



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)

**INITIATION AUX TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE
(PCR) POUR LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION A
*HELICOBACTER PYLORI***

Présenté par : BOUBRIK Chifae

Encadré par : Pr. SEFRIQUI Samira

Pr. BENNANI Bahia

Soutenu le : 06/07/2021

Devant le jury composé de :

- **Pr. SEFRIQUI Samira**
- **Pr. EL ABIDA Kaouakib**
- **Pr. BENNANI Bahia**

Stage effectué à : Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès
Laboratoire de biologie moléculaire et de microbiologie

Année universitaire 2020-2021

Dédicace :

Je tiens à dédier ce travail :

- *À mes parents* : les personnes les plus chères au monde, aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler, qui m'ont encouragé durant toutes ces années, je leurs exprime mes sentiments d'amour, de respect, et de reconnaissance pour leurs prières et énormes sacrifices. Que Dieu leur procure bonne santé et longue vie.
- *Mon frère et ma sœur* : Anas et Remayssae pour leur aide psychique
- *Ma grand-mère et mes tantes* : qui ne cessent de prier pour moi
- *Mes professeurs* : sans exception, pour leurs efforts déployés afin de nous assurer une excellente formation, merci pour votre patience, vos conseils et vos encouragements.
- *Mes collègues* : pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble cette année, et les informations que nous avons partagé sans avarice.

À tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

Remerciement :

Je tiens à exprimer mes remerciements et mes sentiments de gratitude à :

- Dieu, le tout-puissant, qui m'a donné la force pour supporter et affronter les difficultés que j'ai rencontrées et arriver à ce jour-là.
- Pr. SEFRIOUI Samira qui a encadré ce travail et qui n'a cessé de nous contacter durant toute la période de stage pour arriver à ce résultat. Merci pour vos orientations, informations, conseils ainsi que l'encadrement spécial.
- Pr. BENNANI Bahia qui m'a donné l'occasion de passer un stage aussi riche, qui m'a accueilli avec bienveillance et eu accepté de diriger ce travail et de répondre à toutes mes questions.
- M^{lle} SOUAD, la doctorante au sein du laboratoire de biologie moléculaire et microbiologie qui nous a accompagné depuis notre premier jour de stage, pour ses informations que nous n'avons pas épargnées, ses conseils et son énergie positive qu'elle nous a donné.
- Mes remerciements s'adressent aussi aux doctorants de la faculté de médecine et de pharmacie Fès, surtout ceux qui ont répondu favorablement à mes questions.

Je tiens à remercier sincèrement les membres du jury qui me font le grand honneur d'évaluer ce travail.

Table des matières

- Liste des abréviations	
- Liste des figures	
- Présentation de la structure d'accueil	
- Introduction	1

Chapitre 1 : Etude bibliographique 2

I.	Histoire de <i>Helicobacter pylori</i>	2
II.	Généralités sur <i>Helicobacter pylori</i>	3
1.	Taxonomie	3
2.	Épidémiologie	3
a)	Réservoir	3
b)	Mode de transmission	3
c)	Prévalence de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i>	4
3.	Morphologie	4
4.	Caractères culturels	4
5.	Caractéristiques biochimiques	5
6.	Génome et diversité génétique	5
7.	Facteurs de virulence	6
8.	Pathogénicité et toxicité	7
III.	Diagnostic d' <i>H. pylori</i>	8
1.	Méthodes non invasives	8
a)	La recherche d'antigènes dans les selles	8
b)	La sérologie	8
c)	Test respiratoire à l'urée marquée	9
2.	Méthodes invasives	9
a)	Endoscopie et biopsie	9
b)	Histologie	10
c)	La culture	10
d)	Test rapide à l'uréase	10
e)	PCR (réaction de polymérisation en chaîne)	10
IV.	Pathologies induites par <i>H. pylori</i>	11
1.	Gastrite	11
2.	Ulcère duodéal	11
3.	Ulcère gastrique	11

4. Lymphome gastrique	12
5. Adénocarcinome gastrique	12
V. Prévention et traitements	12
1. Prévention	12
2. Traitements	12
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	14
I. Matériel et méthodes	14
1. Extraction de l'ADN d' <i>H. pylori</i>	14
2. Purification	15
3. PCR	16
a) Principe	16
b) Protocole d'amplification.....	16
4. Électrophorèse	18
a) Principe	18
b) Préparation du gel d'agarose	19
c) Révélation des produits PCR	19
II. Résultats	20
1. Profil épidémiologique des biopsies	20
a) Description des patients	20
b) Répartition de l'infection à <i>H. pylori</i> par le gène glmM	20
c) Répartition des pathologies gastriques à <i>H. pylori</i> par le gène VacA	21
d) Génotypage de la région c du gène VacA de <i>H. pylori</i>	22
2. Corrélation du génotypage avec pathologies gastriques.....	23
3. Discussion	24
III. Conclusion	25
Références bibliographiques	26

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
CHU	Centre hospitalier universitaire
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
CO ₂	Dioxyde de carbone
SH ₂	Sulfure d'hydrogène
SAT	Stool antigen test
EIA	Essais immunoenzymatiques
ICA	Essais immunochromatographiques
UBT	Test respiratoire à l'urée
RUT	Test rapide à l'uréase
rpm	Rotations par minute
IPP	Inhibiteur de la pompe à proton
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
VacA	Vacuolating Cytotoxin Agent A
dNTP	désoxyribonucléoside triphosphate
ureC	Uréase subunit alpha
glmM	Phosphoglucosamine mutase
PBS	Phosphate buffered saline
Tris-HCl	Trisaminométhane hydrochloride
TE	Tris-EDTA
pb	Paire de base
TBE	Tris-Borate-EDTA

Liste des figures

Figure 1 : Barry Marshall (à gauche) et Robin Warren (à droite)	page 2
Figure 2 : Morphologie d' <i>Helicobacter pylori</i>	page 4
Figure 3 : Colonies de <i>H. pylori</i> sur gélose au sang	page 5
Figure 4 : La muqueuse gastrique colonisée par <i>H. pylori</i> , examinée par microscope électronique à balayage	page 7
Figure 5 : Autoclave	page 14
Figure 6 : La hotte	page 14
Figure 7 : a : centrifugeuse / b : vortex / c : plaque chauffante	page 15
Figure 8 : La hotte PCR	page 17
Figure 9 : Image d'un gel d'agarose 1.5% montrant les produits d'amplification obtenus par les couples d'amorces UrecB/Urec1, c1-F/R-nd et c2-F/R-nd	page 19
Figure 10 : Répartition des pathologies gastriques dans les échantillons étudiés	page 20
Figure 11 : Répartition d' <i>H. pylori</i> par le gène glmM	page 21
Figure 12 : Prévalence d' <i>H. pylori</i> en fonction des atteintes gastriques	page 22
Figure 13 : Répartition des types d'allèles dans les échantillons positifs.....	page 22
Figure 14 : corrélation du typage avec pathologies gastriques	page 25

Liste des tableaux

Tableau 1 : Performances des méthodes non invasives	page 9
Tableau 2 : Performances des méthodes invasives	page 11
Tableau 3 : Conditions du PCR du gène glmM	page 17
Tableau 4 : Conditions du PCR VacA.....	page 18
Tableau 5 : Amorces des gènes glmM et VacA c1/c2	page 18
Tableau 6 : Incidence des pathologies gastriques chez les sujets étudiés	page 20
Tableau 7 : Prévalence de l'infection à <i>H. pylori</i>	page 21
Tableau 8 : pourcentage des différentes pathologies gastriques liées à la région c du gène VacA	page 21
Tableau 9 : Pourcentage des différents allèles de la région c du gène vacA de <i>H. pylori</i>	page 22
Tableau 10 : Corrélation des sous types aux pathologies gastriques	page 23



Présentation de la structure d'accueil

La faculté de médecine et de pharmacie de Fès est un établissement dépendant de l'Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Elle a été inaugurée par SA MAJESTÉ LE ROI MOHAMMED VI le 20 octobre 1999.

La faculté s'étend sur une superficie de Trois hectares et demi, sa surface construite est de 17 893 m². Elle comprend [20] :

Le Service des Affaires Générales :

Ce service gère les dossiers à caractère général, notamment :

- Les statistiques générales ;
- Les relations Faculté - Centre Hospitalier Universitaire.

Le Service des affaires économiques

Le Service des ressources humaine

Le Service de la Gestion des Cours et des Examens

Le Service des Affaires Estudiantines

Le Centre de Documentation et de l'Information Médicales (CDIM)

Le Service Informatique

La faculté dispose de différents locaux d'enseignements qui sont :

- Douze laboratoires de travaux pratiques et de recherches dont le laboratoire de biologie moléculaire et de microbiologie où ce stage s'est déroulé
- Quatre amphithéâtres
- six salles de séminaires
- des salles de travaux dirigés
- une salle pour travaux pratiques d'informatique
- une salle de recherche de l'information et de réseaux externes
- une salle de thèse
- un Centre de Formation Médicale continu avec sa salle polyvalente pour le déroulement des conférences ; équipée d'un système multimédia et de matériel de traduction simultanée et de projection.

