

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique تلمسان

جامعة أبو بكر بلقايد



Université ABOUBEKR BELKAID - TLEMCEM

كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE

MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème :

**Epidémiologie de l'HELICOBACTER PYLORI, Caractérisation moléculaire
et biochimiques par les gènes Vac A et Cag A**

Présenté par :

- BEKKHOUCHA Bouchra
- CHIALI Nihel Sarah

Soutenue devant le jury :

Présidente : GUERMOUCHE Baya

Pr Université de Tlemcen

Encadrante : SAHI-DALI YUCEF Majda

Pr Université de Tlemcen

Co-Encadrante : SALMI Takwa

Dr Université de Tlemcen

Examinatrice : BERRAHOU Samira

MCB Université de Tlemcen

Examinatrice : ETCHIALI Amel

MCA Université de Tlemcen

Année universitaire : 2023/2024

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

En premier lieu, nous remercions ALLAH, le tout puissant, de nous avoir tracer le chemin de la réussite malgré toutes les épreuves que nous avons traversé durant notre cursus.

A notre directrice de mémoire,

Pr Dali-Youcef Sahi Majda,

Nous vous remercions de nous avoir soutenu et encouragé, merci à vos conseils judicieux dans le cadre de la réalisation de ce travail. Votre compétence, votre dynamisme, votre rigueur a suscité en nous une grande admiration et notre respect les plus profond. Votre écoute active et votre disponibilité, votre suivi permanent de notre travail, ainsi que vos remarques et vos suggestions pertinentes.

A notre Co-encadrante,

Dr Salmi Takwa,

Merci de nous avoir fait bénéficier de votre expertise, votre aide et vos précieux conseils et encouragements. Nous avons beaucoup appris à vos côtés.

A notre présidente du jury,

Pr Guermouche,

Vous avez honoré ce travail en acceptant de présider le jury. Je tiens à vous communiquer mon profond respect et ma sincère reconnaissance.

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury,

Pr. ETCHIALI. A

Pr BERRAHOUI. S

Toute ma gratitude s'adresse aux membres du jury, qui ont fait l'honneur d'examiner notre travail et de participer à notre soutenance de ce mémoire.

Nous remercions aussi,

Pr ETCHIALI Amel Gastro-entérologue, Pr YELLES.N Anatomo-pathologiste au CHU-Tlemcen, Dr BELARBI Pathologiste libéral, Pr ARBAOUI Gastro-entérologue libéral, et Laboratoire Wiragen de Biologie Moléculaire-Oran,

Nos vifs remerciements pour votre aide, votre apprentissage et votre collaboration pour la réalisation de cette étude. Merci infiniment.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail,

A mes très chers parents, pour leurs conseils, leurs sacrifices, leurs encouragements, leurs présences à mes côtés qui a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles, ainsi que leurs prières et efforts qu'ils ont déployé durant toute ma vie, vous êtes ma fierté, que Dieu vous préserve et vous protège.

A ma très chère sœur Dounia, mon cher frère Arslane, et mon fiancé Lokman, merci pour vos précieux conseils, et vos encouragements, vous étiez toujours à mes côtés pour me soutenir tout au long de ce parcours. Je suis infiniment reconnaissante pour votre aide.

A mes grands-parents, présents dans chaque étape de ma vie, je ne vous remercierais jamais assez pour votre soutien, encouragements, et vos prières que Dieu vous garde à mes côtés en bonne santé.

Je remercie ma tante, pour ces encouragements, et sa contribution de loin ou de près dans ce modeste travail.

A mes chers amis, merci d'avoir été là, de m'avoir encouragé et de m'avoir apporté de la joie et de la bonne humeur avec tous ces moments inoubliables passez ensemble. Merci pour votre amour et votre soutien.

A ma chère binôme Bouchra, merci pour ces moments glorieux, cette année pleine de bons souvenirs. Je tenais à t'exprimer ma gratitude et ma renaissance pour toutes ces années partagées ensemble, tant de vivacité de partage et d'apprentissage couronnés par une année très enrichissante. Merci pour ton soutien et ta bienveillance.

NIHEL...

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail,

À mes chers parents,

Merci pour votre amour, vos conseils et votre soutien. Vous m'avez appris des valeurs précieuses et m'avez donné la force de poursuivre mes rêves. Vos sacrifices et votre dévouement m'ont montré la voie à suivre et m'ont inspiré à toujours viser l'excellence. Chaque succès que je rencontre est un reflet de tout ce que vous m'avez appris. Je vous suis éternellement reconnaissante pour tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour moi.

À mon époux,

Merci pour ta patience et ta compréhension. Ta présence à mes côtés rend chaque défi plus léger. Je te suis infiniment reconnaissante pour tout ce que tu as fait.

À mes frères,

Merci pour votre amour, votre soutien et vos encouragements. Vous avez toujours été là pour moi, vous qui n'avez jamais douté de moi, m'avez aidée et encouragée tout au long de mes études. Merci pour tout ce que vous faites et pour tout ce que vous êtes

À ma belle-famille,

Merci pour votre accueil chaleureux, votre générosité et votre soutien. Vous m'avez acceptée à bras ouverts, et je me sens chanceuse de faire partie de votre famille.

À ma chère Téma,

Merci pour tous les éclats de rire, les épaules sur lesquelles pleurer, et les souvenirs précieux partagés. Ton amitié est un trésor inestimable que j'apprécie profondément. Merci également pour ton soutien et tes encouragements

À mon cher binôme, Nihel,

Travailler à tes côtés a été une expérience incroyable et enrichissante. Ensemble, nous avons surmonté de nombreux défis et créé des souvenirs inoubliables. Merci pour tous les

encouragements qui ont rendu chaque projet plus léger et plus agréable. J'espère que nous continuerons à avancer ensemble, main dans la main, en affrontant chaque nouvelle aventure avec la même passion et le même enthousiasme

Bouchra...

Liste des abréviations

Abl : Abelson tyrosine kinase.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

Alp: Adherence associated lipoproteins.

AP-1: Activator Protéine 1.

BabA: Blood group Antigen Binding Adhesion.

CagA: Cytotoxin associated gene A.

CagPAI : cag Pathogenicity Island.

CD44 : Cluster de Différenciation 44.

c-fos : proto-oncogène fos (cellulaire).

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire.

c-jun : proto-oncogène jun (cellulaire).

CM: CONSERED MOTIF.

CO₂: dioxyde de carbone.

DdH₂O: Double Distilled Water.

DNtp : Mélange des quatre désoxyribonucléotides (Adénine, Cytosine, Guanine et Thymine).

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique.

Elisa : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

Epiya : Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala.

HE : hématoxyline-éosine.

Hp. B : bulbite.

Liste des abréviations

Hp. G : Helicobacter pylori avec gastrite.

H. pylori : Hélicobacter pylori.

Hp. UB : Ulcère bulbaire.

Hp.UG: Ulcère gastrique.

ICB5: inhibiteur clean buffer.

Igg anti-H : immunoglobulines G anti-helicobacter pylori.

IL : Interleukine.

IL β : interleukine béta.

IPP : Inhibiteurs de la Pompe à Proton.

LBB5: lysis binding buffer.

LPS: Lipopolysaccharide.

MiARN: micro ARN.

Nap: Neutrophil Activating Protein.

NH: Ammoniac.

N.R : nitrate réductase.

Oms : organisation mondiale de la santé.

O₂ : dioxygène.

P.A : phosphatase alcaline.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

PG: peptidoglycane.

Ph : potentiel hydrogène.

Liste des abréviations

p33 : sous unité proteique poids moléculaire 33.

p55 : sous unité proteique poids moléculaire 55.

RGO: Reflux gastro-œsophagien.

SabA: Sialic Acid Binding Adhesion.

Shp2 : protéine tyrosine phosphatase.

SNV : science de la nature et la vie.

Src : sarcoma turosine kinase.

SSTIV : Système de Sécrétion de Type IV.

TAE : tris/acétate/EDTA.

Taq : enzyme provient de thermus aquaticus.

TB : test à l'uréase à partir des biopsies gastriques.

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse.

VacA : Vacuolating Cytotoxin A.

VirB 1-11 : virulence protein 1-11.

VirD4 : virulence protein D.

WB5: wash buffer.

ZEB-1: Zinc finger E-box-binding homeobox 1),

γ-GT: γ-glutamyl transférase.

Liste des figures

Figure 1: <i>H. pylori</i> sous microscope électronique	7
Figure 2: Prévalence mondiale de l'infection à <i>H. pylori</i> (Wan Ying Lai et al., 2017)	14
Figure 3: Architecture proposée du système de sécrétion de type IV de <i>H. pylori</i> (Diplo T. Flore Bernadette., 2020).....	20
Figure 4 : Représentation schématique des motifs CagA et EPIYA (Pierre Valk et al., 2012)	21
Figure 5 : Représentation schématique des allèles Vac A (Mehasni S., 2019).....	22
Figure 6: Effet pathologique de VAC A sur les cellules de l'hôte (SEBASTIEN BREUREC., 2012).....	23
Figure 7: Schéma de la transition épithéliale-mésenchymateuse et marqueurs épithéliaux et mésenchymateuses (Baj, J., 2020).....	25
Figure 8: Principe du test respiratoire alluré marqué au 13c (Mehasni S., 2019).	29
Figure 9: Les 3 lignes de traitement de l'infection à <i>H. pylori</i> recommandées en France (Guillemot Glenn., 2015).....	31
Figure 10: kit wiraspin d'extraction ADN (Wiragen).....	38
Figure 11: Colonne de spin d'ADN.....	39
Figure 12: Extraction et purification d'ADN (Wiragen).....	40
Figure 13: Représentation d'une spectrophométrie Nanodrop Laboao LND-100 (Wiragen)	42
Figure 14 : Elaboration des amorces du gène Vac A par le logiciel primer 3 plus. A : les amorces du Vac A m1. B : les amorces du Vac A s1.C : les amorces du Cag A.....	43
Figure 15: Représentation des 3 primers (Vac A s1, Vac A m et Cag A)	45
Figure 16: Préparation des solutions mix des 3 primers	46
Figure 17: Représentation d'un thermocycleur PCR (MiniAmp Wiragen).....	47
Figure 18: Formation des puits d'ADN (Wiragen).....	48
Figure 19: Migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% (Wiragen).....	48
Figure 20: Répartition des sexes H/F.....	51
Figure 21: Taux d'infection à <i>Helicobacter pylori</i>	52
Figure 22: Répartition des tranches d'âge selon les sièges	52
Figure 23: Répartition des antécédent familiaux et syndrome ulcéreux.....	53
Figure 24: La répartition des gènes de virulence.....	54

Liste des figures

Figure 25: Principe du test à l'uréase.....	55
Figure 26: Frotti coloré par Giemsa et H.E en présence H.P x100 (Service anatomo-pathologie CHU-Tlemcen)	56
Figure 27: Détermination de la variabilité enzymatique chez les souches d'Helicobacter pylori.	57
Figure 28: Quantité et pureté d'ADN extrait de échantillons 1 (Wiragen).....	59
Figure 29: Quantité et pureté d'ADN extrait de l'échantillon 4 (Wiragen).....	59
Figure 30: Electrophorèse de migration sur gel d'agarose à 1% des gènes de virulence de l'H. pylori Vac A m1, s1 et Cag A (Wiragen).....	61
Figure 31: Electrophorèse de migration sur gel d'agarose à 1% de résultats des gènes de virulence de l'H. pylori Vac A m1, s1 et Cag A (Wiragen)	62
Figure 32: Représentation d'un Plan ACP et dendrogramme des différents génotypes Vac A m1, s1 et Cag A et différentes pathologies Gastro-duodénales	65

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition des souches virulentes associés aux pathologies selon la localisation géographique	11
Tableau 2 : Mécanisme de résistance aux principaux antibiotiques utilisés dans le traitement de l'infection à H.pylori et les cibles principaux (Kamiri., 2007 et Fontaine V, Douat N., 2011)	26
Tableau 3 : Rôle des différents tampons utiliser dans l'extraction d'ADN.....	40
Tableau 4 : les séquences d'amorces utilisées pour l'amplification des gènes de virulence par PCR.....	44
Tableau 5: Répartition des pathologies gastro-duodénales à HP+.....	54
Tableau 6 : Résultat d'ADN extrait après lecture par le spectrophotomètre	58
Tableau 7 : Les différents méthodes d'identification d'H. pylori.....	60
Tableau 8 : Les paramètres anthropométrique, cliniques en fonction des génotypes identifiés par PCR dans notre étude.....	63
Tableau 9 : Régression multiple des différents génotypes en fonction des pathologies identifiées dans notre population d'étude	64

Liste des annexes

Annexe 1 : Fiche d'enquête.....	74
Annexe 2 : Electrophorèse de migration sur gel d'agarose à 1% de résultats de l'amplification d'ADN codé par puits.....	76

Résumé

Il s'agit d'une étude descriptive analytique dans une population de l'ouest Algérien. Cette étude est réalisée sur 95 patients présentant des symptômes gastroduodénaux. L'objectif principal de notre étude est d'identifier les gènes de virulence de l'*H. Pylori* ainsi que l'association entre ces gènes avec les différents types de pathologies identifiés dans notre population d'étude. Nous avons identifié l'*H. pylori* par plusieurs méthodes : le test d'uréase et le test anatomopathologique. Nous avons utilisé la PCR mixte pour détecter les gènes de virulence (Vac A m1, VacA s1, Cag A). Nous avons effectué aussi une étude in silico pour la conception des amorces où on a utilisé le logiciel primer 3 plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>). Nos résultats montrent que Certains patients étaient négatifs du test d'uréase mais se sont révélés positifs par PCR. 60% des patients possèdent Vac A m1/Cag A+, 10% des cas possèdent les gènes Vac A m1/s1 et 30% n'ont pas les gènes de virulence. La Régression et l'ACP montrent que le génotype Vac A m+/Cag A+ est corrélé à la pathologie gastrite chronique avec une P significative de **0.003**, $R^2 = 31\%$. Notre analyse montre aussi que l'âge et le sexe sont significativement différents selon les génotypes, dont 50% des patients âgés de plus de 35 ans avaient le gène Vac A m1/Cag A + (**$p=0.00$**). 50% des femmes avaient les 2 gènes de virulence Vc A m1/Cag A+, tandis que ce génotype est retrouvé que chez 10% des hommes (**$p=0.04$**). Le test Khi2 montre aussi qu'il existe une différence significative entre les différentes méthodes d'identification de la présence d'*H. pylori* ($p=0.016$). En conclusion 70% de nos patients atteints des pathologies gastriques portent les gènes de virulence (Vac A, cagA) de l'*H. pylori*. Donc il faut rendre la PCR un moyen de diagnostic pour une thérapie ciblée.

Mot clés : *Helicobacter pylori*, Vac A, Cag A, pathologies gastroduodénales, amorces, Analyse en Composantes Principales, régression

Abstract

This is a descriptive analytical study conducted in a population from western Algeria. This study was carried out on 95 patients presenting gastroduodenal symptoms. The main objective of our study is to identify the virulence genes of *H. pylori* and the association of these genes with different types of pathologies identified in our study population. We identified *H. pylori* by several methods: the urease test and the histopathological test. We used multiplex PCR to detect the virulence genes (Vac A m1, VacA s1, Cag A). We also performed an in silico study for primer design using Primer 3 Plus software (<https://www.primer3plus.com/index.html>). Our results show that some patients were negative for the urease test but tested positive by PCR. 60% of the patients possess Vac A m1/Cag A+, 10% of the cases have Vac A m1/s1 genes, and 30% do not have virulence genes. Regression and PCA show that the Vac A m+/Cag A+ genotype is correlated with chronic gastritis pathology with a significant P of **0.003**, $R^2 = 31\%$. Our analysis also shows that age and sex are significantly different according to the genotypes, with 50% of patients over 35 years old having the Vac A m1/Cag A+ gene (**$p=0.00$**). 50% of women had the two virulence genes Vc A m1/Cag A+, while this genotype was found in only 10% of men ($p=0.04$). The Chi-squared test also shows that there is a significant difference between the different methods of identifying the presence of *H. pylori* ($p=0.016$). In conclusion, 70% of our patients with gastric pathologies carry the virulence genes (Vac A, cagA) of *H. pylori*. Therefore, PCR should be used as a diagnostic tool for targeted therapy.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Vac A, Cag A, gastroduodenal pathologies, primers, Principal Component Analysis, regression

الملخص :

هذه دراسة تحليلية وصفية أجريت على مجتمع في غرب الجزائر. تم إجراء هذه الدراسة على 95 مريضًا يعانون من أعراض المعدة والاثني عشر. والارتباط بين هذه الجينات وأنواع الأمراض المختلفة (*H. pylori*) الهدف الرئيسي من دراستنا هو تحديد جينات الفوعة للبكتيريا الحلزونية البوابية التي تم تحديدها في مجتمع دراستنا

المتعددة للكشف عن جينات الفوعة PCR لقد قمنا بتحديد البكتيريا الحلزونية البوابية بعدة طرق: اختبار اليورياز والاختبار النسيجي. استخدمنا تقنية Primer 3 Plus كما أجرينا دراسة باستخدام الحاسوب لتصميم البادئات باستخدام برنامج (Vac A m1، VacA s1، Cag A).

