique dans les selles | Excellentes valeurs prédictives négative et positive avant et après traitement d'éradication chez l'enfant et l'adulte, si anticorps monoclonaux utilisés | Peu accessible en France Sensibilité diminuée si : IPP, antibiotiques, hémorragie, estomac opéré |

L'objectif du stage est :

- ✓ De comprendre les méthodes utilisées dans le laboratoire afin de diagnostiquer, l'atteinte par *Helicobacter pylori*.
- ✓ D'étudier la prévalence de l'infection sur une période de 12 mois (du 1^{er} AVRIL 2016 au 1^{er} AVRIL 2017).

2^{ème} partie : Matériel et méthodes

I. Population d'étude

L'étude a porté sur 135 patients ayant demandé l'analyse de *H.pylori* sur une période de 12 mois (du 1^{er} Avril 2016 au 1^{er} Avril 2017) au laboratoire d'analyses médicales Benjelloun.

II. *H.pylori* dans les selles (Hels)

Le test SD BIOLINE Ag *H.pylori* est un test fondu sur la détection quantitative de l'antigène *H.pylori* dans les selles humaines. Ce test a pour but d'aider à diagnostiquer l'infection par *H.pylori* chez les patients présentant des symptômes gastro-intestinaux.

1. Constituants du SD BIOLINE Ag

Le test de SD BIOLINE Ag contient les éléments suivants pour la réalisation du test :

- 20 dispositifs de test avec dessicant, emballés dans des pochettes individuelles en aluminium.
- Diluant (1*25ml/flacon).
- 20 compte-gouttes jetables.
- 20 tubes de prélèvement.
- 20 écouillons de prélèvement.
- 20 capuchons compte-gouttes jetables.

2. Prélèvement et manipulation des échantillons

- Prélèvement des échantillons :

Prélever un échantillon de selles (environ 500 mg) insérer un écouillon stérile dans les selles présentant le plus de sécrétions.

- Transport et conservation des échantillons :

Les échantillons doivent être analysés au plus vite après le prélèvement. Il ne faut pas utiliser de milieu de transport pour stocker ou transporter les échantillons.

Les selles peuvent être stockées au réfrigérateur entre 2°C et 8°C pendant 72heures.

Si la durée de conservation est plus longue une congélation à -20°C est recommandée.

3. Procédure de test

- Extraction de l'échantillon :
 - ✓ Ramener le dispositif de test et l'échantillon à une température ambiante de 15 à 30 °C avant de procéder au test.
 - ✓ Prélever le diluant jusqu'au trait.
 - ✓ transférer le diluant dans le tube de prélèvement.
 - ✓ Prélever un échantillon de selle à l'aide de l'écouvillon de prélèvement.
 - ✓ Insérer l'écouvillon dans le tube de prélèvement contenant le diluant.
 - ✓ Tourner l'écouvillon dix fois jusqu'à ce que l'échantillon soit bien dissout dans le diluant et jeter l'écouvillon après l'avoir pressé contre la paroi du tube.
 - ✓ Poser le capuchon compte-gouttes sur le tube de prélèvement.

- Déroulement du test :

On fait sortir le dispositif du test de l'emballage en aluminium et on le place sur une surface plate et sèche, on ajoute 3 gouttes de l'échantillon dans le puits d'échantillon du dispositif de test, une bande de couleur violette traverse la fenêtre de résultat, au centre du dispositif de test, au fur et à mesure de son déroulement, pour finir on interprète les résultats du test au bout de 10 à 15 min (il ne faut plus interpréter les résultats après 20 min).

La figure 4 représente le dispositif du déroulement du test.

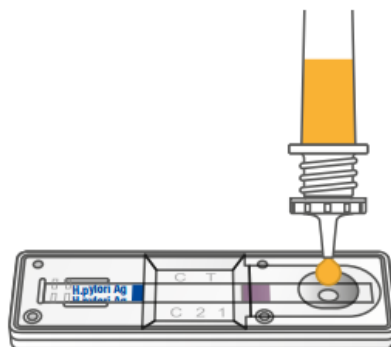


Figure 4 : dispositif du test SD H.pylori Ag.