Introduction

La biologie moléculaire est omniprésente en biologie médicale et plus particulièrement en microbiologie, de nombreuses études démontrent son importance dans le domaine du diagnostic.

Depuis l'invention de la technique d'amplification par PCR en 1983, la biologie moléculaire s'est implantée rapidement dans les laboratoires de microbiologie clinique.

Dans l'étude d'*Helicobacter pylori* qui est un problème de santé publique selon l'organisation mondiale de la santé, qui estime sa prévalence à 50% dans le monde et 80% en Afrique, on a recouru à des techniques de biologie moléculaire pour le diagnostic de cette bactérie, qui est maintenant bien établi que c'est une bactérie gram négative de forme spirochète, découverte dans l'estomac de cadavres humains et de mammifères ; c'est un microorganisme pathogène de la muqueuse gastrique, qui est incriminé dans la gastrite aiguë et chronique et dans la maladie ulcéreuse peptique. Il semble aussi être impliqué dans le cancer gastrique.

Les maladies gastriques désignent l'ensemble des pathologies et des lésions qui touchent l'estomac. Elles incluent les ulcères gastriques (plaies qui ne cicatrisent pas), le reflux gastro-œsophagien, le cancer et également la gastrite, l'inflammation de la muqueuse de l'estomac.

Après la découverte de *H. pylori* dans l'estomac humain, les pathologies gastriques ont été bouleversées. Le rôle pathogène de cette bactérie au niveau de la muqueuse gastrique a été largement étudié. Par conséquent, son implication dans les maladies gastriques les plus sévères de types tumorales a été confirmée.

Cette étude a été réalisée au Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès en collaboration avec les services Gastro-Entérologie et d'Anatomie Pathologique du CHU Hassan II de Fès. Elle a pour objectif de valider les protocoles à base de biologie moléculaire particulièrement la technique de PCR par le génotypage de la région c du gène VacA avec les pathologies gastriques en passant par une détection des infections à *H. pylori* positives et négatives.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

I. Histoire de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori est une bactérie présente dans l'estomac depuis l'origine de l'humanité, mais la communauté médicale pensait que c'est impossible qu'une bactérie résiste à l'acidité de l'estomac bien longtemps ; ils pensaient que les maladies de l'estomac sont liées à un régime alimentaire inadéquat ou au stress.

En 1982, Barry Marshall et Robin Warren (**Figure 1**) ont réussi, pour la 1^{ère} fois, de faire une culture d'une bactérie résidante de l'estomac humain [1].

Après des études morphologiques de la bactérie détectée, cette dernière a été nommée *Campylobacter pylori* vu sa morphologie et son caractère micro aérophile comparables à ceux de *Campylobacter jejuni*. Puis, après des études, le séquençage de l'ADN de cette bactérie a montré qu'elle n'appartenait pas au genre *Campylobacter*, elle est placée dans un nouveau genre : *Helicobacter*.

En 1906, un médecin Allemand a observé pour la première fois des bactéries spiralées dans l'estomac humain mais les scientifiques restaient convaincus de la stérilité gastrique.

En 1994 et après des recherches, les scientifiques Warren et Marshall ont affirmé que la plupart des ulcères de l'estomac étaient causés par une infection de cette bactérie, plutôt que par le stress ou le régime alimentaire, comme on le pensait auparavant.

En 2005, Marshall et Warren ont reçu le prix Nobel en 2005 pour cette découverte qui a permis d'accélérer le traitement des ulcères avec des antibiotiques au lieu de n'utiliser que des antiacides comme auparavant [1].

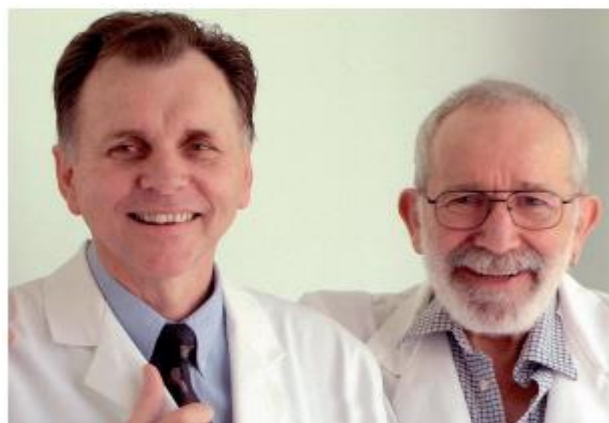


Figure 1 : Barry Marshall (à gauche) et Robin Warren (à droite) [1]

II. Généralités sur l'*Helicobacter pylori*

1. Taxonomie

H. pylori est une bactérie appartenant au [2] :

Règne : *Bacteria*

Embranchement : *Proteobacteria*,

Classe : *Epsilon proteobacteria*,

Ordre : *Campylobacterales*,

Famille : *Helicobacteraceae*

Genre : *Helicobacter*

Espèce : *Helicobacter pylori*

2. Épidémiologie

a. Réservoir

Le milieu de transmission de cette bactérie n'a pas encore été déterminé, bien que plusieurs études aient émis l'hypothèse que la cavité buccale constitue un réservoir pour *H. pylori*. D'autres ont également signalé que la cavité buccale peut être une source de transmission gastrique et de réinfection ; cependant, ces résultats sont controversés. Nous avons passé en revue la littérature et sélectionné les études qui rapportent une association entre les détections d'*H. pylori* dans la cavité buccale (plaque dentaire, salive, langue, tissu amygdalien, canaux radiculaires, muqueuse buccale) chez l'homme et chez l'animal, ainsi que dans l'estomac humain.[3]

La cavité buccale peut être considérée comme le principal réservoir de cette bactérie. Il existe une corrélation entre l'infection par *H. pylori* dans la cavité buccale et les maladies parodontales, l'inflammation des tissus buccaux, et la réinfection gastrique. Les chercheurs pensent que la bouche est un réservoir et qu'elle joue un rôle crucial dans la transmission de *H. pylori* et l'infection gastrique.

H. PYLORI CHEZ LES ANIMAUX : UN RÉSERVOIR POSSIBLE : Selon Momtaz [3], on a constaté que les vaches et les moutons avaient *H. pylori* dans leurs tissus gastriques. Les auteurs émettent également la théorie que les moutons pourraient être le réservoir naturel de la bactérie et être la source d'*H. pylori* dans les populations humaines.

b. Mode de transmission

Le mode de transmission de *H. pylori* est encore largement inconnu, l'infection ayant tendance à être contractée à un jeune âge. Il est possible que l'infection soit transmise par différentes voies ;

la transmission de personne à personne se fait potentiellement par la voie fécale-orale et/ou gastro-orale chez les enfants, et par la voie orale-orale chez les adultes. Dans les pays en développement, l'infection peut se faire par l'eau. Les pratiques culturelles et les facteurs environnementaux peuvent influencer le mode de transmission dans différentes populations humaines [4].

Certaines études suggèrent que l'infection par *H. pylori* peut également être contractée dans l'environnement, soit par l'eau, soit par les animaux. La transmission par l'eau est possible ; on a constaté que les formes coccoïdes des micro-organismes pouvaient survivre jusqu'à un an dans l'eau d'une rivière, et les formes spiralées jusqu'à 10 jours dans l'eau d'une rivière froide [5]. Des études épidémiologiques semblent confirmer cette possibilité ; chez les enfants péruviens buvant l'eau d'une citerne, la prévalence de l'infection est beaucoup plus élevée que chez les enfants buvant l'eau du robinet [6].

c. Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori*

La variabilité de la prévalence de cette infection dépend de plusieurs facteurs, les plus importants étant l'âge et les conditions socio-économiques du pays. Cependant, elle est très fréquente dans les pays en voie de développement et sa prévalence peut atteindre 90% [7]. Cette forte prévalence est liée, entre autres, aux conditions sanitaires et l'absence de prévention et traitement.

3. Morphologie

H. pylori est légèrement plus grande que les autres espèces, (0,5-1,0 x 2,5-5 µm) et est en forme d'un bâton, d'une spirale ou d'un "arc de bœuf" (**figure 2**), au cours de la culture, elle prend la forme coccoïde, qui est une forme de résistance, pour permettre à cette bactérie de survivre dans un environnement hostile. Lophotriche (jusqu'à 5 flagelles) ou monotriche, parfois sous les deux formes dans les populations [3].



Figure 2 : Morphologie d'*Helicobacter pylori* [1]

4. Caractères cultureux

H. pylori pousse sur les milieux pour les campylobactéries, mais il pousse mieux sur la gélose "au chocolat", se formant après 2-7 jours. Le diamètre des colonies est de 0,5-1,0 mm.