Vac A من المرضى يحملون جين 60% PCR تظهر نتائجنا أن بعض المرضى كانت نتائجهم سلبية لاختبار اليورياز ولكنهم إيجابيون باستخدام ، و30% لا يحملون جينات الفوعة. تظهر تحليلات الانحدار والتحليل التمايزي Vac A m1/s1 من الحالات تحمل جينات ، 10% Cag A+ m1/Cag A+، $R^2 = 31\%$ ذو دلالة إحصائية 0.003، P مرتبط بالتهاب المعدة المزمن مع Vac A m+/Cag A+ الرئيسي أن النمط الجيني

كما تظهر تحليلاتنا أن العمر والجنس يختلفان بشكل كبير حسب الأنماط الجينية، حيث أن 50% من المرضى الذين تزيد أعمارهم عن 35 عامًا ، بينما تم العثور على هذا النمط Vac A m1/Cag A+ من النساء يحملن الجينين الفوعين 50% (p=0.00). Vac A m1/Cag A+ يحملون جين يظهر اختبار كاي2 أيضًا أن هناك فرقًا ذا دلالة إحصائية بين الطرق المختلفة لتحديد وجود البكتيريا (p=0.04). الجيني لدى 10% فقط من الرجال (p=0.016). الحلزونية البوابية

للبنكتيريا الحلزونية البوابية. لذا يجب (Vac A، cagA) في الختام، 70% من مرضانا الذين يعانون من أمراض المعدة يحملون جينات الفوعة كأداة تشخيصية للعلاج المستهدف PCR استخدام تقنية

كلمات مفتاحية: هيليكوباكتر بيلوري أمراض المعدة والاثني عشر بادئ (برايمر) تحليل المكونات الرئيسية انحدار، Cag A VacA

Table des matières

Remerciements	I
Dédicaces	II
Liste des abréviations	V
Liste des figures	VIII
Liste des tableaux	X
Liste des annexes	XI
Table des matières	XIV
Introduction Générale	1
Synthèse Bibliographique	4
Généralités sur HELICOBACTER PYLORI	5
1. Historique	6
2. Caractères bactériologique	6
2.1. Structure	6
2.2. Habitat	7
3. Caractères Biochimiques	7
4. Exigence du germe	8
5. Caractères génétiques	8
6. Polymorphisme génétique associé à Helicobacter pylori	9
6.1. Polymorphisme Vac A.....	9
6.2. Polymorphisme Cag A	11
6.3. Polymorphisme génétique de l'hôte.....	12
7. Epidémiologie	13
7.1. Prévalence de l'infection dans le monde.....	13
7.1.1. Gradient géographique	13
8. Source de contamination	14
9. Mode de transmission	15
9.1 La voie oro-oral.....	15
9.2 La voie féco-oral	15
10. Pathogénicité de H. pylori	15

Table des matières

10.1. Infection par H. pylori.....	15
10.2. Pathologie digestive associée à H. pylori.....	16
10.2.1. Gastrite aigue ou chronique	16
10.2.2. Ulcère gastrique et duodéal	16
10.2.3. Adénocarcinome gastrique	17
10.2.4. Lymphome gastrique de MALT	17
11. Pathogénicité	17
11.1 Facteur de colonisation.....	17
11.2 Facteur de persistance.....	18
11.3 Facteurs de virulence majeurs.....	19
11.3.1 Ilots de pathogénécité Cag (PAI)	19
11.3.2 Cytotoxine vacuolisante (Vac A).....	21
11.3.3 Les lipopolysaccharides (LPS).....	23
12. Transition épithélio-mésenchymateuse.....	24
13. Symptômes de l'infection de H. pylori	25
14. Résistance aux antibiotiques.....	25
15. Diagnostic de H.P.....	27
15.1. Méthode invasive	27
15.1.1. Anato-mo-pathologique	27
15.1.2 Test rapide à l'uréase	27
15.1.3 Culture	28
15.1.4 L'amplification génique (PCR)	28
15.2 Méthode non invasive	28
15.2.1 Sérologie.....	28
15.2.2 Test respiratoire a l'urée.....	29
15.2.3 Détection antigénique dans les selles.....	30
16. Traitement.....	30
Partie Pratique.....	32
Matériel et méthodes.....	33
1. Matériels biologiques	34
1.1. Type d'étude	34
1.2. Lieu d'étude.....	34
1.3. Population étudiée.....	34

Table des matières

1.3.1. Critères d'inclusion	34
1.3.2. Critères d'exclusion	35
1.4. Collecte des données	35
2. Méthodes	35
2.1. Identification HELICOBACTER PYLORI.....	35
2.1.1. Prélèvement des biopsies.....	35
2.1.2. Transport et conservation des biopsies.....	35
2.1.3. Test rapide à l'uréase	36
2.2. Examen anatomopathologique	37
2.2.1. Frottis coloré.....	37
2.3. Etude moléculaire.....	37
2.3.1. Détection des gènes de virulence	37
2.3.1.1. Extraction d'ADN de Helicobacter pylori à partir des biopsies gastriques	37
2.3.2. Amplification génique (PCR) associé aux gènes de virulence	42
2.3.2.1. Elaboration d'amorce.....	42
2.3.2.2. La réalisation de la PCR	44
3. Etude statistique	49
Résultats	50
1. Description de la population	51
1.1. Caractéristique sociodémographique.....	51
1.2. Tranche d'âge selon le siège.....	52
1.3. Paramètre du bien-être social.....	53
1.4. Antécédents familiaux.....	53
1.5. Les gènes virulents	54
1.6. Les différents types de pathologies gastriques selon le siège	54
2. La mise en évidence de la présence de H. pylori dans les biopsies gastriques.....	55
2.1. La prévalence de l'infection à H. pylori selon le test à l'uréase	55
2.2. La Prévalence de l'infection à H. pylori selon le frotti coloré	55
3. Caractère biochimiques associé à Helicobacter pylori.....	56
4. Détermination de la concentration et la pureté d'ADN extrait à partir des biopsies gastriques.....	57
5. Détection des gènes de virulence de H. pylori par PCR.....	59
5.1. Caractéristiques générales des patients porteurs des gènes de virulence	59

Table des matières

5.2. La détection des gènes de virulence (Vac A m, Vac A s, Cag A) de H. pylori.....	60
5.2.1. Génotypage Vac A.....	60
5.2.2. Génotypage Cag A.....	61
Discussion.....	66
Conclusion et perspectives.....	71
Annexes.....	73
Références bibliographiques.....	78

Introduction Générale

Introduction Générale

La découverte en 1983 par Barry James Marshall et John Robin Warren de l'implication de *Helicobacter pylori* dans les maladies gastriques a révolutionné la gastroentérologie et leur a valu le prix Nobel de médecine et physiologie en 2005. (Fontaine V, Douat N., 2011)

L'infection par *H. pylori* est très répandue affectant près de 50 % de la population mondiale. Le taux d'infection varie en fonction de nombreux critères comme l'âge, l'origine géographique et les conditions socio-économique. (AboudouRaïmi K *et al.*, 2021)

Helicobacter pylori, est une bactérie microaérophile spiralé à Gram négatif (Mehasni S., 2019) capable de survivre et de persister à la surface de la muqueuse gastrique malgré l'acidité de l'estomac et une forte réponse immunitaire. Elle est désormais reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme la seule espèce bactérienne cancérogène pour l'homme. (Fontaine V, Douat N., 2011)

Cette dernière, commence généralement par une gastrite chronique superficielle souvent inaperçue, mais peut évoluer lentement sur des décennies, entraînant des affections plus graves telles que l'ulcère gastrique, le lymphome gastrique du MALT et l'adénocarcinome gastrique. (Diplo B., 2020) il est désormais évident que la présence du gènes de pathogénicité et leurs différentes combinaisons génotypique chez *H.Pylori* influencent le développement de maladies gastriques chez les patients .Certaines caractéristique génotypiques des souches de *H.Pylori* ,telles que les allèles s et m du gène *Vac A* et la présence du gène *Cag A* sont associées à la progression de l'infection vers des formes plus sévères .(Pascale M., 2011)

Les gènes *Vac A* *Cag A*, considérés comme des marqueurs de virulence sont responsables de la production de cytotoxines et de l'induction d'une réponse inflammatoire intense (Pascale M., 2011).

Le diagnostic de l'infection peut être réalisé par divers méthodes (invasive et non invasive).la culture permet notamment de déterminer la sensibilité aux antibiotiques. Cependant le taux d'éradication de l'infection est actuellement à son plus bas niveau, principalement en raison de la résistance aux antibiotiques qui varie selon la localisation géographique. (Fontaine V, Douat N., 2011) En revanche, la technique moléculaire utilisant la PCR présente une excellente sensibilité et spécificité, ce qui la rend une méthode d'identification précise et fiable pour le diagnostic de l'infection à *Helicobacter Pylori* (Mehasni S., 2019)

Introduction Générale

Notre étude vise d'abord à identifier les gènes de virulence (Vac A m1, Vac A s1, Cag A) chez les patients présentant des symptômes gastroduodénaux ensuite à tester l'association entre ces gènes avec différents types de pathologies gastrique (gastrite chronique, ulcère) qui sont identifiés dans notre populations d'étude et enfin comparer entre les différentes méthodes de diagnostic de l'H.pylori (test d'uréase, test anatomopathologique, test PCR).

Synthèse Bibliographique

Généralités sur HELICOBACTER PYLORI

1. Historique :

La première surprise a été la découverte de cette bactérie de grande importance clinique seulement à la fin du 20^e siècle. (Marshall B.J, Warren J.R., 1984)

En 1906 Walter Krienitz, un médecin allemand trouve des bactéries spiralées dans l'estomac d'un patient atteint d'ulcère gastroduodéal (Mehasni S.,2019). Des micro- organismes similaires auraient été observés dans la muqueuse gastrique de certains animaux et en ce qui concerne l'homme. (Bigard, M. A, et Colin.R., 1996)

Steer et Colin Jones (1975) découvrent chez l'homme une association entre l'ulcère gastrique et la présence à la surface de la muqueuse gastrique d'un micro-organisme visible au microscope optique et de coloration Gram négatif (Mehasni S.,2019). En 1981, Marshall et Warren, en raison de la forme spiralée de la bactérie et de la présence de flagelles engainées définirent cet organisme comme un **Campylobacter**. *H. pylori* est classé carcinogène de type I par l'Organisation Mondiale de la Santé en 1994. (SABRI Z., 2014)

En 2005 Barry Marshall et Robin Warren reçoivent le prix Nobel de physiologie et de médecine pour leurs travaux sur *H. pylori* et l'ulcère gastroduodéal. (Mehasni S., 2019)

2. Caractères bactériologique :

2.1.Structure :

H. pylori est une bactérie dont la structure externe est hélicoïdale ; munie de flagelles ; un agent pathogène gastro-intestinal pro-inflammatoire impliqué dans la pathogenèse de la gastrite chronique conduisant à l'ulcère gastroduodéal, au carcinome gastrique ou au lymphome (Maréchal B.J., 1983 et Nomura UN *et al* ; 1991). Elle possède 4 à 6 flagelles polaires et conférant une motilité et permettant un mouvement rapide dans la muqueuse gastrique visqueuse lui assurant ainsi une meilleure colonisation (Figure.1). C'est un bacille à gram négative spiralé mesurant 2 à 4µm de long et 0,5 à 1µm de large qui peut également exister sous une autre forme ronde dite coccoïde viable mais non cultivable (Diplo B., 2020).

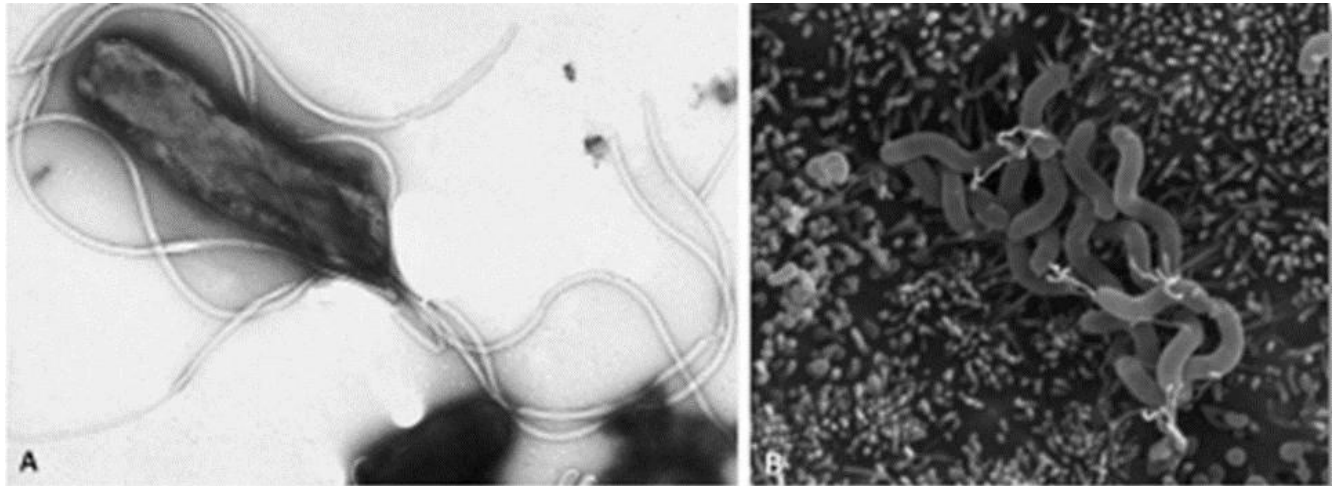


Figure 1: H. pylori sous microscope électronique

A. H. pylori ; **B.** Amas de H. pylori au niveau des cellules épithéliales gastriques (Tan S *et al.*, 2009)

2.2. Habitat :

Le réservoir de H. pylori est l'estomac humain. C'est le micro-organisme le plus fréquemment retrouvé dans la muqueuse gastrique humaine en association avec les cellules épithéliales humaines. Il vit préférentiellement dans l'antrum gastrique. (Kendouli F *et al.*, 2014).

3. Caractères Biochimiques :

H. pylori utilise les acides aminés et les acides organiques comme source d'énergie ce qui signifie que H. pylori est une bactérie asaccharolytique (Mehasni S., 2019).

H. pylori produit une uréase, une catalase, une oxydase, une alkylhydroperoxyde réductase et superoxyde dismutase qui lui permettent de résister au stress oxydatif généré par la réponse immunitaire. Elle n'acidifie pas les sucres et son activité uréasique est très intense, c'est une enzyme qui lui permet la survie à un PH très acide en présence d'urée. Toutes fois des travaux ont montré qu'il pouvait utiliser faiblement la voie des pentoses (Diplo B., 2020).