4. Interprétation du test :

On distingue deux lignes sur le dispositif du test :

- La ligne « c » pour le contrôle.
- La ligne « t » pour le test.

Test positif : deux lignes « c » et « t », sont visibles dans la fenêtre de résultat.

Test négatif : une ligne « c » est visible dans la fenêtre de résultat.

Test invalide : absence de ligne « c » dans la fenêtre de lecture.

La figure 5 représente l'interprétation du test SD H.pylori Ag.

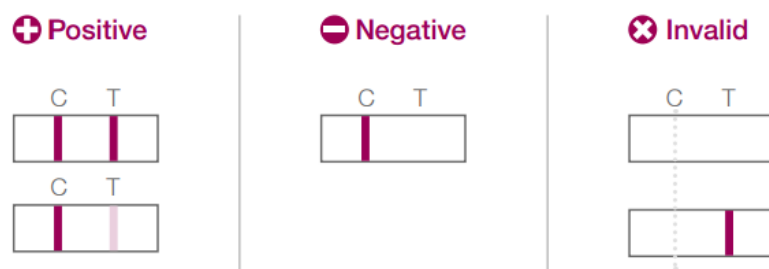


Figure 5 : interprétation du résultat du test SD H.pylori Ag.

III. Test respiratoire (Hkit)

Taukit est un test respiratoire qui contient de l'urée marquée au ^{13}C , il est indiqué pour le diagnostic in vivo à *H.pylori*.

1. Constituants de Taukit :

Chaque boîte de Taukit contient un comprimé soluble de 100 mg de ^{13}C -urée, deux tubes de prélèvement avant-dose (BASAL), deux tubes de prélèvement après-dose (POST) et deux pailles flexibles.

2. Procédure du test

Pour garantir la fiabilité du diagnostic il est important de suivre les instructions de manière précise :

1. Pour commencer le test, on fait boire au patient 200 ml d'une boisson riche en acide citrique (100ml pour les enfants).
2. 10 min plus tard, on réalise le premier prélèvement d'échantillon d'air expiré pour la détermination de la valeur basal :
 - On prend une paille et deux tubes de prélèvement identifiés « BASAL » et on note le nom du patient, le code correspondant et la date ;
 - On débouche le tube et on plonge la paille dans le tube ;
 - On demande au patient d'expirer dans le tube à l'aide de la paille jusqu'à ce qu'une condensation apparaisse au fond du tube ;
 - Et immédiatement après, on rebouche le tube. Si le tube reste ouvert pendant 30s le résultat peut être faussé.
3. On répète l'opération avec le deuxième tube BASAL en suivant le même protocole décrit antérieurement.
4. On prépare la solution du test :
 - Pour les adultes : dissoudre un comprimé d'urée marquée ¹³C dans 125 ml d'eau.
5. On fait boire la solution au patient, en annotant l'heure de l'ingestion.
6. 30 min après l'ingestion de la solution du test, on recueille à nouveau des échantillons d'air expiré dans les tubes identifiés POST, en suivant le même protocole décrit aux points 2 et 3.

IV. Test sérologique (Sheli)

Sheli est un test sérologique basé sur la recherche d'IgG, anticorps circulants, produits lors de la réaction de l'organisme face à la stimulation par *H.pylori*.

Après centrifugation du sang on met 200µl du sérum dans des barrettes en présence d'Ag, on les place dans un automate « mini vidas » qui après analyse affiche le résultat du test.

3^{ème} partie : Résultats et discussions

I. Résultats

1. Fréquence de l'infection par *Helicobacter pylori*

Les analyses de *Helicobacter pylori* du 01 avril 2016 au 01 avril 2017 au sein du **laboratoire d'analyses Médicales Benjelloun** ont donné les résultats suivants :

Le tableau 3 représente le nombre de patients positifs par *H.pylori*.