Sur une gélose au sang, une faible hémolyse est observée (**figure 3**). Pour la croissance, des conditions micro-aérophiles ou une atmosphère enrichie en CO₂ sont nécessaires. Dans des conditions aérobies ou anaérobies, les bactéries ne se développent pas [8].

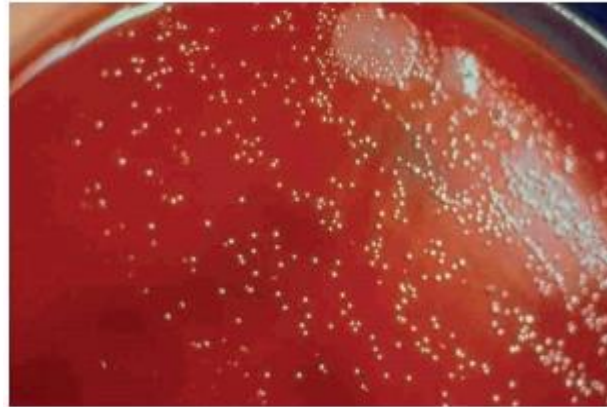


Figure 3 : Colonies de *H. pylori* sur gélose au sang [1]

5. Caractéristiques biochimiques

L'Helicobacter pylori est un pathogène bactérien Gram-négatif mobile, en forme d'hélice, micro-aérophilique et pathogène, capable de se transformer d'une forme spirale en une forme coccoïde pour favoriser sa survie.

Oxydase +, Catalase +, le sulfure d'hydrogène ne se forme pas (SH₂ -).

La principale caractéristique est : Uréase + : transforme l'urée en ammoniac et en dioxyde de carbone : Grâce à sa forme hélicoïdale et à ses flagelles, la bactérie se glisse à travers le mucus et parfois les muqueuses de l'estomac en se fixant sur les cellules épithéliales grâce à des adhésines, alors elle sécrète une enzyme appelée « uréase ».

L'ammoniac issu de la transformation de l'urée neutralise l'acidité gastrique qui est bénéfique pour la digestion tout en tuant la plupart des bactéries. Cet ammoniac, toxique pour les cellules épithéliales, va concorder avec d'autres produits sécrétés par *H. pylori* (protéases, catalases, phospholipases...), endommager la surface des cellules épithéliales, déclenchant ainsi la formation des ulcères [3].

6. Génome et diversité génétique

Le génome de *H. pylori* est séquencé depuis 1997 : il possède 1 667 867 paires de bases codant pour 1590 protéines essentielles. Environ 30% des gènes de *Helicobacter pylori* sont spécifiques à l'espèce et une grande variabilité génétique peut être retrouvée entre les différentes souches.

Cette hétérogénéité se manifeste par des taux de mutation et de recombinaison importants, par l'acquisition d'ADN étranger (endogène ou exogène à l'espèce) et par des différences au niveau de

l'organisation des gènes. *Helicobacter pylori* possède environ 1200 gènes communs à toute l'espèce et 200 à 400 gènes présents de manière variable selon les souches. La majorité des différences génétiques est retrouvée dans la zone de plasticité et dans l'îlot de pathogénicité *cagA* [8].

Parmi les gènes de cette bactérie, le gène *ureC*, renommé *glmM* par De Reuse et al. en 1997 [9], code pour la phosphoglucosamine mutase, une enzyme catalysant l'interconversion de la glucosamine-6-phosphate en glucosamine-1-phosphate, qui est ensuite transformée en N-acétylglucosamine [9]. Bien que l'amplification par PCR de *glmM* puisse détecter *H. pylori*, les chercheurs ont déterminé qu'elle a également détecté un certain nombre d'autres espèces de *Helicobacter*.

7. Facteurs de virulence

La virulence d'*H. pylori* réside dans sa capacité d'adhérer aux cellules épithéliales et à continuer d'exister tout en combattant l'acide gastrique et en évitant la réponse immunitaire ; l'agent pathogène attaque la muqueuse gastrique.

Quatre facteurs de virulence sont actuellement identifiés : *cagA* qui code pour un gène immunodominant ; *vacA* qui est à l'origine de différentes activités cellulaires à savoir la formation des canaux membranaires et l'apoptose ; *OipA* qui est impliqué dans le développement du cancer gastrique ; et *DupA* qui favorise l'apparition de l'ulcère duodéal [10].

Parmi les facteurs qui favorisent la colonisation :

- ***La mobilité :***

C'est un facteur indispensable à la survie et la colonisation de cette bactérie, en lui permettant de se propager à travers le mucus. Cette mobilité est assurée par les flagelles qui sont protégées de l'acidité gastrique par une gaine qui les entoure [10].

- ***Activité uréasique :***

H. pylori possède un système de résistance qui lui permet de survivre dans l'estomac malgré son pH qui varie entre 4 et 6.5 ; cette résistance est due à l'activité uréasique d'*H. pylori* qui permet de transformer l'urée de l'estomac en ammoniac, ce dernier va neutraliser partiellement l'acidité gastrique ce qui va protéger la bactérie et créer pour elle un environnement favorable pour son développement [10].

- ***Adhérence bactérienne :***

L'adhérence bactérienne est assurée par des interactions spécifiques entre les adhésines bactériennes qui sont codées par des gènes tels que : *babA*, *babB*, *alpA*, *alpB* et *sabA* et la cellule hôte.

Cette adhérence à l'épithélium de l'estomac protège la bactérie des mouvements gastriques et lui permet d'être en contact avec les éléments nutritifs de la cellule hôte endommagée [10].

- **Persistence de la bactérie :**

Après l'adhérence d'*H. pylori* dans la muqueuse gastrique, une réponse immunitaire est provoquée contre la bactérie. Cependant, *H. pylori* peut s'échapper de cette réponse immunitaire, ceci lui permettra la colonisation grâce à un équipement enzymatique spécifique : la catalase, la superoxyde dismutase et l'alkylhydroperoxyde [10].

- **Autres enzymes :**

La colonisation d'*H. pylori* est favorisée par certaines enzymes qui fragilisent la barrière protectrice du mucus.

H. pylori a une activité protéasique et peut détruire les protéines entrantes dans la composition du mucus appelée mucine, il a également une activité lipase participant aux changements dans la structure des phospholipides de l'épithélium gastrique [10].

8. Pathogénicité et toxicité

H. pylori n'est pas invasif, mais il colonise la cavité gastrique humaine et la muqueuse gastrique (**figure 4**), où il libère des protéines pathogènes et induit des dommages cellulaires et une inflammation. Cette affection peut entraîner des symptômes cliniques d'infections, tels qu'un ulcère duodéal ou un adénocarcinome gastrique. D'autres maladies courantes causées par une infection comprennent la gastro-entérite, la gastrite diffuse et le cancer gastrique. Selon l'organisation mondiale de la santé, *Helicobacter pylori* est une sorte d'une bactérie cancérogène. Si l'hôte n'est pas traité correctement, l'infection durera toute une vie et entraînera l'évolution de la gastrite chronique en un ulcère gastroduodéal. Le taux de mortalité varie selon les pays et l'âge, mais est généralement faible, environ 2-4% [8].



Figure 4 : La muqueuse gastrique colonisée par *H. pylori*, examinée par microscope électronique à balayage [1]

III. Diagnostic d'*H. pylori*

Les différentes méthodes du diagnostic d'*H. pylori* sont regroupées dans le schéma suivant :

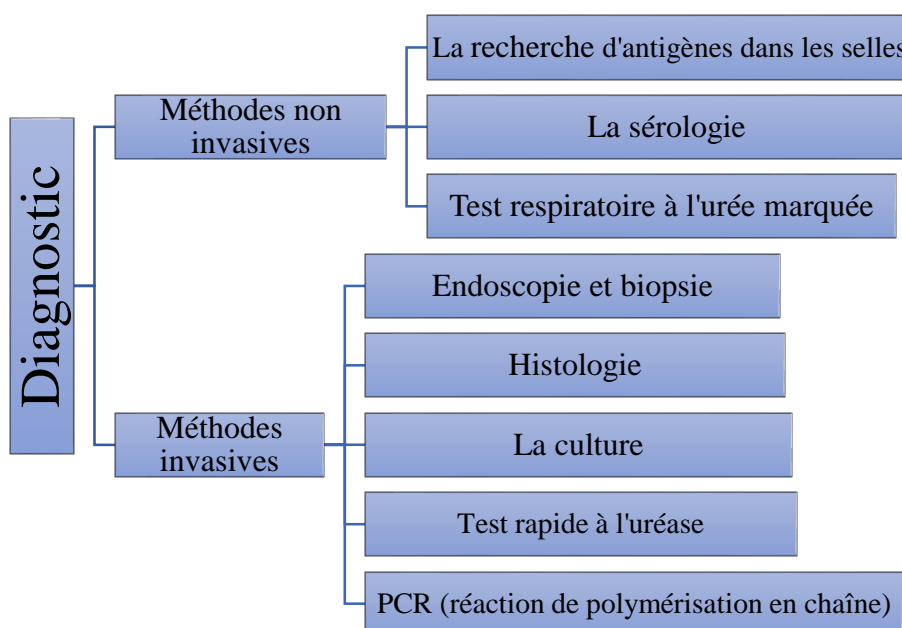


Schéma 1 : différentes méthodes de diagnostic d'*H. pylori*

1. Méthodes non invasives

Sont des examens qui ne nécessitent aucune effraction de la peau, comme les prélèvements du sang, des selles ou injection d'un produit.

a) La recherche d'antigènes dans les selles

Le test d'antigène des selles (stool antigen test SAT) est une méthode non invasive présentant une bonne sensibilité et une bonne spécificité. Cette méthode détecte la présence d'antigènes d'*H. pylori* dans les selles.