4. Exigence du germe :

La température optimale pour la croissance de ces bactéries est de 37°C (Sahi M.,1998). La bactérie est sensible à l'oxygène aux taux de l'air et requiert pour vivre une atmosphère appauvrie en oxygène. Elle requiert une concentration en O₂ de 3 à 6% (optimum de l'ordre de 5%) et une concentration en CO₂ de 6 à 10%. (Goodwin CS *et al.*, 1989)

5. Caractères génétiques :

Le génome de *H. pylori* a été séquencé pour la première fois en 1997 à partir de la souche 26695 chez un patient anglais atteint de gastrite chronique. L'ADN génomique (chromosomique) de *H. pylori* est une molécule circulaire unique de petite taille de 1,4 à 1,73 Mb selon les souches, mais l'analyse génomique de 30 souches a abouti à une valeur moyenne de 1,71 Mb (Mehasni S., 2019). En effet, les différences entre les souches s'expriment par des variations dans la taille des génomes, des réarrangements chromosomiques, la présence de séquences d'insertion, des gènes spécifiques de souches, des gènes mosaïques, la présence éventuelle de mutations ponctuelles et plus spécialement dans le gène de l'ARN ribosomique 23S conduisant à la résistance aux antibiotiques (SALAÛN L., 2001).

Le séquençage du génome de *Helicobacter pylori* a permis de comprendre de nombreux points concernant la pathogénicité de cette bactérie. Il existe aujourd'hui sept génomes d'*Helicobacter pylori* qui ont été séquencés dont quatre ont été publiés : la souche J99 ; la souche 26695 ; la souche HPAG1 ; la souche G27. Les génomes de ces trois premières souches ont 1379 gènes en commun et possèdent 10% de gènes spécifiques. Toutes ces souches possèdent l'îlot de pathogénicité *cag* (Sabri Z., 2014).

Le génome est composé d'une partie stable et d'une partie variable entre les souches d'où la diversité entre les souches. Il existe des îlots de pathogénicité tels que *cag* et *vag*. *Helicobacter pylori* est l'une des bactéries pathogènes présentant d'importantes variations génétiques entre les souches (Sabri Z., 2014).

6. Polymorphisme génétique associé à *Helicobacter pylori* :

Les populations de *H. pylori* sont génétiquement très diverses, en raison de mutations ponctuelles et de substitutions, insertions ou délétions plus importantes pouvant impliquer un ou plusieurs gènes ou segments multigéniques (y compris des gènes de restriction/modification et au moins un îlot de pathogénicité).

Un groupe spécial de polymorphismes implique des séquences répétées (répétitions mononucléotidiques ou dinucléotidiques) près des extrémités 5' des gènes appelées « gènes de contingence » (Martin J. Blaser et Douglas E. Berg., 2001).

Le génome de *H. pylori* présente plusieurs caractéristiques uniques dans sa structure spatiale :

- Environ 1 % du génome code pour une famille composée de 32 protéines de la membrane externe, appelées protéines des pores de la membrane externe des cellules. Ces protéines sont probablement liées à une sensibilité aux antibiotiques.
- Plus de 20 homologues contenus dans le génome de *H. pylori* sont associés à une restriction et à une modification de l'ADN.
- Ces homologues peuvent être impliqués dans la dégradation de l'ADN intra ou extracellulaire, ou dans l'activation de la recombinaison de l'ADN.
- De nombreux gènes plastiques connus ne sont pas liés à la pathogénicité, mais sont plutôt homologues à l'enzyme modifiée par restriction.
- La production de gènes de *H. pylori* est associée à la biosynthèse des lipopolysaccharides et au système de modification de restriction de l'ADN (Yu-Li Chen *et al.*, 2016).

6.1. Polymorphisme Vac A :

Le gène Vac A et Cag A ne sont pas toujours présents dans toutes les souches de *H. pylori* (Kishk R., 2021). Ceci est dû à des polymorphismes dans le gène VacA, en particulier à l'extrémité amino-terminale (région s), au milieu du gène (région m), et dans la région intermédiaire (région i). Le polymorphisme s2 donne une toxine inactive. Ainsi, les souches avec l'allèle s2 sont souvent appelés "VacA négative" (Esther Nina O., 2016).

L'identification ultérieure de la région *i* a montré que le polymorphisme *i1* est un facteur de risque significatif et indépendant du carcinome gastrique et fortement associé au polymorphisme *s1*, tous deux associés aux ulcères gastroduodénaux. Il a été suggéré que le typage de la région *i* de *VacA* pourrait suffire à déterminer le potentiel pathogène de la toxine. Les souches de l'allèle *s1m1* et *i1* ont été le plus souvent associées aux ulcères et au cancer gastrique. Plus probablement, *VacA* facilite l'acquisition des éléments nutritifs et l'amélioration de la capacité de *H. pylori* à coloniser l'épithélium gastrique. (Dacie R. Bridge et D. Scott Merrell., 2013) (Tableau 1)

Parmi les combinaisons alléliques possibles, les allèles *vacA s1/m1* sont la combinaison la plus virulente, tandis que les génotypes *s1/m2* et *s2/m2* ne présentent pratiquement aucune cytotoxicité (Dacie R. Bridge et D. Scott Merrell., 2013).

In vivo, les souches *cagA*⁺ augmentent le risque d'ulcère gastroduodéal, de gastrite atrophique et de cancer gastrique distal par rapport aux souches *cagA*⁻. Un deuxième locus polymorphe de *H. pylori* est *vacA*, qui code pour la cytotoxine vacuolante. Les souches de *H. pylori* du sous-type *s1a vacA* sont généralement fortement toxigènes et *cagA*⁺ et ont également été associées à des résultats cliniques plus graves (Nina Salima *et al.*, 2001).

Tableau 1 : Répartition des souches virulentes associés aux pathologies selon la localisation géographique

Souches virulentes	Pathologies associés	Localisation géographique
Vac A s1/m1	Cancer gastrique	Asie
	Ulcère gastro-duodéal	Japon
	Inflammation gastrique	Corée
	Atrophie gastrique	
Vac A s1/m1/i1	Cancer gastrique	
	Lésion précancéreuse	Pays occidentaux
Vac A i1/c1/d1	Carcinome gastrique	Belgique
		Portugal
		Amérique du Sud
		Asie
Vac A s2/m2	Reflux RGO	Asie
	Gastrite	Amérique du Nord
		Europe
Vac A m2	Lymphome du MALT	Asie
		Europe
Cag A +/- Vac A s1	Cancer gastrique	Chine
	Dommmages histologiques	Japon

6.2. Polymorphisme Cag A :

CagA est une oncoprotéine produite par *Helicobacter pylori*, ayant un poids moléculaire de 120 à 145 kDa en raison de ses polymorphismes C-terminaux issus d'une expansion répétée variable. Codé par le gène CagA situé dans l'îlot de pathogénicité Cag (Cag PAI). Les souches positives pour CagA provoquent des inflammations plus graves de la muqueuse gastrique, pouvant conduire à un ulcère gastroduodéal ou un cancer gastrique, des troubles cardiovasculaires, hématologiques et neurologiques. (Hiroko Nishikawa et Masanori Hatakeyama., 2017).

CagA agit en interagissant avec diverses protéines hôtes via sa queue C-terminale désordonnée, contenant des motifs répétés EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) et un motif de multimérisation CM. Les polymorphismes de cette queue influencent la virulence de CagA et l'issue des maladies gastro-intestinales. Lorsqu'elle est phosphorylée par les kinases de l'hôte, le motif EPIYA dérègle la protéine tyrosine phosphatase 2 (SHP2), induisant une signalisation mitogène pro-oncogène. Le motif CM, quant à lui, inhibe l'activité kinase du régulateur de polarité 1b (PAR1b). (Hiroko Nishikawa et Masanori Hatakeyama., 2017).

Les polymorphismes des motifs EPIYA et CM sont cruciaux pour l'action physiopathologique de CagA dans *H. pylori*, déterminant l'étendue de son effet oncogène (Hiroko Nishikawa et Masanori Hatakeyama., 2017).

6.3. Polymorphisme génétique de l'hôte :

Des études ont identifié 52 polymorphismes génétiques dans les gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1B, l'IL-6 et l'IL-8, ainsi que des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-1RN et l'IL-10, ce qui joue un rôle crucial dans le résultat clinique final chez un individu donné. Plus spécifiquement, chez les patients porteurs d'allèles produisant de manière élevée des cytokines pro-inflammatoires et d'allèles produisant de manière faible des cytokines anti-inflammatoires en augmentant le risque de développer des affections telles que la gastrite atrophique, les ulcères gastriques. (Hwang IR *et al.*, 2002)

La cytokine interleukine (IL1 β) est l'un des inhibiteurs physiologiques les plus puissants de la sécrétion gastrique acide. Elle est ainsi la cytokine clé de la réponse inflammatoire de l'hôte à *H. pylori*. Certains polymorphismes du gène codant pour l'IL1 β (Hwang IR *et al.*, 2002). Ils sont associés à un risque accru de développer une hypochlorydrie et une gastrite atrophique en réponse à l'infection par *H. pylori*, conditions préalables au développement d'un CG par *H. pylori*. Il a été démontré que les effets combinés des génotypes pro-inflammatoires de l'IL1 β et des facteurs de virulence bactériens de *H. pylori* (présence du gène *cagA*, génotype *vacA s1/m1*) conduisent à un risque nettement accru de développer un CG.

7. Epidémiologie :

7.1. Prévalence de l'infection dans le monde :

La prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* dans une communauté est liée à trois facteurs :

- Le taux d'acquisition de l'infection par *H. pylori*, c'est-à-dire l'incidence.
- Le taux de perte de l'infection.
- La persistance prolongée de la bactérie dans la muqueuse gastroduodénale entre l'infection et l'éradication (RE Pounder et Ng D., 1995).

L'infection à *H. pylori* est une des infections bactériennes les plus fréquentes dans le monde. Si bien que la prévalence en Asie, en Amérique latine et dans les pays en voies de développement est supérieure à 90%.

En Europe de l'Est la prévalence est de 50 à 70% et dans les pays occidentaux elle est de 30%. La prévalence dépend de l'âge, du pays d'origine du patient, de la zone géographique et des conditions socio-économiques (Sabri Z., 2014).

Dans les pays industrialisés, une minorité d'enfants est infectée et la prévalence de l'infection augmente proportionnellement pendant la vie d'adulte. L'infection touche 20% de la population de moins de 40 ans et 50% de la population de plus de 60 ans (Salaun L., 2001).

7.1.1. Gradient géographique :

Dans les pays en voie développement notamment les pays d'Afrique, la prévalence est constante de la grande enfance à l'âge adulte (Diplo B., 2020). Les facteurs de risque de l'acquisition de l'infection par *H. pylori* sont fréquemment liés à la pauvreté. Ils comprennent le manque d'hygiène, le partage de lit pendant l'enfance et le faible niveau d'éducation des parents.

L'organisation mondiale de gastroentérologie (OMG) observe une prévalence élevée de *H. pylori* chez l'adulte, soit 70% à 90% EN Amérique du sud et de 50% à 80% en Asie (Diplo B., 2020). (Figure.2)

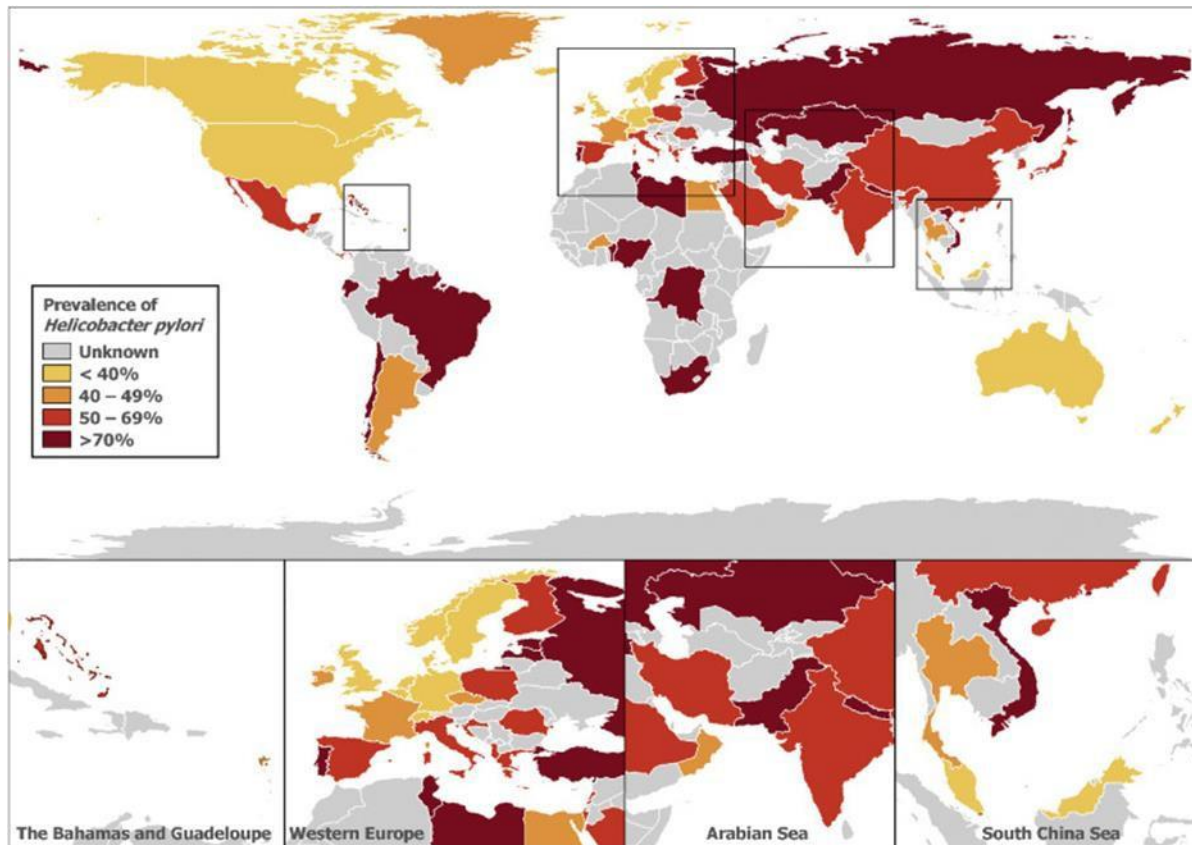


Figure 2 : Prévalence mondiale de l'infection à *H. pylori* (Wan Ying Lai *et al.*, 2017)

8. Source de contamination :

Les différentes sources potentielles de contamination par *Helicobacter pylori* comprennent les vomissements, la salive, les selles et l'eau (Mégraud F, 2003).

Les vomissures des sujets infectés contiennent du liquide gastrique avec la présence persistante de *H. pylori*, capable de survivre quelques heures dans l'environnement.

La salive, parfois positive en raison de régurgitations, peut également héberger la bactérie, comme démontré par une étude utilisant la technique de PCR (Sabri Z, 2014).

Les selles des sujets infectés représentent une source potentielle de contamination, bien que la survie de la bactérie dans l'environnement soit difficile à concevoir en raison de son adaptation à sa niche écologique (Sabri Z, 2014) avec une constatation non constante de la présence d'organismes viables pendant un court transit (Mégraud F, 2008).

L'eau dans les régions avec des systèmes d'assainissement limités peut être contaminée par les matières fécales humaines (Ramy K *et al.*, 2013) montrant la présence de formes viables de la bactérie, bien que l'infection par l'eau contaminée reste à prouver.

9. Mode de transmission :

9.1 La voie oro-oral :

C'est la principale voie de transmission dans les pays développés. Elle se font par le biais de la salive ou du liquide gastrique contaminés, lors de vomissement ou de reflux gastro-œsophagien RGO (Granstrom *et al.*, 1997). Certaines pratiques culturelles peuvent également faciliter la transmission oro-orale. Par exemple, dans les pays en voie de développements par les mères qui prémastiquent les aliments des enfants (Mégraud F., 2003).