Tableau 3 : Résultats des analyses d'*Helicobacter pylori* au sein du laboratoire d'analyses médicales **Benjelloun** durant une année.

| | SHELI | hkit | HELS | Total |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|
| Nombre de patients | 57 | 27 | 51 | 135 |
| Nombre de positif | 32 | 6 | 7 | 45 |
| % des positifs | 56.14% | 22.22% | 13.72% | 33.33% |

On remarque que La plupart des résultats positifs sont obtenus par le test sérologique dont ils représentent 56.14%.

22.22% des tests concernant la recherche dans les selles font référence à une présence d'infection par *H.pylori*.

Tandis que seulement 13.72 % des tests respiratoires sont positifs.

En résumé, le dépistage a montré que 33.33% des patients qui ont réalisé l'une de ces analyses sont positifs pour *H.pylori*.

2. Répartition des infections selon l'âge et le sexe

a. Selon le sexe

Le tableau suivant représente la répartition des infections par *H.pylori* selon le sexe :

Tableau 4 : Répartition des atteintes par *H.pylori* selon le sexe par différentes méthodes de diagnostique.

| Technique utilisée | Nombre de patients | Nombre de positifs | Nombre de positifs femmes | Nombre de positifs Hommes | Pourcentage des Positifs | |
|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------|
| | | | | | Femmes | hommes |
| Sheli | 57 | 32 | 23 | 9 | 71.87% | 28.13% |
| Hkit | 51 | 7 | 4 | 3 | 57.15% | 42.85% |
| Hels | 27 | 6 | 4 | 2 | 66.66% | 33.34% |
| Total | 135 | 45 | 31 | 14 | 68.88% | 31.11% |

La répartition selon le sexe montre qu'au total l'infection par *H.pylori* touche plus les femmes que les Hommes.

Selon l'âge

La figure 4 représente la répartition de l'infection par *H.pylori* selon l'âge.

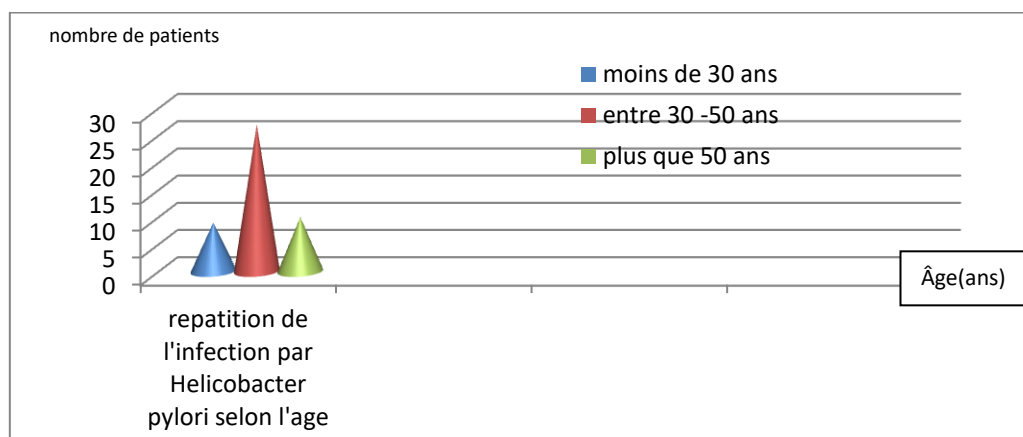


Figure 4 : Répartition d'*H. Pylori* selon l'âge.

La figure4 montre que la catégorie des personnes entre 30 et 50 ans est la plus atteinte par *H.pylori*.