Il existe deux méthodes utilisées pour la détection d'*H. pylori* : les méthodes basées sur les essais immunoenzymatiques (EIA) et les essais immunochromatographiques (ICA), qui utilisent soit des anticorps polyclonaux, soit des anticorps monoclonaux. En général, les tests basés sur les anticorps monoclonaux sont plus précis que les tests basés sur les anticorps polyclonaux, et les tests basés sur les essais immunoenzymatiques fournissent des résultats plus fiables que les tests basés sur les essais immunochromatographiques [11].

b) La sérologie

C'est un test basé sur la détection d'anticorps IgG anti-*H. pylori*. Ce test est fréquemment utilisé car il est peu coûteux, rapide et acceptable par les patients, mais, ce test n'est pas fiable pour détecter

l'infection car les anticorps peuvent persister dans le corps pendant une longue période, donc on ne peut pas distinguer entre une infection active et une exposition passée à *H. pylori* [11].

c) Test respiratoire à l'urée marquée

Le test respiratoire à l'urée (UBT) reste le test non invasif le plus populaire et le plus précis pour diagnostiquer l'infection à *H. pylori*. En raison de l'activité uréase de cette bactérie, l'urée marquée au ¹³C ou ¹⁴C ingérée par le patient est hydrolysée en CO₂ marqué dans l'estomac, puis le CO₂ marqué est absorbé par le sang et exhalé par la respiration, de sorte qu'on peut mesurer le CO₂ marqué [11].

Tableau 1 : Performances des méthodes non invasives

Performances	La recherche d'antigènes dans les selles	La sérologie	Test respiratoire à l'urée marquée
Diagnostic pré-thérapeutique	Spécificité : excellente Sensibilité : selon conditions et expériences	Excellente pour certains Kits Mauvaise pour tous les tests rapides	Excellent
Contrôle éradication	Bonne	Inadaptée	Excellent
Caractéristiques	Recommandée en contrôle d'éradication chaque fois que les tests respiratoires ne sont pas possibles	Recommandée pour le test initial quand les autres tests sont mis en défaut	Arrêt des IPP pendant 2 semaines

2. Méthodes invasives

Ce sont des examens nécessitant une lésion de l'organisme.

a) Endoscopie et biopsie

L'endoscopie est généralement utilisée pour diagnostiquer les maladies liées à *H. pylori* telles que l'ulcère gastroduodéal, la gastrite atrophique, le lymphome du MALT et le cancer gastrique. L'endoscopie est également un instrument couramment utilisé ; des échantillons de muqueuse gastrique sont généralement prélevés à partir d'une biopsie pour des recherches plus approfondies dans d'autres tests invasifs, notamment des tests rapides d'uréase, l'histologie, la culture et les méthodes moléculaires (PCR).

La distribution inégale d'*H. pylori* dans l'estomac conduit inévitablement à des erreurs d'échantillonnage dans les examens basés sur les biopsies [11].

b) Histologie

L'histologie est la première méthode utilisée pour la détection d'*H. pylori*, c'est une technique avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité ; elle est utilisée pour évaluer les lésions histologiques de la muqueuse gastrique [11].

c) La culture

La culture d'*H. pylori* à partir d'un échantillon de biopsie gastrique est une méthode spécifique et sensible. A cause de la nature délicate de cette bactérie, sa culture in-vitro nécessite un milieu de croissance, un milieu de transport et un environnement d'incubation spécifique.

Le diagnostic d'*H. pylori* à partir d'un milieu de culture repose sur les caractéristiques morphologiques de la bactérie et les activités positives de l'uréase, la catalase, et l'oxydase. Ainsi cette méthode permet d'établir un antibiogramme et étudier la résistance d'*H. pylori* à différents antibiotiques [11].

d) Test rapide à l'uréase

C'est le test invasif le plus utilisé pour diagnostiquer une infection à *H. pylori*, car il est peu coûteux, rapide, hautement spécifique, facile à réaliser et largement disponible. Basé sur l'activité uréasique de cette bactérie capable de convertir le réactif du test d'urée en ammoniac, provoquant une augmentation du pH et changement de couleur sur le moniteur du pH [11].

e) PCR (réaction de polymérisation en chaîne)

La PCR est une méthode largement utilisée à partir d'échantillons de biopsies gastriques, de salive, des selles ... ; elle présente une excellente spécificité et sensibilité par rapport aux autres tests.

Plusieurs gènes cibles sont utilisés pour détecter l'infection à *H. pylori* (VacA, UreC (glmM), UreA, ARNr 16S, ARNr 23S...).

Parmi les avantages de la PCR : l'évitement des résultats faussement positifs, le nombre réduit de bactéries nécessaires dans l'échantillon, et la rapidité des résultats [11].

Tableau 2 : Performances des méthodes invasives

Performances	Endoscopies et biopsies	Culture	Test rapide à l'uréase	PCR
Diagnostic pré-thérapeutique	Excellente	Spécificité : excellente Sensibilité : selon conditions et expériences	Bonne	Excellente
Contrôle éradication	Bonne	Bonne	Sensibilité insuffisante	Données insuffisantes
Caractéristiques	Dépendant de la densité bactérienne et les lésions de la muqueuse détectée	L'antibiogramme est demandé chaque fois que possible	Rapide, non utilisable en contrôle éradication	Détection du gène de résistance clarithromycine et fluoroquinolones

IV. Pathologies induites par *H. pylori*

H. pylori induit plusieurs pathologies, dont les plus connues sont :

1. Gastrite

Est le résultat de la réponse immunologique et inflammatoire due à l'infection à *H. pylori* [10].

2. Ulcère duodéal

La présence d'*H. pylori* induit une augmentation de la sécrétion d'acide gastrique, ainsi, la muqueuse duodénale déjà affaiblie par les îlots de métaplasie gastrique est soumise à une grande concentration d'acide favorisant alors l'apparition de l'ulcère duodéal [10].

3. Ulcère gastrique

L'ulcère gastrique est généralement situé au niveau de la petite courbure où la vascularisation est terminale. La gastrite causée par *H. pylori* est à l'origine d'ischémie ; la bactérie stimule la production de *Platelet activating factor* qui provoque une thrombose artérielle [10].

4. Lymphome gastrique

Au cours de la gastrite chronique induite par *H. pylori*, un afflux massif de lymphocyte arrivera au niveau de l'estomac, qui est normalement dépourvue de lymphocytes, dont l'activation favorise l'apparition de lymphome. Ce dernier provoque une destruction des glandes gastriques et conduit à la formation des lésions épithéliales tumorales [10].

5. Adénocarcinome gastrique

H. pylori induit une métaplasie intestinale au niveau de l'estomac, ce qui explique la fréquence des cancers gastriques. Il est également à l'origine d'une atrophie gastrique généralisée.

Plusieurs substances sont responsables de la mutation au niveau des cellules épithéliales notamment l'ammoniac, les phospholipases et les cytotoxines, qui peuvent causer des cancers gastriques [10].

V. Prévention et traitements

1. 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 [10].

2. Traitements

Trois étapes sont suivies pour traiter l'infection à *H. pylori* :

- ***Traitement d'éradication :***

Le but de ce traitement est d'obtenir une cicatrisation de l'ulcère gastroduodéal et de prévenir la survenue du cancer gastrique.

Le choix du traitement d'éradication doit tenir compte de plusieurs facteurs, parmi lesquels : la prévalence de l'infection à *H. pylori*, la prévalence du cancer gastrique, la résistance aux antibiotiques, le cout du traitement et les possibilités financières du patient, l'allergie et la tolérance médicamenteuse, et les effets secondaires [10].