9.2 La voie féco-oral :

Dans les pays en développement, la voie fécale-orale est plausible, dans les pays développés, les facteurs de transmission fécale-orale semblent avoir disparu, ce qui est en accord avec un taux de transmission actuellement rare, et probablement essentiellement par voie orale-orale (Mégraud F., 2003). La transmission de *H. pylori* à un autre hôte à partir des selles pourrait se faire directement par les mains en cas d'hygiène déficiente ou encore à cause de l'eau ou d'aliments contaminés (De Korwin. D et Lehours. J., 2010).

10. Pathogénicité de *H. pylori*

10.1 Infection par *H. pylori*

L'infection à *Helicobacter pylori* est désormais reconnue comme la principale cause d'infection attribuable au cancer dans le monde. Il est responsable de la plupart des adénocarcinomes gastriques de type intestinal (Varon ch et Mégraud F., 2013).

La gastrite liée à *H. pylori* est asymptomatique dans la majorité des cas (85%) mais peut évoluer vers des pathologies plus sévères comme le lymphome gastrique du MALT dans environ

0,1% des cas, l'ulcère gastrique et duodéal dans 5 à 10% des cas et 1% des cas qui présentent une gastrite atrophique évoluée vers un adénocarcinome (Mehasni S., 2019).

10.2. Pathologie digestive associée à H. pylori :

10.2.1. Gastrite aiguë ou chronique :

Elle se définit histologiquement comme un état inflammatoire persistant de la muqueuse gastrique diffuse ou localisée, associé à des altérations épithéliales pouvant évoluer vers l'atrophie et/ou la métaplasie intestinale (Christian S *et al.*, 2016). Elle induit une infiltration massive de polynucléaires neutrophiles au niveau de la muqueuse gastrique.

L'inflammation et la persistance de H. pylori permettent le passage de la gastrite aiguë vers une gastrite chronique. La gastrite fundique ou touchant l'ensemble de l'estomac est généralement associée à une hypochlorhydrie pouvant évoluer vers l'ulcère gastrique puis une atrophie avec un risque de cancer gastrique (Mehasni S., 2019).

10.2.2. Ulcère gastrique et duodéal :

Les ulcères se caractérisent par des lésions pénétrant jusqu'à la couche musculaire. H. pylori est responsable de 70% des ulcères gastriques et de 90% des ulcères duodénaux. (Doffou A., 2020). Les ulcères peuvent évoluer vers un cancer gastrique.

L'ulcère gastrique est localisé au niveau de l'antrum, plus précisément dans la région de transition entre le corps de l'estomac et l'antrum. La gastrite à prédominance corporelle conduit à une hypochlorhydrie et prédispose à l'ulcération gastrique et à l'adénocarcinome. (Doffou A., 2020)

L'ulcère duodéal est localisé au niveau du bulbe duodéal qui est le plus exposé à l'acidité gastrique. L'inflammation à prédominance antrale entraîne une production accrue d'acide à partir du corps non enflammé et prédispose à l'ulcération duodéale (John C. Atherton., 2006).

10.2.3. Adénocarcinome gastrique :

Ce cancer touche 10 à 70 personnes pour 100 000 selon les pays (Sobhani I., 2004). Il représente la 4^e cause de mortalité par cancer chez les hommes et la 5^{ème} cause de mortalité par cancer chez les femmes.

Il existe deux types d'adénocarcinomes gastriques : le type diffus composé de cellules néoplasiques individuelles infiltrantes qui ne forment pas de structures glandulaires et l'adénocarcinome de type intestinal qui progresse à travers une série d'étapes histologiques. (A. ZANAN., 2023)

Le stress oxydatif généré au cours de l'infection peut contribuer à un dysfonctionnement cellulaire et *H. pylori* induit des dommages oxydatifs directs au niveau de l'ADN (Pascale M., 2011). La fréquence des polymorphismes génétiques plus ou moins virulents des gènes *cagA* et *vacA* dans les différentes populations du globe est bien corrélée avec le taux d'incidence de cancers (Mehasni S., 2019).

10.2.4. Lymphome gastrique de MALT :

C'est un lymphome extra-ganglionnaire, qui se développe à partir du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT). A l'état normal, la muqueuse gastrique est dépourvue de lymphocytes. Lors de l'infection chronique par *H. pylori*, la réaction inflammatoire induit un afflux de lymphocytes de type B au niveau de la muqueuse gastrique.

Le lymphome se caractérise alors par une prolifération monoclonale des lymphocytes B de la zone marginale des follicules lymphoïdes (Zucca *et al.*, 1998).

11. Pathogénicité :

11.1 Facteur de colonisation :

L'*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) déploie plusieurs mécanismes pour assurer sa survie et sa virulence dans l'environnement gastrique. Tout d'abord, son expression abondante de l'uréase, une métalloenzyme à nickel localisée dans le cytoplasme, confère à la bactérie une résistance exceptionnelle à l'acidité gastrique. Cette uréase, codée par un opéron bicistronique et des gènes

accessoires, hydrolyse l'urée pour maintenir le pH intracellulaire près de la neutralité. Cependant, la production d'ammoniac par l'uréase peut être cytotoxique pour l'épithélium gastrique. (Mehasni S, 2019 et Diplo B, 2020).

De plus, la motilité de *H. pylori* est assurée par la rotation flagellaire, facilitant sa propulsion à travers le mucus gastrique visqueux. Les filaments flagellaires, composés de copolymères de flagellines, sont enveloppés dans une gaine protectrice, empêchant la libération d'épitopes immunogènes et permettant à la bactérie d'échapper à la réponse immunitaire. (Mehasni S, 2019 et Diplo B, 2020).

Enfin, l'adhérence de *H. pylori* à la muqueuse gastrique est cruciale pour sa multiplication et persistance. Des adhésines telles que BabA, SabA, AlpA, et AlpB facilitent cette adhérence, permettant à la bactérie de se localiser principalement dans la couche de mucus et à proximité des cellules épithéliales gastriques. (Mehasni S, 2019 et Diplo B, 2020).

Ces mécanismes d'adhérence sont spécifiques, interagissant avec divers récepteurs cellulaires, et contribuent à la virulence de *H. pylori* en favorisant sa colonisation et en modulant son interaction avec les tissus gastriques. Ces stratégies combinées permettent à *H. pylori* de persister dans la muqueuse gastrique, contribuant ainsi à sa pathogénicité (Mehasni S, 2019 et Diplo B, 2020).

11.2 Facteur de persistance :

La persistance de l'infection par *H. pylori* est rendue possible par des stratégies d'échappement aux défenses immunitaires incluant des mécanismes enzymatiques, des capacités à faire varier les motifs antigéniques présents à sa surface et le relargage d'antigènes immunodominants servant de leurres aux anticorps (Pascale Mustapha., 2011). *Helicobacter pylori* possède de nombreux atouts pour résister :

- La superoxyde dismutase (qui décompose les ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène).
- La catalase (qui dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène).
- Une famille d'enzymes dénommées peroxyrédoxines dont la plus connue est l'alkylhydroperoxyde réductase.

- Des protéines antioxydantes dont une protéine (NapA).
- Une thioredoxine réduisant le stress oxydactif.
- Une série d'enzymes (dont une endonucléase) qui réparent les dommages oxydatifs de l'ADN (Sabri Z., 2014).

11.3 Facteurs de virulence majeurs :

11.3.1 Ilots de pathogénéicité Cag (PAI) :

L'îlot de pathogénéicité cag PAI (cytotoxin associated gene Pathogenicity Island) est une région génomique de 40 kb comprenant une trentaine de gènes (Mehasni S ,2019). Les souches CagA positif de *H. pylori* sont associées à une plus grande inflammation et un risque accru d'ulcère et de cancer chez les humains et les animaux en expérience (Esther Nina Ontsira, 2017). Cet îlot code un système de sécrétion de type IV (SSTIV) ainsi que des protéines de la famille Cag. Le SSTIV permet la translocation de la protéine CagA, du peptidoglycane (PG) ainsi que d'autres éléments à l'intérieur de la cellule épithéliale (Diplo B., 2020).

L'appareil consiste en une douzaine de protéines (VirB 1-11 et VirD4) assemblées pour former 3 sous-parties interconnectées un complexe cytoplasmique/intracellulaire, un canal couvrant la double membrane et un pilus externe. Les protéines constitutives du SSTIV peuvent former des complexes homo ou hétérotypiques dont plusieurs sont indispensables au bon fonctionnement de la machinerie du système.

Parmi les protéines essentielles pour la translocation de CagA et/ou l'induction de l'IL. -8 au cours de l'infection, on peut citer les protéines Cag α , CagZ, CagS et CagM (Diplo B., 2020). (Figure. 3)

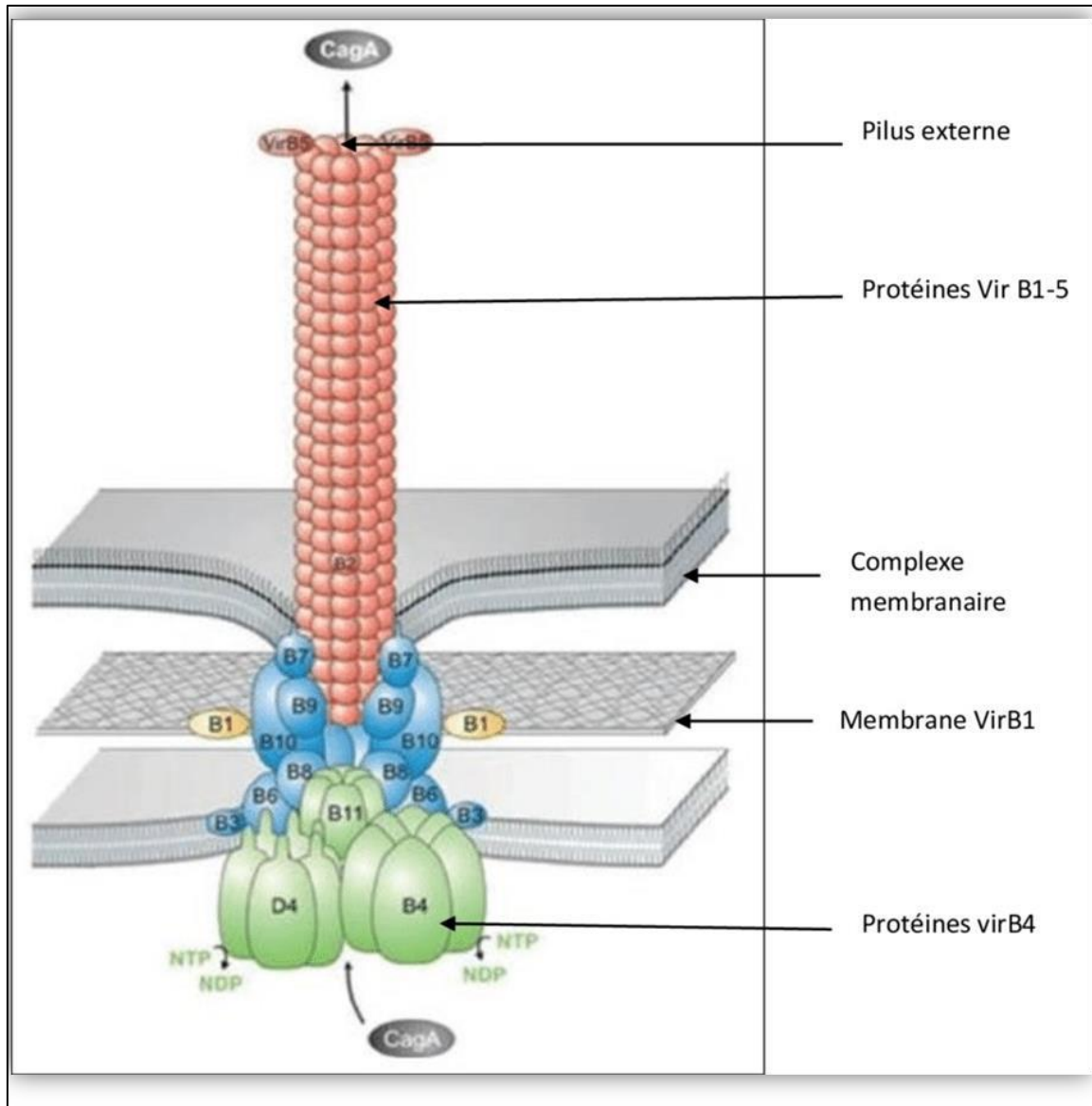


Figure 3: Architecture proposée du système de sécrétion de type IV de *H. pylori* (Diplo B., 2020)

La protéine bactérienne CagA est codée par le gène *cagA* présent à l'extrémité 3' de l'îlot *cag PAI*. Une fois injectée, elle est phosphorylée par les kinases de la famille Abl et Src au niveau d'une tyrosine située dans un motif EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr- Ala) présent en plusieurs copies et localisé dans la partie C-terminale de la protéine. En fonction des séquences flanquantes des motifs EPIYA, 4 segments EPIYA peuvent être distingués, EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C et EPIYA-D. (Mehasni S., 2019) (Figure.4)

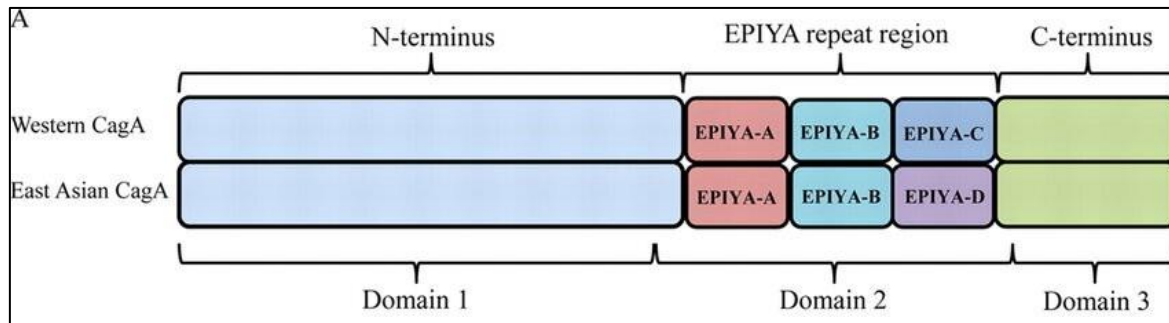


Figure 4 : Représentation schématique des motifs CagA et EPIYA (Pierre Valk *et al.*, 2012)

La phosphorylation de la protéine CagA entraîne des altérations morphologiques cellulaires désignés par « becs de colibris » (Mehasni S, 2019). CagA perturbe également le cycle de la cellule épithéliale via l'activation du facteur de transcription AP-1 qui est à l'origine de l'expression des proto-oncogènes tels que c-fos et c-jun. La protéine cagA non phosphorylée peut aussi avoir des effets pathogènes à l'intérieur de la cellule. Sa simple translocation entraîne l'activation aberrante de la B-catenine, des altérations au niveau des jonctions cellulaires apicales et une perte de polarité cellulaire (Diplo B., 2020).

11.3.2 Cytotoxine vacuolisante (Vac A) :

Le gène *vacA* code pour une protéine de 140 kDa qui au cours de sa sécrétion va être clivée aux extrémités N-terminale et C-terminal au niveau extracellulaire. La protéine mature est clivée en deux sous-unités A et B de 33 et 55 kDa liés de façon non covalente. La toxine se lie aux cellules épithéliales par l'intermédiaire de la plus grande sous-unité, puis elle est internalisée et localisée autour du noyau (Emilie Bessède., 2012).

Cette protéine hautement immunogène induit *in vitro* une vacuolisation intracellulaire et est capable d'immunosuppression en bloquant l'activation des lymphocytes T, ce qui contribue à la persistance et à la longévité de l'infection (Diplo B., 2020). La vacuolisation n'est pas le seul effet de l'intoxication par VacA.