II. Discussion

Cette étude a portée sur 135 patients ayant demandé l'analyse de *H.pylori* sur une période de 12 mois. Les résultats de cette analyse ont montré que 33.33% des patients qui ont effectués l'analyse sont positifs pour *H.pylori* et ce pourcentage varie selon la technique utilisée (Sheli 56.14 %, hkit 22.22 %, Hels 13.72 %).

Une étude antérieure réalisée à l'institut pasteur du Maroc sur 755 patients et utilisant l'examen histologique a montré une prévalence de *H.pylori* de 69% **(9)**.

Notre étude effectuée sur 135 patients montre que 68.88% des patients positifs sont de sexe féminin au moment où les hommes ne représentent que 31.11% des infections diagnostiquées par l'une des trois méthodes non invasives disponibles dans le laboratoire. Ce pourcentage varie en fonction de la technique utilisée.

Dans étude réalisée à l'IPM **(9)** indique que le sexe n'a aucun effet sur la prévalence de l'infection par *H. pylori*.

En ce qui concerne la répartition selon l'âge notre analyse a montré que la tranche d'âge la plus concernée par l'infection est la tranche entre 30-50ans.

Ces résultats vont dans le même sens que celui de l'étude qui a été effectuée à l'IPM qui indique que la plupart des infections concernent les patients de 40 à 50 ans **(9)**.

4^{ème} partie : conclusion

Conclusion

Helicobacter pylori est une bactérie Gram négatif sous forme spirale dont le réservoir principal est l'estomac de l'Homme, elle est caractérisée par sa résistance à l'acidité gastrique.

Notre étude a porté sur 135 patients qui ont demandé l'analyse de *H.pylori* pendant une année et cela du « 01 avril 2016 au 01 avril 2017 ».

Notre analyse a montré que la fréquence des positifs pour *H.pylori* est de 33.33%, et que cette fréquence varie en fonction de la technique utilisée : Sheli 56.14 %, hkit 22.22 %, Hels 13.72 %.

En ce qui concerne la répartition selon le sexe notre étude a montré que cette infection par *Helicobacter pylori* a une prépondérance féminine.

La répartition selon l'âge a montré que la tranche la plus infectée est ente 30 et 50 ans.

Références bibliographiques

- 1- Frenck RW Jr, Clemens J (2003) Helicobacter in the developing world. *Microbes Infect* 5(8):705–713
- 2- Sobhani I. **Helicobacter pylori** et cancer gastrique. *Médecine/Sciences* 2003;19:431-6.
- 3- - Delchier JC. Les lésions pré-cancéreuses gastriques : quelle prévention ? *Gastroenterol Clin Biol* 2004;28(5):172-7
- 4- Sibony M, Jones NL. Recent advances in Helicobacter pylori pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2012;28:30-5.
- 5- Braden B. Diagnosis of Helicobacter pylori infection. *BMJ* 2012;344:44-46
- 6- Ramanampamonjy RM, Randria MJD, Razafimahefa SH, et al.. Séroprévalence de l'infection due à Helicobacter pylori dans un échantillon de population malgache. *Bull Soc Pathol Exot* 2007; 100:57-60.
- 7- Hunt RH, Xiao SD, Megraud F, et al.. Helicobacter Pylori in developing countries. World Gastroenterology Organisation Global Guideline. *J Gastrointestin Liv Dis* 2011;20:299-304.
- 8- MakristathisA, Hirschl AM, Lehours P, et al.. Diagnosis of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2004;9:7-14.
- 9- Attaf N, Cherkaoui N, Choulli M.K. Ghazali L, Mokhtari A. Soulaymani. A Profil épidémiologique de l'infection à Hélicobacter pylor dans la région de Gharb-ChrardaBeni Hssen. *Biologie et santé* 2004 ; 4 (1) : 25-34.

Webographie

Figure 1 : <http://www.microbes-edu.org/etudiant/etudiants.html>

Figure 2 : <http://www.teryon.com/patologias-medicina-biologica/digestivo/infeccion-gastrica-por-helicobacter-pylori>