- ***Le traitement d'éradication de première ligne :***

Le traitement d'éradication est basé sur l'association d'un inhibiteur de la pompe à protons à deux antibiotiques (amoxicilline-métronidazole pendant 14 jours ou amoxicilline-clarithromycine pendant 7 jours). Il s'agit du traitement standard universel [10].

- ***Le traitement en cas d'échec d'éradication :***

Après l'échec d'une trithérapie par IPP-amoxicilline-clarithromycine pendant 7 jours, un traitement substituant la clarithromycine par le métronidazole pour une durée de 10 jours peut être proposé. Une trithérapie combinant IPP-métronidazole-tétracycline ou une quadrithérapie associant IPP-métronidazole-sels de bismuth et tétracycline peuvent également être proposés. Après l'échec d'un traitement associant IPP-amoxicilline-métronidazole la substitution du métronidazole avec de la clarithromycine peut être une alternative [10].

Après deux échecs successifs, il sera nécessaire de détecter la résistance aux antibiotiques par un antibiogramme.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès sur une période de 8 semaines allant du 26/04/2021 au 18/06/2021. Ce travail porte sur 100 échantillons de biopsies gastriques provenant du service gastro-entérologie pour les patients éligibles. L'identification de cette bactérie se fait par amplification d'une région du gène glmM. Les échantillons positifs sont utilisés pour étudier les différentes pathologies gastriques liées à la région c du gène de virulence VacA.

Pour l'étude de ces gènes, la technique d'amplification génique (PCR) est utilisée.

- Stérilisation du matériel



L'autoclave sert à stériliser le matériel (**figure 5**) dont on a besoin pendant toutes les manipulations, à savoir les tubes Eppendorfs et les cônes.

En général, la stérilisation dure 1h dont 30 min pour que la température augmente à 121.5°C, puis 25 min pour que la chaleur associée à l'humidité dénature les protéines et détruit les germes, et le temps qui reste pour le séchage et le refroidissement.

Figure 5 : Autoclave

1. Extraction de l'ADN d'*H. pylori* :

Pour extraire l'ADN à partir d'une biopsie, les étapes suivantes sont exigées :

- Broyage

Les biopsies conservées dans un liquide physiologique PBS, sont broyées avec les bâtonnets stériles contre la paroi du tube Eppendorf jusqu'au broyage total quand le milieu devient homogène. Cette opération se déroule dans une hotte (**figure 6**).

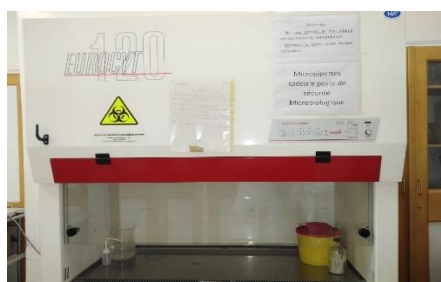


Figure 6 : La hotte

Après le broyage, il faut préparer une solution de lyse pour commencer l'extraction.

- **Préparation de la solution de lyse pour 5 tubes**

- L'ajout de 12.5 μL du Tris-HCl 1M (pH 9) : qui est un tampon biologique
- 3 μL du Triton (x100) : c'est un détergent utilisé pour fragiliser la membrane.

Le Triton est très visqueux, en l'ajoutant dans la solution, il faut « vortexer » puis chauffer quelques secondes pour homogénéiser la solution.

- Rajouter 187.5 μL de H_2O
- Refroidir la solution à 4°C puis on ajoute 2 μL de la protéinase K (20mg/ml) : c'est une endopeptidase qui coupe les liaisons peptidiques.

- **Procédé d'extraction**

- Après le broyage, centrifuger les échantillons à 4000 rpm et 4°C pendant 15 min (**figure 7-a**), on verse la phase aqueuse attentivement en préservant le culot.
- Ajouter 120 μL de PBS (1X) puis 40 μL de la solution de lyse préparée.
- « Vortexer » jusqu'à homogénéiser le mélange (**figure 7-b**) et on incube une nuit à 37°C
- À la sortie de 37°C, chauffer dans la plaque chauffante à 93°C pendant 10 min pour arrêter la protéinase K (**figure 7-c**).
- On incube à -20°C jusqu'à l'étape de la purification.

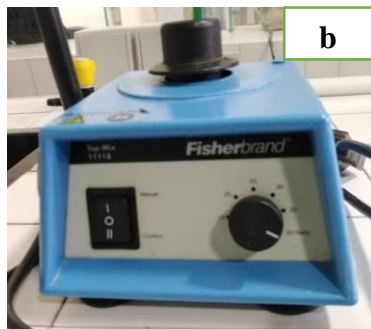


Figure 7 : a : centrifugeuse / b : vortex / c : plaque chauffante

2. Purification

La purification suit les étapes suivantes :

- Laisser décongeler l'ADN extraite à température ambiante pendant 5 min à la sortie de -20°C
- Ajouter un même volume de phénol chloroforme que la solution de lyse + PBS (40 μL + 120 μL = 160 μL de phénol chloroforme)
- Mélanger les tubes par des mouvements de haut en bas puis on centrifuge à 4°C et 4000 rpm pendant 5 min

- Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube
- Mesurer le volume du surnageant puis on ajoute 0.1*volume d'acétate de sodium 3M
- Ajouter 2*volume d'éthanol x100% par rapport au volume final obtenu : [(volume de surnageant pris + volume d'acétate de sodium) *2]
- Incuber une nuit à -20°C
- À la sortie de -20°C, centrifuger à 4°C et 4000 rpm pendant 20 min
- Verser le surnageant et on ajoute l'éthanol 70% et on centrifuge à 4°C et 4000 rpm pendant 2 min
- Verser le surnageant et on laisse les tubes Eppendorfs sécher à température ambiante complètement puis on ajoute 140 µL de TE (1X)
- Conserver à -20°C jusqu'à l'étape de la PCR.

3. PCR

a) Principe

La réaction de polymérisation en chaîne est l'amplification *in-vitro* d'un fragment d'ADN voulu à partir de deux amorces oligonucléotidiques complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier sous l'action d'une ADN polymérase thermostable, chaque amorce est allongée dans le sens 5'→3'.

b) Protocole d'amplification

Le protocole d'amplification des gènes *glmM* et *VacA-c* est le suivant :

- ***glmM***

L'amplification du gène *glmM* se fait par un couple d'amorce (**tableau 5**) ; le fragment sens correspondant à l'oligonucléotide Urec1, et le fragment antisens correspondant à l'oligonucléotide UrecB. La taille du gène *glmM* est de 294 pb [14]. Des cycles successifs de dénaturation, d'hybridation et d'élongation sont effectués (**tableau 3**), en ajoutant dans le milieu les réactifs suivants pour un volume total de 25 µL :

- 0.15 µL de chacune des amorces *glmM* (Urec1 et UrecB) : sont des oligonucléotides qui se lient spécifiquement à la séquence cible ; l'oligonucléotide sens est complémentaire de la séquence 5'-3', et l'oligonucléotide antisens est complémentaire de la séquence 3'-5' (**tableau 5**).
- 0.2 µL de la taq polymérase
- 1 µL des dNTPs



- rajouter 18 μL de H_2O
- puis 2.5 μL du Tampon (10X) + MgCl_2
- et 3 μL d'ADN de *H. pylori* pur

Figure 8 : La hotte PCR

Tableau 3 : Conditions du PCR du gène glmM

	Température ($^{\circ}\text{C}$)	Durée (min)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94	5	1
Dénaturation	94	1	35
Hybridation	55	1	
Élongation	72	1	
Élongation finale	72	7	1

- **VacA c1/c2**

Pour l'amplification des séquences de la région polymorphe c du gène de virulence vacA, les amorces suivantes ont été utilisées : l'oligonucléotide sens c1-F avec l'oligonucléotide antisens R-nd permet l'amplification d'un fragment correspondant au sous type c1 (**Tableau 5**), il délimite une région génomique dont la taille varie entre 600 et 700pb. Cette région s'étend de la position 2206 à la position 2864 du gène [12]. Le fragment correspondant au sous type c2 a été amplifié par l'oligonucléotide sens c2-F avec l'oligonucléotide antisens R-nd, il s'étend de la position 2228 à la position 2906 du gène vacA [13] (**Tableau 5**).

Si la région est délétée elle est appelée c1, sinon elle est appelée c2.