La protéine VacA perturbe la fonction de barrière des cellules épithéliales, ce qui permet une fuite de nutriments essentiels tels que le fer, le nickel, et les acides aminés. Ceci améliore probablement la croissance de *H. pylori* (Esther Nina Ontsira Ngoyi., 2017). La séquence de *vacA* présente une grande diversité allélique au niveau de trois principales régions :

- La région s codant pour la séquence signal de la protéine, elle correspond à 2 allèles différents avec s1 (les sous types s1a, s1b et s1c) qui est associé à la toxine complètement active, et s2 qui produit une extension N-terminal courte bloquant la formation de vacuoles.
- La région i (intermédiaire) codant pour la sous unité p33. Cette région est divisée en 3 allèles i1, i2 et i3.
- La région centrale m codant pour une partie de la sous unité p55 avec les allèles m1 et m2 (m2a et m2b), m1 provoque une activité vacuolisante plus forte que m2. (Figure. 5)
- La région de délétion d dont le rôle reste encore mal connu est divisée en 2 allèles : d1 sans délétion et d2 avec une délétion de 69 à 81 pb (Mehasni S., 2019).



Figure 5 : Représentation schématique des allèles Vac A (Mehasni S., 2019)

La protéine vacA altère la structure de la cellule épithéliale, agit sur le cycle cellulaire et joue un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire. Elle peut s'accumuler au niveau de la membrane interne des mitochondries induisant une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial, une libération du cytochrome C, l'activation des capases 8 et 9 et l'induction de l'apoptose (Diplo B., 2020). (Figure. 6)

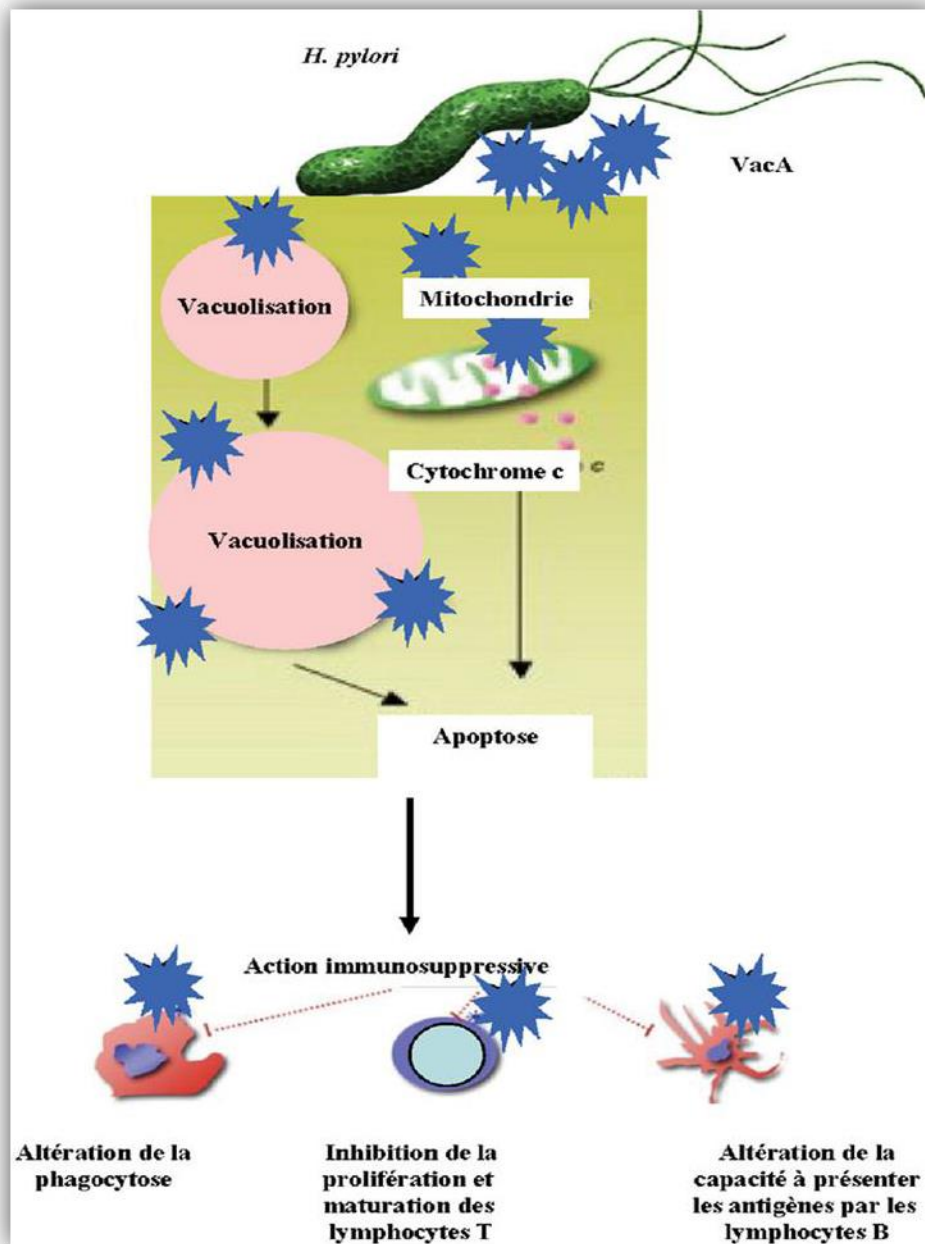


Figure 6: Effet pathologique de VAC A sur les cellules de l'hôte (SEBASTIEN BREUREC., 2012)

11.3.3 Les lipopolysaccharides (LPS) :

La majorité des souches de *H. pylori* expriment le LPS qui contient des antigènes oligosaccharidiques fucosylés structurellement similaires aux antigènes du groupe sanguin humain. De plus, dans 85% de cas, les LPS de *H. pylori* sont porteurs d'antigènes Lewis similaires à ceux

que l'on retrouve au niveau des glycoprotéines des cellules épithéliales de la muqueuse gastrique, ce qui permet à la bactérie d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Le LPS de *H. pylori* a été décrit comme faible activateur de la réponse immunitaire innée comparé à celui d'autres bactéries Gram-négatif (Kendouli F *et al.*, 2014).

12. Transition épithélio-mésenchymateuse :

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) caractérise un processus dynamique et réversible, au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales et développent des propriétés mésenchymateuses. (Jacek Baj *et al.*, 2020). (Figure. 7)

H. pylori implique une carcinogénèse gastrique liée à l'infection par cette bactérie est entre autres due à la transformation de cellules qui tapissent l'estomac (E.Bessède *et coll.*, 2013). Cette bactérie est la conséquence des effets d'une protéine présente dans certaines souches d'*Helicobacter pylori*, la protéine CagA. (Jacek Baj *et al.*, 2020).

Les souches de *H. pylori* CagA positives avec CagA contenant des motifs EPIYA fonctionnels pour la phosphorylation présentent une expression significativement plus élevée de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine, Snail et ZEB-1 et le marqueur de cellules souches CD44.

En outre, les microARN (miARN) suscitent un intérêt croissant, car ils joueraient un rôle dans la carcinogénèse et la progression gastriques (Jacek Baj *et al.*, 2020).

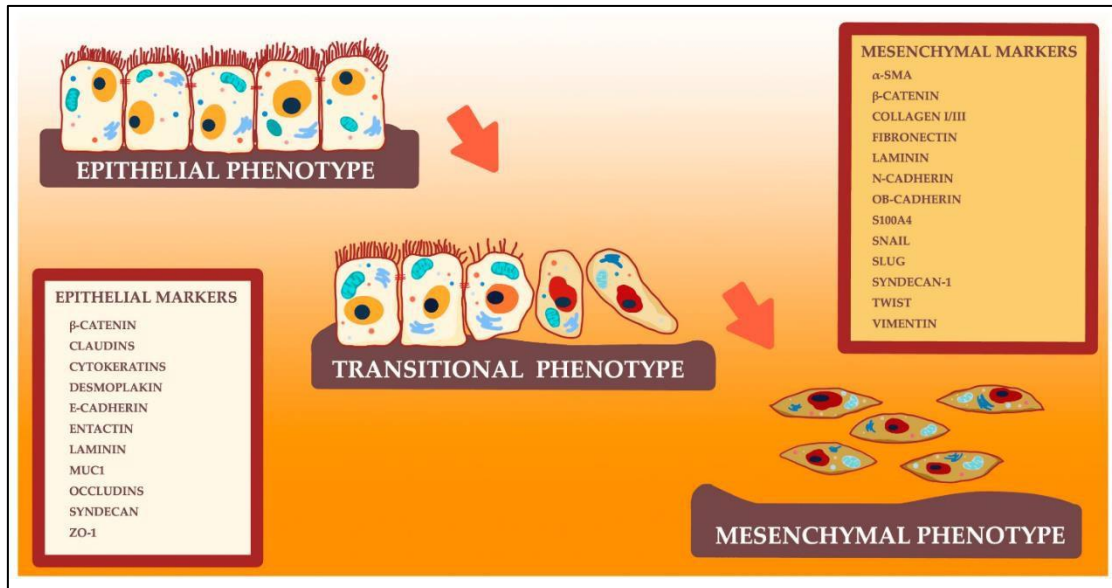


Figure 7: Schéma de la transition épithéliale-mésenchymateuse et marqueurs épithéiaux et mésenchymateuses (Baj, J., 2020)

13. Symptômes de l'infection de *H. pylori* :

De nombreuses personnes atteintes d'une gastrite provoquée par une infection à *H. pylori* ne présentent ni symptômes ni complications comme un ulcère gastroduodénal de l'estomac ou du duodénum. (Nimish Vakil., 2023) Un à 2% d'entre eux seulement présente suffisamment de symptômes pour consulter. Ce sont entre autres douleurs stomacales ou abdominales, reflux acide, régurgitation, vomissements, éructations, flatulences ; nausées.

L'infection peut être symptomatique ou asymptomatique on estime que 70% à 80% des infections sont asymptomatiques (Diplo B., 2020).

14. Résistance aux antibiotiques :

Contrairement à la majorité des bactéries, *H. pylori* devient résistant aux antibiotiques par une acquisition de mutation ponctuelle au niveau de chromosomes bactérien. Le taux de résistance aux antibiotiques est beaucoup plus élevé en cas d'échec d'éradication et est proportionnel au nombre de tentatives infructueuses (Fontaine.V et Douat N., 2011). Certaines souches de *H. pylori* sont résistantes à la fois aux imidazoles et à la clarithromycine, ce qui complique la recherche d'une association efficace, même en disposant d'un antibiogramme.

La résistance aux fluoroquinolones a été associée à une diminution de 66,7% du taux d'éradication. Plus récemment, l'utilisation directe de la PCR sur les biopsies gastriques sans passer par la culture bactérienne a permis de faire le diagnostic d'infection et de résistance aux antibiotiques en 2 à 3 heures avec une bonne sensibilité et spécificité (Kendouli F *et al.*, 2014). (Tableau 2)

Tableau 2 : Mécanisme de résistance aux principaux antibiotiques utilisés dans le traitement de l'infection à H.pylori et les cibles principaux (Kamiri., 2007 et Fontaine V, Douat N., 2011)

Antibiotiques	Mécanisme de résistance	de Gènes	Mutation principale
Clarithromycine	Altération de l'ARNr 23S	ARNr23S	ADNr 23S : A2143G A2142G
Métronidazole	Inactivation des nitroréductase NADPH insensible à l'oxygène	des rdxA+frxA	Gène rdxA Gène frxA Gène frxB
Amoxilline	Diminution d'affinité pour les protéines de liaison a la pénicilline (PLP)	Gène PLP	Gène PLP1
Tétracycline	Altération de l'ARN ribosomal 16S	16S ARNr	ADNr16S AGA965-6967TTC Délétion G942
Fluoroquinolones	Mutation (QRDR) du gène gyrA	Gène gyrA	Gène gyrA Position 87 Position 91

15. Diagnostic de H.P :

15.1. Méthode invasive :

15.1.1. Anatomo-pathologique :

Le diagnostic initial d'une infection par *H. pylori* était effectué par une analyse histologique. Cette méthode diagnostique reste l'une des plus couramment utilisées (Fontaine V, Douat N., 2011).

Cette méthode a en outre l'intérêt d'évaluer les lésions de la muqueuse, telles que l'inflammation, l'atrophie, la métaplasie intestinale et la dysplasie (Esther Nina O., 2016).

La fiabilité de cette technique va dépendre du nombre et du site des biopsies, du type de coloration, du pathologiste (compétence de l'observateur et temps qu'il consacre à l'observation), des circonstances de prélèvement (prise d'antibiotique, hémorragie) car les bactéries ne sont pas réparties de manière homogène au niveau de la muqueuse d'où la nécessité de faire plusieurs biopsies : deux biopsies fundiques et antrales et une biopsie au niveau de l'angulus de façon à éviter le biais d'échantillonnage (Sabri Z., 2014).

13.1.2 Test rapide à l'uréase :

Ce test est basé sur la propriété de *H. pylori* de posséder une uréase très forte. Les avantages de ce test sont sa facilité et sa rapidité. On obtient la réponse en salle d'endoscopie en 20 à 30 minutes. La limite de ce test est sa faible sensibilité : il faut en effet un nombre de bactéries important (supérieur à 10^5 /g) pour faire virer le test, ce qui limite son utilité pour le contrôle de l'éradication du germe après traitement, car dans ce cas le *H. pylori*, même s'il n'a pas disparu, ne sera pas détecté par cette méthode. La biopsie gastrique est déposée dans le gel qui a une coloration jaune. (Kendouli F *et al.*, 2014)

En cas de présence de *H. pylori* sur le fragment biopsique, l'activité uréasique a pour conséquence la production d'ammonium et de bicarbonate à partir de l'urée. Cette réaction vire au rouge violacé à une température comprise entre 30 et 40° (Kendouli F *et al.*, 2014).

Les gros avantages du test rapide à l'uréase sont sa simplicité, son faible coût et sa facilité d'exécution. Il s'effectue facilement dans une salle d'endoscopie. Lors d'un premier dépistage et en dehors de tout traitement, la positivité de ce test peut être suffisante pour démarrer le traitement (Fontaine V, Douat N., 2011)

13.1.3 Culture :

Seule méthode permettant de déterminer la sensibilité de *H. pylori* à tous les antibiotiques. Elle est recommandée chaque fois que possible et particulièrement après échec d'un traitement d'éradication. Deux biopsies de l'antra et du fundus sont nécessaires. C'est la méthode qui présente une meilleure spécificité (100%) et une sensibilité de 70 à 90%. Elle est utile pour l'adaptation du traitement antibiotique (Diplo B., 2020).

13.1.4 L'amplification génique (PCR) :

L'amplification génique a une excellente sensibilité et spécificité pour le diagnostic de l'infection (Jean-Charles Delchier *et al.*, 2015). La PCR est une technique qui permet d'obtenir rapidement de multiples copies d'un fragment d'ADN bactérien cible, plusieurs techniques sont utilisées :

La PCR standard multiplex et la PCR en temps réel détectent plusieurs cibles (présence de *H. pylori* et résistance à la clarithromycine) et la PCR multiplex couplée à l'hybridation sur bandelette détecte en plus la résistance aux quinolones. (D. LAMARQUE., 2012).

13.2 Méthode non invasive :

13.2.1 Sérologie :

La sérologie détecte les anticorps IgG spécifiques de *H. pylori* dans le sérum. Ses avantages sont son faible coût, sa large disponibilité et sa rapidité de réalisation (Jean-Charles Delchier *et al.*, 2015). Le taux élevé d'anticorps durant l'infection baisse progressivement dans les 4 à 6 mois suivant l'éradication. De ce fait, cette technique ne peut être utilisée que pour détecter précocement l'éradication. Il s'agit d'un test ELISA, son principe est fondé sur la mise en évidence des anticorps IgG anti-*H. pylori* qui peuvent être détectés dans le sang. D'autres techniques sont utilisées, telles que la technique d'immuno-blot, qui met en évidence des

anticorps sériques spécifiques dirigés contre des antigènes de *H.pylori* en particulier l'antigène Cag considéré comme un marqueur de virulence (Kendouli F *et al.*, 2014).