La PCR a été réalisée dans un volume total de 25 μl (**tableau 4**), contenant :

- 2.5 μL de tampon PCR 10X + MgCl_2
- 0.15 μL de la Taq polymérase
- 0,5 μL de dNTPs
- 0,13 μL de chacune des amorces (**Tableau 5**)
- 3 μL d'ADN.
- 18.59 μL de H_2O

Tableau 4 : Conditions du PCR VacA

	Température (°C)	Durée (min)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94	5	1
Dénaturation	94	1	35
Hybridation	55.5	1	
Élongation	72	1	
Élongation finale	72	7	1

La réaction PCR nécessite l'utilisation des amorces sens et antisens des gènes glmM et VacA-c

Tableau 5 : Amorces des gènes glmM et VacA c1/c2

Région amplifiée glmM (taille du gène : 294 pb) [14]	Amorces 5'-----3' Urec1 5' AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT 3' UrecB 5' AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC 3'
Région amplifiée VacA c1/c2	Amorces 5'-----3' c1-F 5' ATC ATY SGT TAT GRH AAT GTT TCT 3' c2-F 5' ATT ATA ATT TAG TAG GAG TGC AAG G 3' R-nd 5' TTA TGC TCT AAA CTG GCT A 3'

4. Électrophorèse

a) Principe

L'électrophorèse est une méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Elle se réalise sur des supports gélatineux, de type acrylamide ou agarose. Dans notre étude, l'agarose utilisée est un polysaccharide extrait d'une algue la rhodophycée, qui permet d'analyser de manière très simple des fragments d'ADN d'une centaine à quelques milliers de nucléotides, obtenus après digestion par des endonucléases de restriction ou amplification par PCR.

b) Préparation du gel d'agarose

On prépare un gel d'agarose 1.5% : 1.5g d'agarose dans 100 mL de TBE (1X).

Le mélange est chauffé dans un micro-onde pendant 3 min de sorte que l'agarose soit totalement dissoute, on ajoute 3 μ L de bromure d'éthidium, bien secouer avant de verser dans les moules puis poser les peignes sans trouer le gel et laisser jusqu'à solidification du gel.

On conserve les gels préparés dans le TBE (1X) à l'abri de la lumière.

c) Révélation des produits de PCR

9 μ L du produit PCR sont additionnés au bleu de Bromophénol et sont déposés dans un puits du gel d'agarose. La migration se fait à 100 volts pendant 1h 30 min. La visualisation des produits se fait sur une plaque UV et leur taille est déduite à l'aide du marqueur de poids moléculaire (50pb) (**figure 9**).

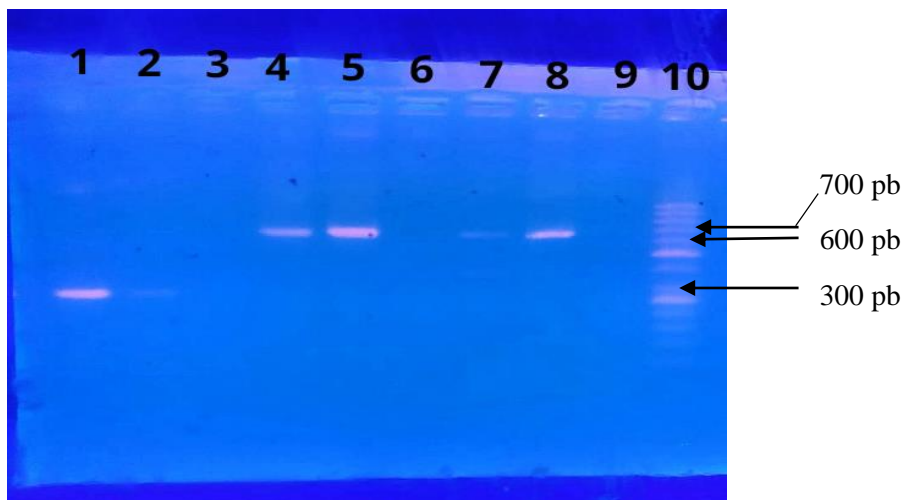


Figure 9 : Image d'un gel d'agarose 1.5% montrant les produits d'amplification obtenus par les couples d'amorces UrecB/Urec1, c1-F/R-nd et c2-F/R-nd

1 et 2 : produits PCR du gène glmM

3 : témoin négatif du gène glmM

4 et 5 : produits PCR du gène VacA-c2

6 : témoin négatif du gène VacA-c2

7 et 8 : produits PCR du gène VacA-c1

9 : témoin négatif du gène VacA-c1

10 : marqueur du poids moléculaire (50pb)

II. Résultats et interprétations

1. Profil épidémiologique des biopsies

Lors de cette étude, un total de 100 ADN d'*H. pylori* extraits de biopsies gastriques a été utilisé.

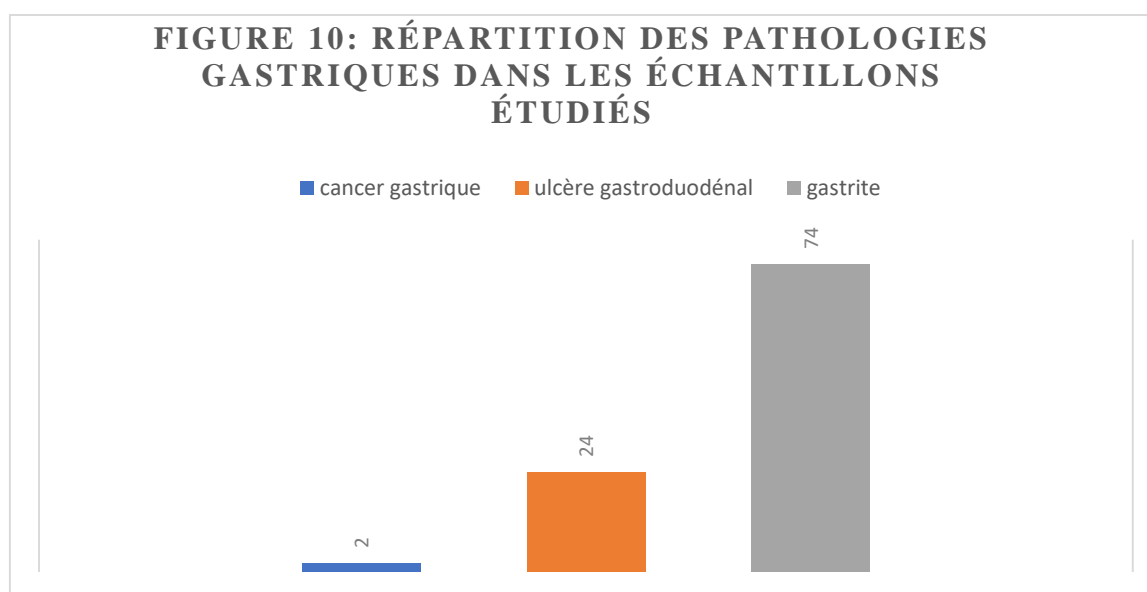
a) Description des patients

La répartition des pathologies gastriques au sein de la population d'étude est représentée dans le tableau 6.

Tableau 6 : Incidence des pathologies gastriques chez les sujets étudiés

	Effectifs	Pourcentage (%)	Pourcentage valide (%)
Cancer gastrique	2	2,0	2,0
Ulcère gastroduodéal	24	24,0	24,0
Gastrite	74	74,0	74,0
Total	100	100,0	100,0

Parmi les 100 échantillons étudiés, le cancer gastrique est diagnostiqué chez 2 patients avec un pourcentage de 2%, l'ulcère gastroduodéal chez 24 patients avec un pourcentage de 24%. La gastrite est la plus prédominante, elle est présente chez 74 sujets avec un pourcentage de 74% (**figure 10**).



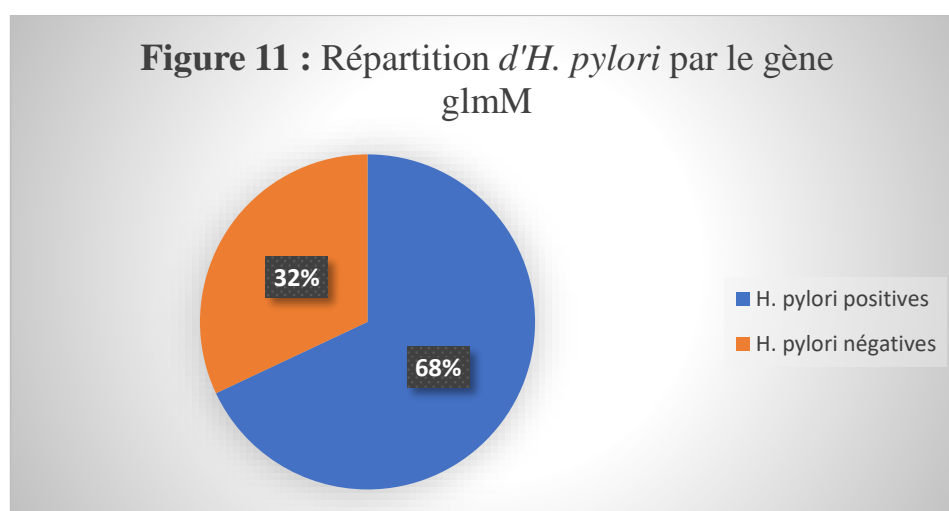
b) Répartition de l'infection à *H. pylori* par le gène glmM

Les résultats de cette répartition sont donnés par le tableau 7. On constate que le gène glmM a montré

Tableau 7 : Prévalence de l'infection à *H. pylori*

	Effectifs	Pourcentage (%)	Pourcentage valide (%)
H. pylori négatives	32	32,0	32,0
H. pylori positives	68	68,0	68,0
Total	100	100,0	100,0

Parmi les 100 échantillons étudiés, 68 cas positifs soit un pourcentage de 68%, tandis que 32 patients sont négatifs avec un pourcentage de 32% (**figure 11**).