13.2.2 Test respiratoire a l'urée :

Le test respiratoire a l'urée marquée détecte une infection active par la mise en évidence d'une activité uréasique. En présence de *H. pylori*, l'ingestion d'urée marquée par un isotope non radioactif du carbone (^{13}C) est suivie du rejet de CO_2 marqué dans l'air expiré dont la quantité peut être mesurée. (Figure. 8)

Ces performances sont également excellentes pour contrôler l'éradication. La reproductibilité est excellente. La sensibilité du test est diminuée par les traitements par IPP, les antibiotiques et le bismuth qui réduisent la densité bactérienne et l'activité uréasique.

Le test doit être réalisé au moins 4 semaines après l'arrêt du bismuth ou des antibiotiques et au moins deux semaines après l'arrêt d'un traitement par IPP. (D. Lamarque., 2012).

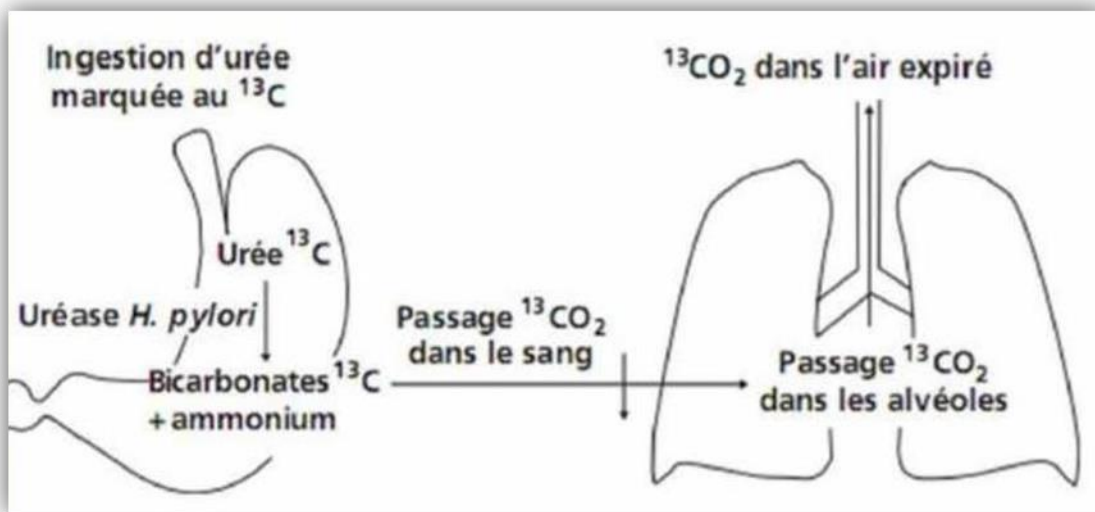


Figure 8: Principe du test respiratoire alluré marqué au ^{13}c (Mehasni S., 2019).

13.2.3 Détection antigénique dans les selles :

La recherche d'Ag de *H. pylori* dans les selles est réalisée avec un anticorps monoclonal dirigé contre la bactérie (HELUWAERT F.,2022). Cette technique est aussi performante que le test respiratoire (J.-D. de Korwin., 2020).

16. Traitement :

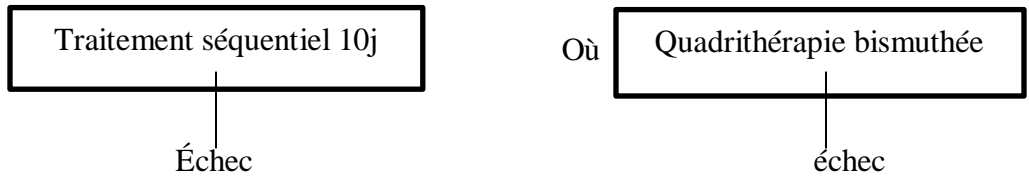
Le traitement n'est pas urgent ; il doit être différé chez la femme enceinte ou allaitante. Il doit être si possible guidé en fonction de la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques, notamment à la clarithromycine. Dans ce cas, il est possible de traiter le patient efficacement par « trithérapie guidée » pendant 10 jours.

L'efficacité du traitement doit être systématiquement contrôlée par un test à l'urée marquée car aucun antibiotique n'est efficace à 100 %. Si l'évaluation de la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques n'a pas pu être réalisée, le traitement est alors « probabiliste ». Il est aujourd'hui nécessaire de recourir à des quadrithérapies associant un inhibiteur de la pompe à protons (IPP) et 3 antibiotiques pendant 10 à 14 jours. (Haute Autorité de Santé HAS., 2017)

Deux types de quadrithérapies existent, l'une dite « concomitante » sur 14 jours (IPP, amoxicilline, clarithromycine, métronidazole) et l'autre « avec bismuth » sur 10 jours (IPP, sel de bismuth, tétracycline, métronidazole). La quadrithérapie « avec bismuth » est à privilégier en cas de prise antérieure de macrolide ou d'allergie à l'amoxicilline. Là encore, un test de contrôle à l'urée marquée est recommandé. (Haute Autorité de Santé HAS., 2017)

On notera que les anciennes modalités de traitement « probabiliste » par trithérapie de 7 jours associant un IPP et 2 antibiotiques ne sont plus efficaces face à l'augmentation des antibiorésistances. (Haute Autorité de Santé HAS., 2017).

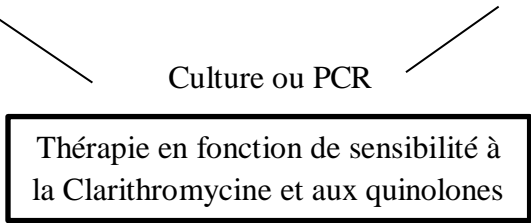
1^{ère} ligne



2^e ligne



3^e ligne



- Cl S : IPP- amoxicilline - clarithromycine 10 jours
- Cl R : IPP- amoxicilline – lévofloxacine 10 jours
- Cl R : IPP- amoxicilline – métronidazole 14 jours

Figure 9: Les 3 lignes de traitement de l'infection à H. pylori recommandées en France (Guillemot G., 2015)

Partie Pratique

Matériel et méthodes

1. Matériels biologiques :

Les biopsies ont été réalisées au niveau de l'antré, fundus et angulus chez chaque patient. Les biopsies ont été prélevées en salle d'endoscopie du Service de gastro-entérologie du Centre Hospitalier Universitaire, ainsi que dans le secteur privé de Tlemcen.

1.1. Type d'étude :

Il s'agit d'une étude descriptive analytique réalisée dans une période de 06 mois allant de janvier à juin 2024 effectué au niveau du Centre Hospitalier Universitaire du CHU de Tlemcen dans le but d'une étude moléculaire sur la pathogénicité de l'HELICOBACTER PYLORI.

1.2. Lieu d'étude :

Cette étude a été menée dans les services suivants :

- Service Gastro-entérologie CHU de Tlemcen.
- Service Anatomico-pathologie CHU de Tlemcen.
- Cabinet privé de Gastro-entérologie à Tlemcen.

1.3. Population étudiée :

L'étude a inclus 95 patients symptomatiques adressés au Centre Hospitalo-Universitaire CHU de Tlemcen au niveau du Service gastro-entérologie et dans le secteur privé, pour une endoscopie digestive haute.

1.3.1. Critères d'inclusion :

- Patient adultes âgés de 18 ans et plus.
- Patients des deux sexes.
- Toutes pathologies gastro-duodénales.
- N'ayant jamais reçu un traitement d'éradication contre H. pylori.
- Le consentement des patients des objectifs de l'étude.

1.3.2. Critères d'exclusion :

- Prise d'un traitement d'éradication contre H. pylori dans les deux semaines précédant la fibroscopie.
- Le refus du patient à participer à l'étude.

1.4. Collecte des données :

Le recueil des données a été réalisé à l'aide d'un questionnaire comportant des informations sociodémographiques, l'histoire de la maladie, les antécédents médicaux et familiaux des patients et un compte rendu de l'endoscopie digestive.

2. Méthodes :

2.1. Identification HELICOBACTER PYLORI :

2.1.1. Prélèvement des biopsies :

La recherche de H. pylori a été basée sur des méthodes directes invasives, nécessitant une fibroscopie. Les patients présentant une symptomatologie gastroduodénale, se présentaient à jeun pour subir une endoscopie digestive haute.

Deux prélèvements biopsiques de muqueuse gastrique sont réalisés au niveau de l'antrum, fundus et angulus pour chaque patient à l'aide de pince à biopsies stérile. Les biopsies prélevées sont placées, un dans un tube contenant 1.5 ml urée indole et l'autre prélèvement dans des flacons stériles contenant 100ml d'eau distillée pour l'étude moléculaire.

Le matériel d'endoscopie (fibroscope et pince) est nettoyé entre chaque examen. Après désinfection, le matériel est rincé.

2.1.2. Transport et conservation des biopsies :

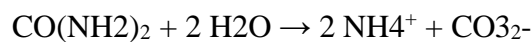
Les biopsies récupérées ont été transportées dans une glacière contenant des accumulations de froid de -4 C° et sont conservées dans du sérum physiologique et dans un milieu urée indole frais, au niveau du Laboratoire de la faculté SNV Abou Bkr Belkaid, le délai entre le prélèvement et la réalisation de l'examen ne doit pas dépasser les 4 heures.

2.1.3. Test rapide à l'uréase :

En présence de l'enzyme uréase d'origine bactérienne, l'urée subit une hydrolyse se transformant en ammoniac et en CO_3^{2-} .

Cette réaction s'accompagne de l'alcalinisation du milieu et du virage de l'indicateur de pH. Au bout de quelques minutes, la teinte jaune-orangé initiale du milieu évolue vers un rose fuchsia.

La dégradation de l'urée par l'uréase suit la réaction suivante :



L'hydrolyse des ions NH_4^+ en NH_3 (ammoniac) induit une alcalinisation significative du milieu, manifestée par le virage de couleur de l'indicateur de pH (le rouge de phénol) passant de sa teinte acide à une nuance basique (rose fuchsia).

Réalisation du test : un échantillon de biopsie fraîchement prélevé est placé dans un tube à essai en verre à 25 ml contenant 1,5 ml de milieu Urée-Indole dans l'heure suivant le prélèvement.

Le test est considéré positif si le milieu Urée-Indole, dans lequel la biopsie est immergée, change de couleur de jaune-orangé à rose fuchsia dans un délai de 30 minutes à 1 heure, indiquant une activité uréasique.

En revanche, le test est considéré négatif si aucune modification de couleur n'est observée après une heure. Les biopsies présentant un test d'uréase positif sont ensuite sélectionnées pour la recherche des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques. Il est important de noter que lorsque le test d'uréase est positif uniquement dans l'antré et le fundus, seule l'antré est utilisé pour les analyses en biologie moléculaire.

2.2. Examen anatomopathologique :

C'est un examen histologique utilisée pour la détection de *H. pylori*. Cette approche présente également l'avantage d'évaluer les altérations de la muqueuse.

La présence d'inflammation ne permet pas de confirmer une infection active si la bactérie n'est pas détectée. En revanche, l'absence de cellules inflammatoires dans le chorion indique l'absence d'infection. (Esther Nina O.,2016)

2.2.1. Frottis coloré :

Cette technique de laboratoire est employée pour détecter la présence d'*Helicobacter pylori* dans des échantillons de biopsies. Elle consiste à colorer ces échantillons soit avec une solution de Giemsa (qui donne une teinte bleue) soit avec une coloration à l'hématoxyline-éosine (HE, avec une teinte rose).

Ces colorants se fixent de manière spécifique sur les structures cellulaires de *Helicobacter pylori*. La coloration permet ensuite une observation microscopique plus nette et précise de la bactérie, facilitant ainsi son identification. L'observation au microscope a révélé la présence de bactéries bacillaires à Gram négatif, présentant une forme spiralée, en virgule, en C, en V ou en S.

2.3. Etude moléculaire :

2.3.1. Détection des gènes de virulence :

2.3.1.1. Extraction d'ADN de *Helicobacter pylori* à partir des biopsies gastriques :

Broyage des biopsies :

Une biopsie a été décongelé à température ambiante pendant 15 min, transféré dans un tube Eppendorf stérile, puis broyée à l'aide d'un broyeur mécanique ultraturax pour obtenir un broyat homogène.

Extraction d'ADN :

L'extraction des ADN est réalisée à l'aide des kits wiraspin tissue DNA pour l'isolement de l'ADN à partir d'une large variété des tissus animaux, organes et cultures cellulaires. Ce kit est spécifié à extraire l'ADN sur colonnes de spin à membrane de silice fonctionne sur le principe de liaison des acides nucléiques avec la silice.

Le matériel d'extraction d'ADN de *H. pylori* était composé de réactifs tels que la protéine K 20mg (qui est conservé avec des paques de glaçons a -20°C), l'éthanol froid 1ml qui est rajouter au solution ICB5 et WB5, lysis binding buffer 4ml (LBB5), inhibitor clean buffer 7ml (ICB5), Wash buffer 5ml (WB5), Elution buffer 2ml (EB5). (Figure.10)



Figure 10: kit wiraspin d'extraction ADN (Wiragen)

- **1^{ère} étape :** Mettre la solution de différents échantillons contenant la biopsie gastrique (d'un poids environ 10 à 20mg) dans un tube Eppendorf de 1.5ml et les faire centrifuger 3 min à 12000 g afin de récupérer la biopsie et obtenir un maximum de cellules lysées.
- **2^{ème} étape :** Après centrifugation ajouter 200 μl de lysis buffer et 20 μl de protéine k pour lysées les protéines, ensuite mixer le mélange pendant 2min et incubé tous les échantillons pendant 1h à 70°C .
- **3^{ème} étape :** Après incubation ajouter 100 μl d'isopropanol pour but de précipiter la méduse l'ADN et le séparer des protéines et d'autres contaminant présent dans la solution.

Transférer le contenu dans un tube spin qui a pour rôle d'attacher l'ADN a la colonne et le séparer de la solution. Centrifuger pendant 1 min à 12000 g (jeter le surnageant après chaque centrifugation), ensuite ajouter 500ul de l'inhibitor clean buffer pour nettoyer l'ADN puis centrifuge 1 min à 8000 g. (Figure.11)



Colonne spin

Figure 11: Colonne de spin d'ADN

- **4^{ème} étape :** Ajouter 500µl de Wash buffer puis centrifugé 1 min a 8000 g (répéter l'étape deux fois et mettre à la centrifugeuse 1 min à 13000 g).

Placez la colonne dans un tube propre de 1,5ml et laisser sécher les tubes environ 15 min ; mettre l'élution buffer dans un bain marie a 70C° pour le préchauffer.