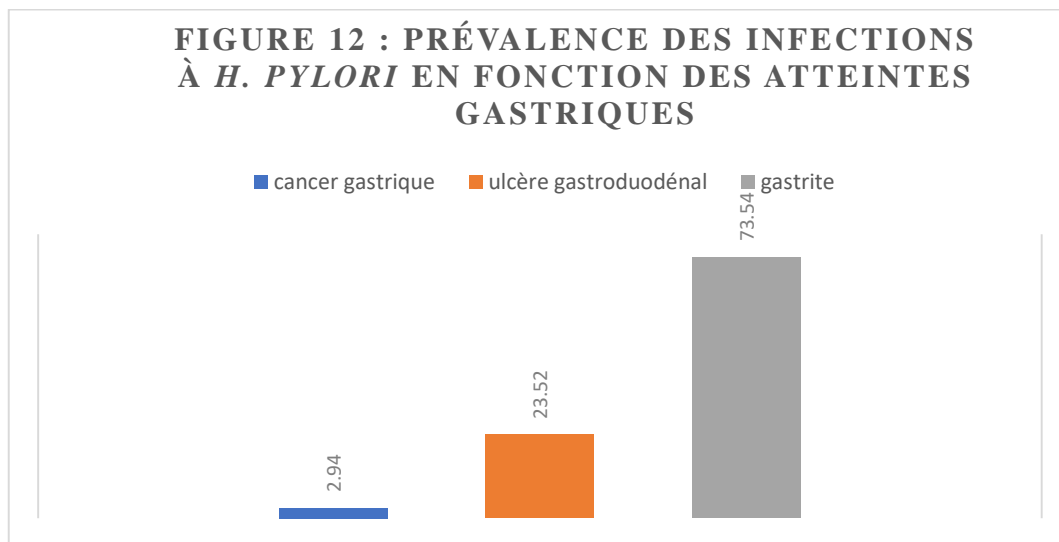
c) Répartition des pathologies gastriques à *H. pylori* par le gène VacA

Parmi les 68 échantillons positifs (**tableau 8**), la gastrite est observée chez 50 sujets avec un pourcentage maximal de 73.54%, suivi par l'ulcère gastroduodéal avec un pourcentage de 23.52%,

Tableau 8 : pourcentage des différentes pathologies gastriques liées à la région c du gène VacA

	Effectif	Pourcentage (%)
Cancer gastrique	2	2.94
Ulcère gastroduodéal	16	23.52
Gastrite	50	73.54
Total	68	100

et puis le moins dominant est le cancer gastrique avec 2.94% (**figure 12**).



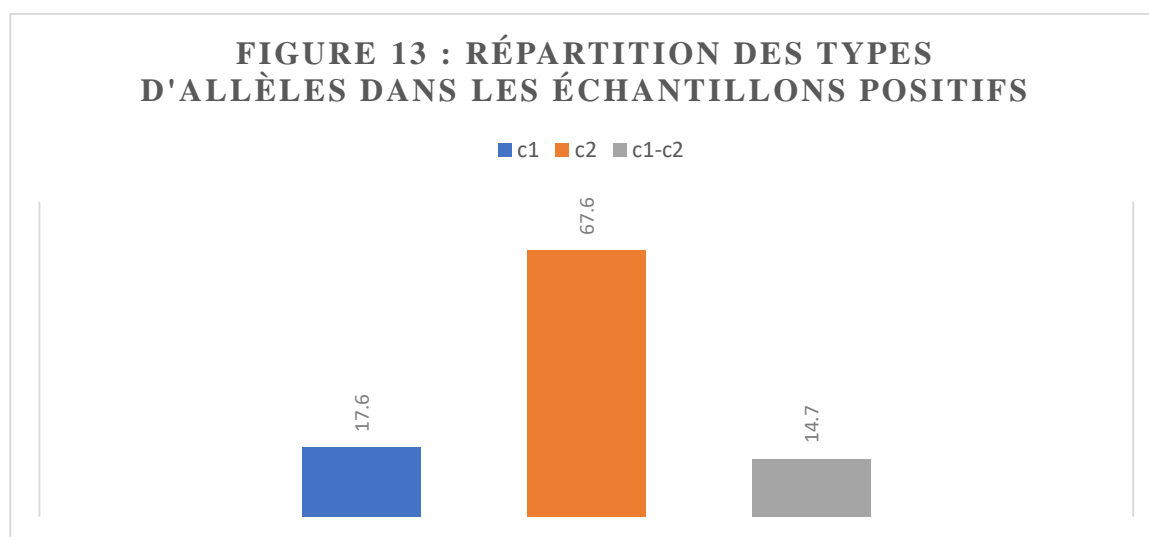
d) Génotypage de la région c du gène VacA de *H. pylori*

La détermination du statut de la région c du gène VacA de *H. pylori* a été réalisée sur les 68 prélèvements positifs. La présence du gène se traduit par l'amplification d'une région d'une taille entre 600 et 700 pb en utilisant le couple d'amorces c1-F/R-nd pour le sous type c1, et le couple d'amorces c2-F/R-nd pour le sous type c2 (**tableau 5**).

Tableau 9 : Pourcentage des différents allèles de la région c du gène vacA de *H. pylori*

Gène	Type d'allèle	Effectifs	Pourcentage (%)
VacA	c1	12	17.6
	c2	46	67.6
	c1-c2	10	14.7
	Total	68	100

Le typage moléculaire a montré que le génotype vacA c2 (absence de délétion) est prédominant avec un pourcentage qui atteint 67.6%, alors que le sous type c1 et la double infection c1-c2 ont respectivement les pourcentages 17.6% et 14.7% (**Tableau 9 et figure 13**).



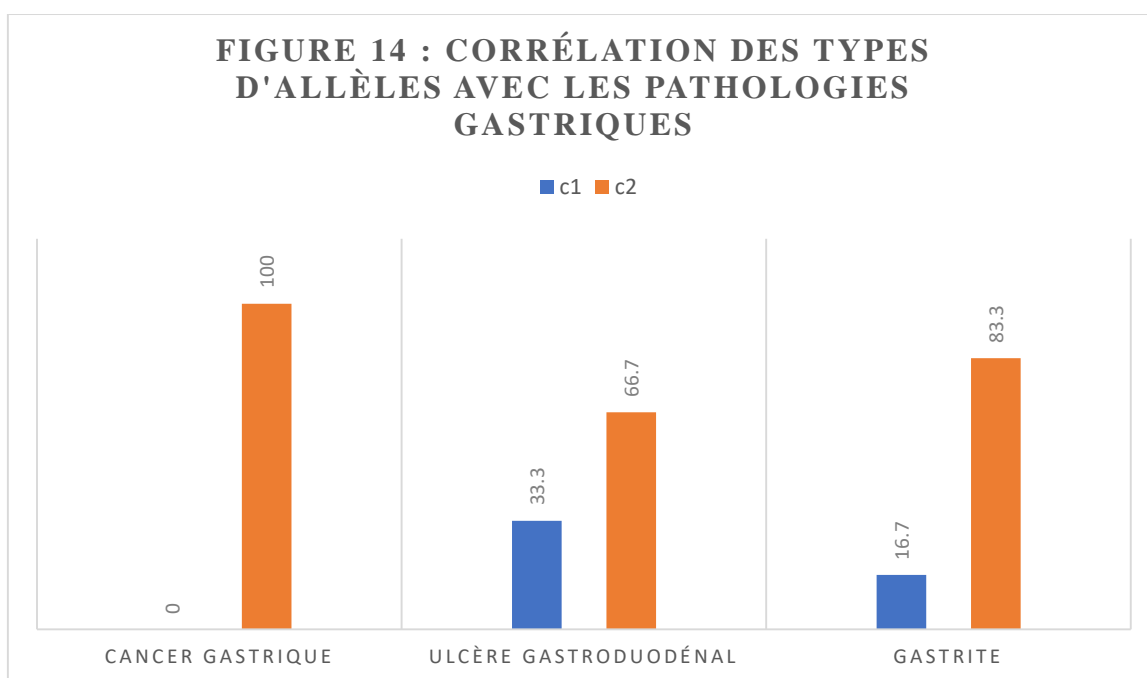
2. Corrélation du génotypage avec les pathologies gastriques :

Dans la corrélation de la région VacA-c avec les pathologies gastriques, on exclut le type d'allèle c1/c2 qui est d'un pourcentage de 14.7%, car ce type d'allèle ne permet pas de préciser si la pathologie est liée à l'allèle c1 ou c2.

Tableau 10 : Corrélation des sous types aux pathologies gastriques

Allèles	Cancer gastrique	Ulcère gastroduodéal	Gastrite	Total	Valeur de p
c1	0 (0%)	5 (33.3%)	7 (16.7%)	12 (20.7%)	0.939
c2	1 (100%)	10 (66.7%)	35 (83.3%)	46 (79.3%)	
Total	1 (100%)	15 (100%)	42 (100%)	58 (100%)	

La corrélation des deux types d'allèle de la région c du gène vacA aux pathologies gastriques a été étudiée. Les résultats de l'analyse ont montré une prédominance du génotype c2 (100%) contre 0% pour le génotype c1 dans le cas du cancer gastrique. Le sous type c2 a été détecté chez 66.7% des patients souffrant de l'ulcère gastroduodénale contre 33.3% pour le sous type c1. Même pour la gastrite, la prédominance est détectée pour le sous type c2 (83.3%) contre 16.7% pour le sous type c1. Ces résultats restent statistiquement non significatifs ($p > 0,05$) (**Tableau 10 et figure 14**).



3. Discussion :

Notre étude a montré que parmi les 100 patients étudiés, 74 sont atteints de la gastrite dont le pourcentage est 74%, 24 souffrent de l'ulcère gastroduodéal avec un pourcentage de 24%, tandis que 2 patients sont atteints d'un cancer gastrique (2%).

Après amplification par le gène glmM, 68% des extraits d'ADN sont révélés positifs. Ce taux reste comparable à l'étude marocaine faite sur une population casablancaise dont le pourcentage des échantillons positifs est 69.2% [19].

D'après cette étude marocaine, *H. pylori* est à l'origine de plusieurs pathologies gastriques, il est à l'origine de 80% des gastrites, de 1 à 10% des ulcères gastroduodéaux, et de 1 à 3% des cancers gastriques [19]. Ces résultats concordent avec les pourcentages obtenus pour les 68 échantillons positifs : *H. pylori* est à l'origine de 73.54% de la gastrite, 23.52% de l'ulcère gastroduodéal et 2.94% du cancer gastrique.

Les résultats du génotypage moléculaire de la région c du gène VacA ont montré que le génotype c2 est le plus fréquent avec un pourcentage de 46% suivie de c1 qui représente 12% de tous les échantillons. Ces taux sont comparables à ceux obtenus dans la littérature [19] où le sous type c2 prédominait sur c1 (63,8% pour c2 contre 28,6% pour c1).

Dans l'étude de la corrélation du génotypage avec les pathologies, on exclut la double infection qui présente les deux allèles c1 et c2, car on ne peut pas conclure à quel génotype est liée la pathologie.

Pour un total de 58 échantillons (après exclusion de la double infection c1-c2), le cancer gastrique est lié à 100% au sous type c2 contre 0% pour le sous type c1. De même pour l'ulcère gastroduodéal qui est lié à c2 d'un pourcentage plus élevé que celui de c1 (66.7% contre 33.3%). En parlant de la gastrite, le sous type c2 cause la pathologie avec un pourcentage de 83.5% contre 16.7% pour c1. La fréquence du vacA c1 chez les patients souffrant du cancer gastrique au Maroc atteint 3% [19], ces résultats ont été validés par le test statistique khi-deux, et sont en accord avec les résultats de la bibliographie [19].

III. Conclusion :

L'infection à *Helicobacter pylori* est la cause la plus fréquente de gastrite et d'ulcère gastroduodéal dans le monde. Presque toutes les personnes infectées par cette bactérie présentent une inflammation de l'estomac (gastrite), qui peut affecter la totalité de l'estomac ou seulement sa partie inférieure (antre). L'infection peut parfois entraîner une gastrite érosive, un ulcère de l'estomac (gastrique) ou évoluer en cancer gastrique.

Dans notre étude, les échantillons provenant du service gastro-entérologie de CHU-Hassan II de Fès ont permis de déduire, que la gastrite est prédominante avec 74%. L'ulcère gastroduodéal présente un pourcentage de 24% alors que le cancer gastrique est le moins dominant avec un pourcentage de 2%.

La répartition de l'infection à *H. pylori* par le gène glmM, a montré que le taux de positivité est de 68% tandis que 32% des échantillons sont négatifs.

L'amplification par le gène VacA a montré, d'une part, que la majorité des souches portent l'allèle c2 (sans délétion), tandis que la souche délétée est moins répandue. Et d'autre part, que la corrélation des génotypes avec les pathologies gastriques a montré la dominance de l'allèle c2 dans les pathologies étudiées (cancer gastrique, ulcère gastroduodéal et la gastrite).

La technique de biologie moléculaire (PCR) est une méthode qui présente une excellente spécificité et sensibilité, elle est prometteuse et constitue un outil incontournable dans la détection de *H. pylori* dans les pathologies gastriques.

Références bibliographiques :

- [1] : FAUCHÈRE J. L., La folle histoire de la découverte de *Helicobacter pylori* ; 2017
- [2] : Goodwin C, Armstrong J, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES. Transfer of *Campylobacter pyloridis* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov, respectively. *Int J Syst Bacteriol* ; 1989
- [3] : Payão SLM, Rasmussen LT. *Helicobacter pylori* and its reservoirs: A correlation with the gastric infection. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* ; 2016
- [4] : Oderda G., Transmission of *Helicobacter pylori* infection. *Can J Gastroenterol* ; 1999
- [5] : Shahamat M, Mai U, Paszko-Kolva C, Kassel M, Colwel RR. Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Appl Environ Microbiol* ; 1993
- [6] : Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO. Water source as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Lancet* ; 1991
- [7] : Nurgalieva ZZ, Malaty HM, Graham DY, Almuchambetova R, Machmudova A, Kapsultanova D, Osato MS, Hollinger FB, Zhangabylov A. *Helicobacter pylori* infection in Kazakhstan : effect of water source and household hygiene. *Am J Trop Med Hyg* ; 2002
- [8] : Lydia Neà-la DJOUADI. *Helicobacter pylori* : étude bactériologique des premières souches isolées ; 2011
- [9] : De Reuse et al. ; Development of Two PCR-Based Techniques for Detecting Helical and Coccoid Forms of *Helicobacter pylori* ; 1997
- [10] : Razafimahefa S.H. et al. Infection à *Helicobacter pylori* : revue de la littérature et réalités à Madagascar ; 2012
- [11] : Yao-Kuang Wang, Fu-Chen Kuo, Chung-Jung Liu, Meng-Chieh Wu, Hsiang Yao Shih, Sophie SW Wang ; Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments, , 2015

[12] : Chung C, Olivares A, Torres E, Yilmaz O, Cohen H, Perez-Perez G. Diversity of vacA intermediate region among *Helicobacter pylori* strains from several regions of the world ; 2010

[13] : Dawson Emma M., Dunne Karl A., Richardson Emily J., Praszkiec Judyta, Alfawaz Dana, Woelfel Simon, De Paoli Amanda, Chaudhry Hassan, Henderson Ian R., Ferrero Richard L., E. Rossiter Amanda. Complete genome sequence of *Helicobacter pylori* B128 7.13 and a single-step method for the generation of unmarked mutations ; 2019

[14] : Portnov Alexey ; Détection de *Helicobacter pylori* dans la muqueuse gastrique de patients atteints de maladies gastroduodénales par analyse pcr-restriction utilisant le gène de l'ARN polymérase (*rpoB*), juillet 2003

[15] : Courillon-Mallet A. ; *Helicobacter pylori* et cancer gastrique : qui « prévenir » ? *Gastroenterol Clin Biol.* ; 2009

[16] : Nimish Vakil , MD, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health. H. pylori Infection, 2020

[17] : Doffou Adjéka.Stanislas et al ; Prévalence des Ulcères Gastroduodénaux et des Lésions Précancéreuses Gastriques au cours de la Gastrite Chronique à *Helicobacter Pylori* selon le Système de Sydney ; 2020

[18] : Nogueira T., de Smit M., Graffe M., Springer M. ; The relationship between translational control and mRNA degradation for the *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase gene. *J.Mol.Biol.* ; 2001.

[19] : Essadik Amel, Benomar Hakima, Rafik Ismail, Hamza Mouna, Guemouri Laila, Kettani Anass, Maachi Fatima, Aspects épidémiologiques et cliniques de l'infection à *Helicobacter pylori* à travers une étude marocaine ; Dans *Hegel* 2013/3 (N° 3), pages 163 à 169

Webographie :

[20] : www.fmpf.ac.ma