- **5^{ème} étape :** Ajoutez 30 à 100µl d'élution buffer au centre de la colonne et laisser reposer environ 5 min puis centrifuger 1 min a 8000 g pour extraire l'ADN. (Figure.12)

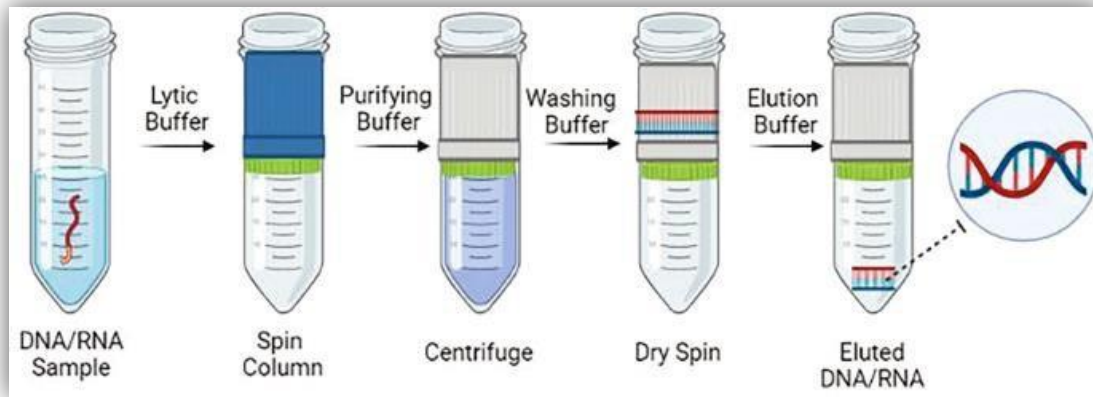


Figure 12: Extraction et purification d'ADN (Wiragen)

Tableau 3 : Rôle des différents tampons utiliser dans l'extraction d'ADN

Composants	Rôle
Lysis Buffer	Un tampon contient des détergents pour briser les cellules afin de libérer leur contenu
L'inhibitor clean buffer	Permet d'éliminer les inhibiteurs qui peuvent interférer avec les applications en aval comme la PCR
Wash buffer	Nettoyer et éliminer les impuretés (contaminants) des échantillons lors des processus de purification
L'élution buffer	Libérer et collecter les molécules purifiées

Vérification de la quantité et de la qualité d'ADN extrait par le spectrophotomètre :

La spectrophotométrie est la plus répandue et évalue la quantité d'acides nucléiques par mesure de l'absorbance à 260 nm. Leur pureté est évaluée en mesurant l'absorbance à 280 nm et 230 nm. (Figure.13)

Calculer la concentration d'ADN :

Pour savoir la concentration d'ADN soit on peut faire une lecture directe sur spectrophotomètre ou bien on la calcule selon la loi beer-Lambert, a une Absorbance = 1

correspond environ 50 µg/ml d'ADN double et une longueur de 10mm et ϵ (coefficient d'extinction) a 50µg/ml, l'équation est la suivante :

$$A=OD= \epsilon.L.C(ADN) \longrightarrow [ADN]=A_{260} \times 50\mu\text{g/ml} \times 50 \text{ (Facteur de dilution)}$$

Pureté d'ADN :

+ Ratio 260/280 :

Permet de détecter une contamination des acides nucléiques par des protéines, la valeur entre 1,8 et 2,0 indique une bonne pureté de l'ADN.

+ Ratio 260/230 :

Compris entre 2,0 et 2,2 indique une bonne pureté de l'ADN et un faible ratio signifie une contamination par les polysaccharides, du phénol ou des sels

Protocole du spectrophotomètre Nano drop :

- Nettoyer les surfaces de mesure
- Appliquez 2 µl de solution blanche. (Elution Buffer) sur la surface de mesure
- Mesurez le blanc et nettoyez les surfaces après
- Appliquez 2 µl de l'échantillon sur la surface de mesure
- Mesurez l'échantillon et nettoyez les surfaces après chaque mesure



Figure 13: Représentation d'une spectrophométrie Nanodrop Laboao LND-100 (Wiragen)

2.3.2. Amplification génique (PCR) associé aux gènes de virulence :

2.3.2.1. Elaboration d'amorce :

Nous avons utilisé le logiciel Primer 3 (<https://www.primer3plus.com/index.html>) pour l'élaboration des amorces (Rili,ines *et al.*, 2021 et Héléne Scornec., 2020) (Tableau 4)

- **Les conditions d'une bonne conception des amorces :**

- La longueur des amorces
- La température de fusion
- Contenu en GC (%)

Primer3Plus
sélectionne les amorces d'une séquence d'ADN

Primer3Manager Aide
À propos Code source

< Retour

Pair 1 :

Amorce gauche 1 : U29401.1 Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin h

Séquence: CTACGGCTGCCAATATGTG

Début : 1997 Longueur : 20 pb Tm : 59,4 °C CV : 55,0 % TOUT : 5,0 SOI : 3,0

Bonne amorce 1 : U29401.1 Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin h

Séquence: GCGTCAAATAATCCAAGG

Début : 22h40 Longueur : 20 pb Tm : 57,3 °C CV : 40,0 % TOUT : 5,0 SOI : 2,0

Taille du produit : 244 pb Associez n'importe lequel : 3,0 Fin de paire : 1,0

Envoyer à Primer3Manager Reset Form

```

1      AGAAAACCGG  CCAAGAGCG  AAAAGTTTT  TAAAAGCGG  ATAGCATCG
51     AGAAGAGGCT  TTGAACAAA  AAATGCGTT  GATGGACCC  CCACAGGCA
101    CGATCTGGGA  GAAGTTTTT  TAAACGCTC  CAATTTTAC  TTTTACACA
151    TTCAGGCCA  AAATTCAGC  CAATTTACT  TTTAACTCA  TGGGTTTTAT
201    ATTCAATTT  CTTAACCTA  TAAAATTTG  ACATGGTTG  TAGACTACTG
251    ATATTTATA  CCTTAATGT  AAATGCACA  GAATTTTCT  AGTATAAAT
301    CCGACCGTT  GTGCAAAAT  CGTTTTACA  AAAGAAAGG  AGAAATGGG
351    AATACACAA  ACACACGGC  AAATCATGG  CCGTATTAT  TCTCTGCTT
    
```

A

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Primer3Manager Help
About Source Code

< Back

Pair 1 :

Left Primer 1: Primer_F

Séquence: ATGGAAATACAACAACACAC

Start: 346 Length: 21 bp Tm: 52.5 °C GC: 33.3 % ANY: 2.0 SELF: 0.0

Right Primer 1: Primer_R

Séquence: CTGCTTGAATGGCCAAAC

Start: 631 Length: 19 bp Tm: 62.8 °C GC: 52.6 % ANY: 4.0 SELF: 0.0

Product Size: 286 bp Pair Any: 4.0 Pair End: 0.0

Send to Primer3Manager Reset Form

```

1      AGAAAACCGG  CCAAGAGCG  AAAAGTTTT  TAAAAGCGG  ATAGCATCG
51     AGAAGAGGCT  TTGAACAAA  AAATGCGTT  GATGGACCC  CCACAGGCA
101    CGATCTGGGA  GAAGTTTTT  TAAACGCTC  CAATTTTAC  TTTTACACA
151    TTCAGGCCA  AAATTCAGC  CAATTTACT  TTTAACTCA  TGGGTTTTAT
201    ATTCAATTT  CTTAACCTA  TAAAATTTG  ACATGGTTG  TAGACTACTG
251    ATATTTATA  CCTTAATGT  AAATGCACA  GAATTTTCT  AGTATAAAT
301    CCGACCGTT  GTGCAAAAT  CGTTTTACA  AAAGAAAGG  AGAAATGGG
351    AATACACAA  ACACACGGC  AAATCATGG  CCGTATTAT  TCTCTGCTT
    
```

B

Primer3Plus
sélectionne les amorces d'une séquence d'ADN

Primer3Manager Aide
À propos Code source

< Retour

Pair 1 :

Amorce gauche 1 : NZ_CP071982.1 : 542550-546107 Chromosome MT

Séquence: GTTGATAACGCTGTGCGCTTC

Début : 95 Longueur : 20 pb Tm : 58,5 °C CV : 50,0 % TOUT : 4,0 SOI : 1,0

Bonne amorce 1 : NZ_CP071982.1 : 542550-546107 Chromosome MT

Séquence: GATCCCCAAATTTCTGAAAGC

Début : 346 Longueur : 21 pb Tm : 59,9 °C CV : 42,9 % TOUT : 7,0 SOI : 3,0

Taille du produit : 252 pb Associez n'importe lequel : 4,0 Fin de paire : 3,0

Envoyer à Primer3Manager Reset Form

```

1      ATGACTRACG  AAAACTATT  GACCAACCA  CAAACCGAA  CGGCTTTTAA
51     CCCGGCAGCA  ATTTATCA  ATCTTCAAG  TAGCTTTTCT  TAAA GTTGAT
101    AACGCTGTG  CTTC ATACGA  TCCTGATCA  AAACCAATCG  TTGATAAGAA
151    CGATAGGGAT  AACAGGCA  AG CTTTGTG  AATCTCGCA  TTAAGGGGAA
201    AATACTCCA  TAAAGCGAT  C AAAATCCT  ACCAAAAG  AATCAGTATT
251    TTTCACTT  TATCAATAG  AGCAATGAT  TAATCAACA  AGACGCTCTC
301    ATTGATGTG  AATCTCCAC  AAAGA GCTTT CAGAAAT  TGGGATC AGCG
351    TTACCAATT  TTCACAAG  T GGGTGC  TCAAAACGAT  CCGTCTAAAA
    
```

C

Figure 14 : Elaboration des amorces du gène Vac A par le logiciel primer 3 plus. A : les amorces du Vac A m1. B : les amorces du Vac A s1.C : les amorces du Cag A

Tableau 4 : les séquences d'amorces utilisées pour l'amplification des gènes de virulence par PCR

Région	Amorces	T°	Amplicons (Pb)
Vac A S1	F : 5'ATGGAAATACAACAAACACAC 3'	52.5	286 pb
	R : 5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	62.8	
Vac A m1	F : 5'CTACGGCTGCCACTAATGTG 3'	59.4	244 pb
	R : 5'GCGTCAAATAATTCCAAGG 3'	57.3	
Cag A	F : 5'GTTGATAACGCTGTCGCTTC 3'	58	252 pb
	R : 5' GATCCCCAAATTTCTGAAAGC 3'	59.9	

Après élaboration des amorces nous avons vérifié la spécificité des amorces par le logiciel in silico PCR amplification (<http://insilico.ehu.es/PCR/>)

2.3.2.2. La réalisation de la PCR :

Le matériel d'amplification génique était composé d'un kit d'amplification constitué de :

- ✓ La réaction PCR est de 50 µl
- ✓ Buffer de la Taq x 10 (Il permet de protéger l'activité de l'enzyme)
- ✓ DNTp 2.5 Mm
- ✓ Amorce Vac A s1 et Vac A m et Cag A (Forward 10µl, Reverse 10µl)
- ✓ Taq 5 µl
- ✓ DdH₂O 10 µL
- ✓ ADN 1 a 2 µl

- **Les différentes étapes de la PCR :**

1^{ère} étape :**➤ Solution mère :**

Les amorces Vac A s1, Vac A m et Cag A doivent être diluées en ajoutant 200 μ L de ddH₂O. Agiter soigneusement le mélange pour que les amorces se décolle de la paroi des tubes ensuite centrifuger pour récupérer les gouttelettes d'eau. (Figure.15)

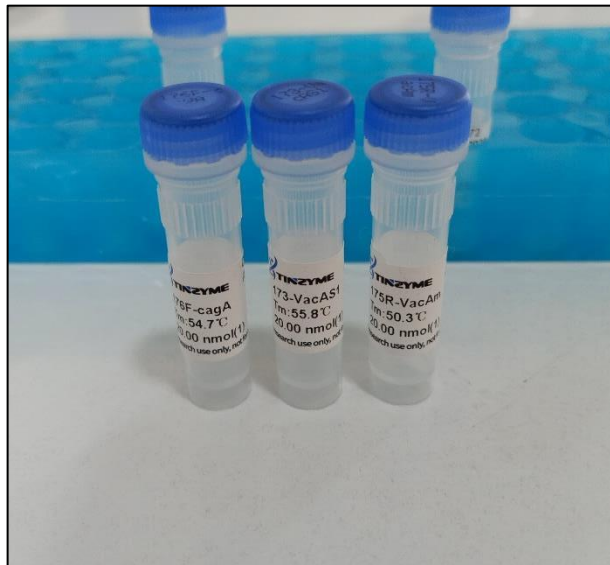


Figure 15: Représentation des 3 primers (Vac A s1, Vac A m et Cag A)

➤ Solution fille :

Dans un tube Eppendorf de 1.5 ml prélever 20 μ l de la solution mère (amorce + ddH₂O) et 180 μ l de ddH₂O.

➤ Solution Mix des 3 primers :

Préparé le mélange mix de PCR pour 30 tubes (c'est-à-dire 10 tubes pour chaque 3 primers), qui est composé de 401 μ l de ddH₂O, 55 μ l de buffer, 44 μ l de dNTP, 13.75 μ l d'amorce et 11 μ l de la Taq. (Figure.16)

Remplir les tubes avec le mélange et ajouté 2 μ L d'ADN extrait de nos patients et faire centrifuger 30 tubes avant de les mettre dans le thermocycleur.

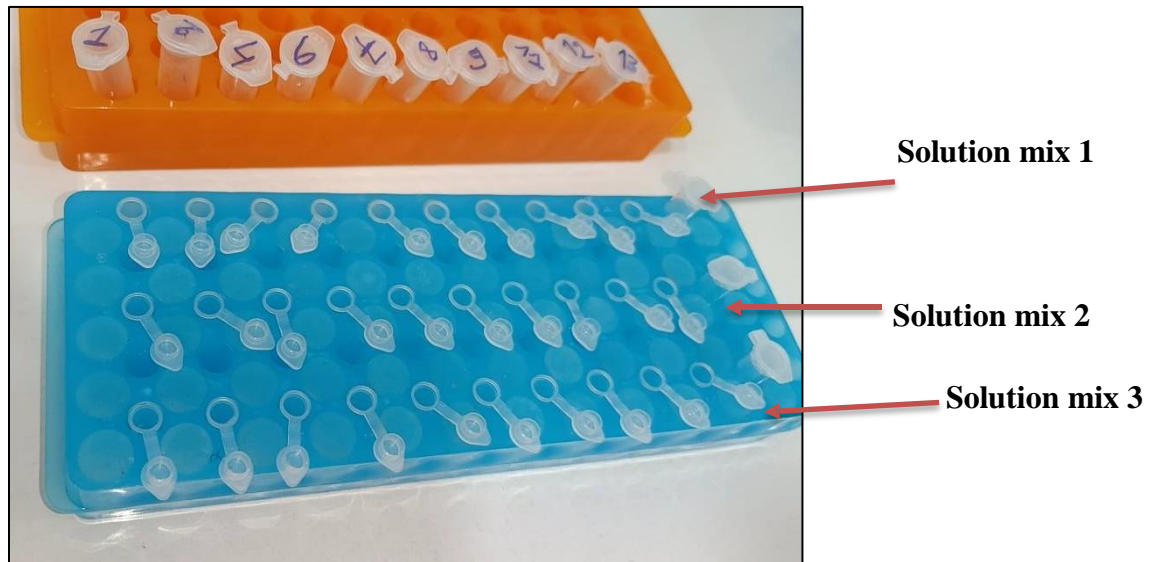


Figure 16: Préparation des solutions mix des 3 primers

2^{ème} étape :

La seconde étape est celle de la dénaturation. Elle se fait à 94 C° pendant 4 minutes. On réalise 35 cycles :

- Dénaturation à 94 C° pendant 30 secondes
- Hybridation à 50 C° pendant 30 secondes
- Elongation à 72 C° pendant 1 minute, suivie d'une dernière élongation pendant 10 minutes à 92 C°.

Mettre les tubes dans le thermocycleur pendant 2h10 minutes. (Figure.17)



Figure 17: Représentation d'un thermocycleur PCR (MiniAmp Wiragen)

3^{ème} étape :

➤ **Préparation du gel d'agarose :**

- Diluer 50 ml de TAE (10%) (tris acétate /EDTA) et ajouté 450 ml d'eau distillée.
- Dans un bécher, mélanger 1g d'agarose avec 50 ml de TAE dilué.
- Chauffer le mélange dans un micro-ondes jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissoute, laisser refroidir quelques minutes.
- Ajouter 1 μ l de Golden view au mélange pour donner une couleur à l'agarose.
- Remplir le support peigne avec le gel (pour former des puits d'ADN) et laisser refroidir environ 15 min.
- Placer le support dans la cuve d'électrophorèse et le remplir avec le mélange de TAE et d'eau distillé. (Figure.18)

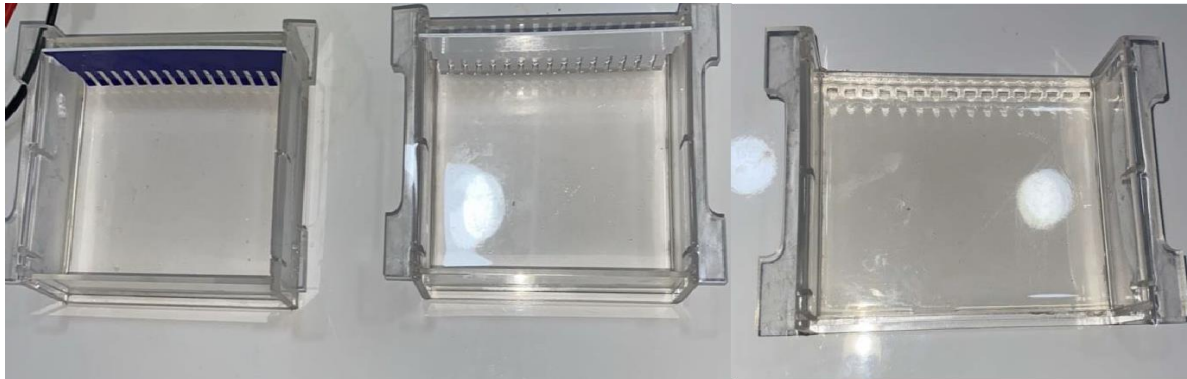


Figure 18: Formation des puits d'ADN (Wiragen)

➤ **Préparation des échantillons :**

- Mettre 4 μl de marqueur de taille qui possède 100 pb dans le premier puit.
- Prendre 3 μl de tampon de charge et le mélanger avec 10 μL d'ADN.

➤ **Migration et visualisation des bandes :**

- Brancher les électrodes et allumer la machine à électrophorèse à 130V pendant 25 min pour la migration puis visualisation des bandes qui correspond aux fragments d'ADN sous lumière UV. (Figure.19)

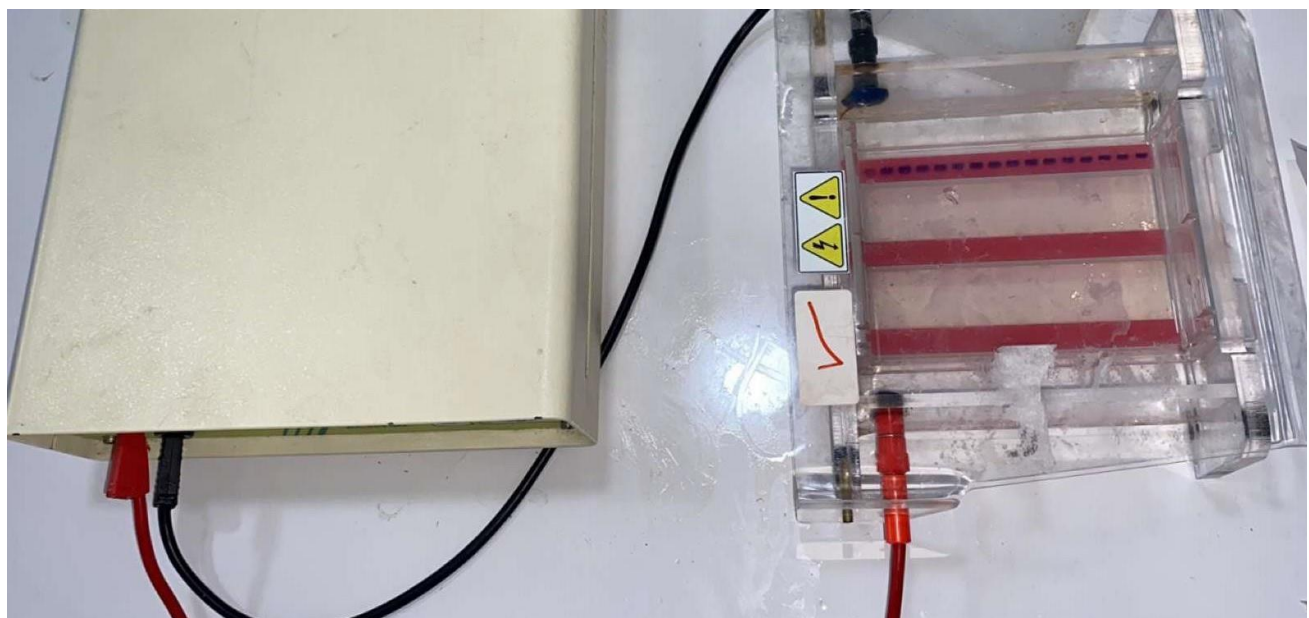


Figure 19: Migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% (Wiragen)

3. Etude statistique :

Les données ont été traitées par le logiciel Minitab 20.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage (%) pour effectuer le test Khi2 on a réalisé des analyses des composantes principales (ACP), des tests de régressions linéaires multiples chez nos patients présentant des symptômes gastroduodénaux.

Les résultats sont considérés statistiquement significatifs à partir d'une valeur de $p \leq 0,05$.

Résultats

1. Description de la population :

1.1. Caractéristique sociodémographique :

Dans cette étude, 95 patients ont été collectées ayant subi des biopsies gastriques âgé de 18 à 80 ans, 55 étaient de sexe féminin, avec une prévalence de (58%) et 40 de sexe masculin, avec une prévalence de (42%) et un sexe ratio H/F de 0,72 et une prévalence globale de 61%. Leur âge moyen était de 45 ans (avec un écart type de 15,77). (Figure.20)

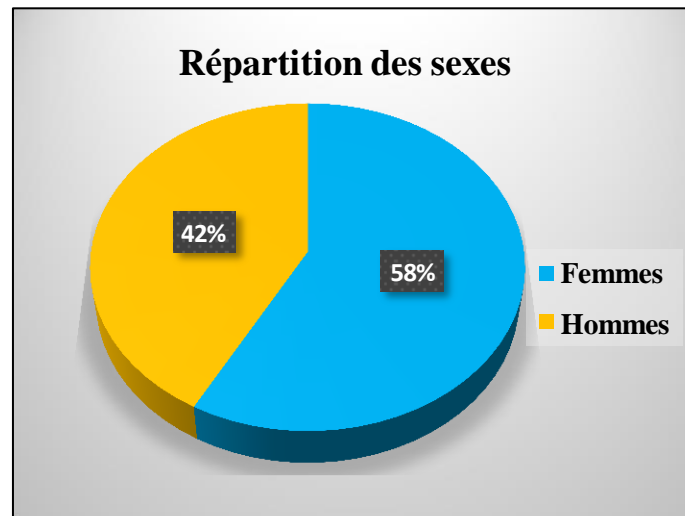


Figure 20: Répartition des sexes H/F

Un diagramme en colonnes illustre le taux d'infection à Helicobacter Pylori. Les résultats révèlent que chez les femmes le taux de succès à HP+ est de 17% et le taux d'échec est de 22%, tandis que chez les hommes, le taux de positivité est de 6% et le taux d'échec est de 16%. (Figure.21)

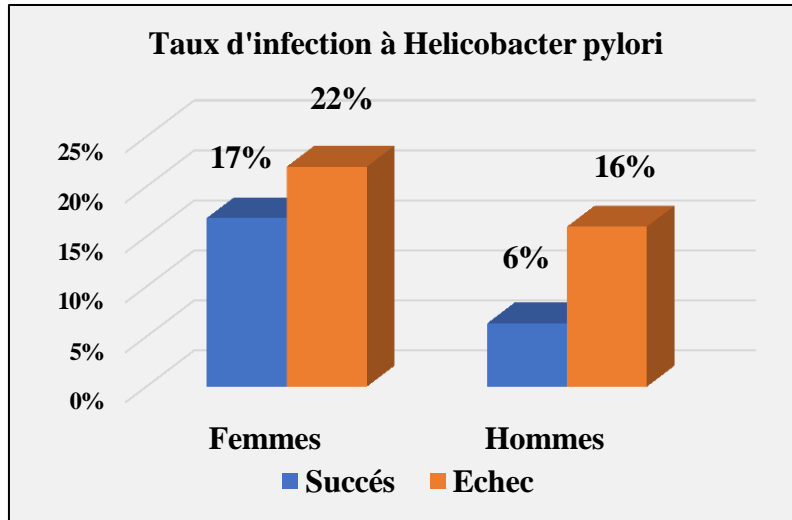


Figure 21 : Taux d'infection à Helicobacter pylori

1.2. Tranches d'âge selon le siège :

La gastrite antéro-fundique est la pathologie la plus fréquente dans toutes les tranches d'âge, suivie par la gastrite chronique. L'ulcère bulbaire est moins fréquent et semble se manifester principalement chez les jeunes adultes (20-39 ans) et les personnes âgées (60 ans et plus). (Figure.22)

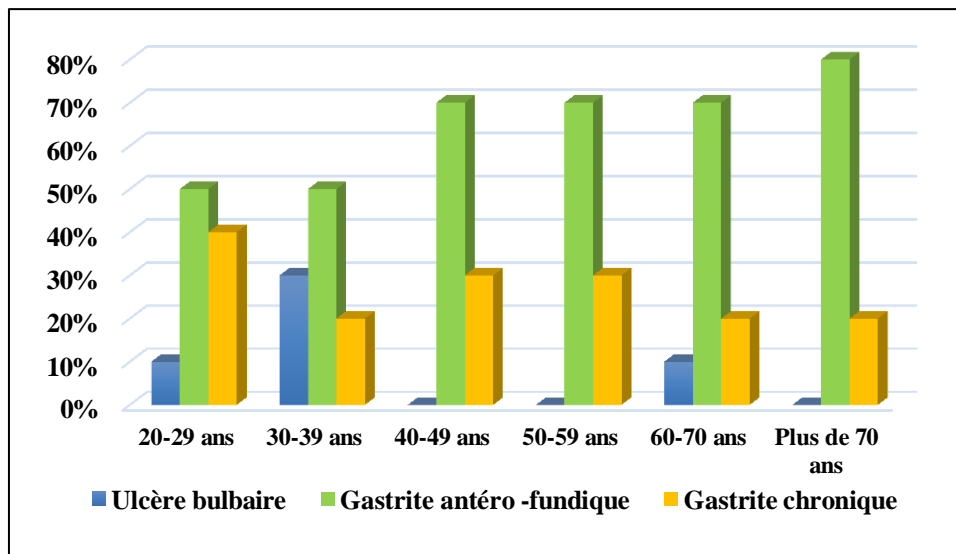


Figure 22 : Répartition des tranches d'âge selon les sièges

1.3. Paramètre du bien-être social :

La majorité des patients prélevés vivaient dans des conditions de promiscuité, ce qui signifie qu'ils partageaient leur logement avec plus de 2 personnes par pièce en moyenne (62%), d'autres était plus de 5 personnes mais ne partageaient pas les même pièces (43%). En outre, la consommation d'alcool et de tabac était rare parmi les patients prélevés.

1.4. Antécédents familiaux :

Sur un total de 95 patients, 47% avaient des antécédents familiaux de pathologies gastro-duodénale sans préciser ni la gravité ni le siège, et 5% d'entre eux avait un syndrome ulcéreux, une prévalence de 21% des patients n'avait pas d'antécédents familiaux. (Figure.23)

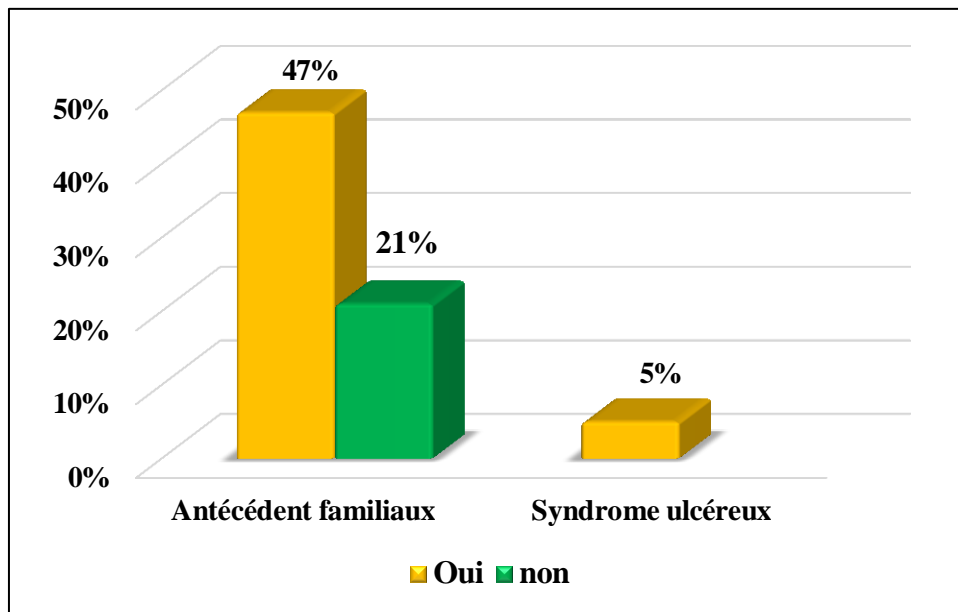


Figure 23 : Répartition des antécédents familiaux et syndrome ulcéreux

1.5. Les gènes virulents :

Notre étude avait mis en évidence la présence des facteurs de virulence selon l’amplification par PCR et a donné les résultats suivants : 60% des patients possèdent Vac A m1/Cag A+, 10% des cas possèdent les gènes Vac A m1/s1+ et 30% n’ont pas les gènes de virulence Vac A m1-, s1- et Cag A-. (Figure.24)

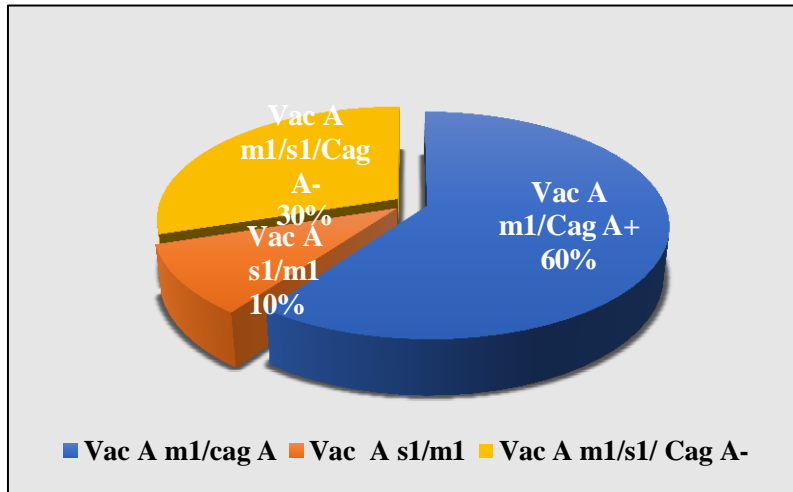


Figure 24: La répartition des gènes de virulence

1.6. Les différents types de pathologies gastriques selon le siège :

Le tableau suivant représente la distribution des taux d’infection à Helicobacter Pylori dans les différentes pathologies gastro-duodénales. Révélant que 66% des cas sont associés à une gastrite chronique, 83% à une duodénite chronique, et 80% d’ulcère gastrique et bulbite, 0% d’adénocarcinome n’ont pas de HP+.

Tableau 5: Répartition des pathologies gastro-duodénales à HP+

Aspect endoscopique	Nombre	Hp+	Pourcentage %
Gastrite chronique et superficielle	70	46	66%
Adénocarcinome	9	0	0%
Duodénite sub-aigüe	6	5	83%
Bulbite	5	4	80%
Ulcère bulbaire	5	3	60%
Total	95		

HP+ : Helicobacter pylori positive

2. La mise en évidence de la présence de H. pylori dans les biopsies gastriques :

2.1. La prévalence de l'infection à H. pylori selon le test à l'uréase :

La prévalence de l'infection à H. pylori, évaluée à l'aide du test rapide à l'uréase, était de 55%. Les résultats ont révélé un taux de positivité similaires dans l'antré, le fundus et dans l'angulus sans différence significative entre les biopsies de l'antré et celles du fundus et de l'angulus. (Figure.25)

La spécificité du test à l'uréase était de 70%, les échantillons de biopsies gastriques soumis à un test d'uréase, six ont montré un changement de couleur indiquant un résultat positif. Cependant, certains échantillons négatifs du test d'uréase, se sont révélés positifs par PCR et inversement. En outre, un échantillon s'est avéré négatif à l'examen anatomopathologique mais positif par PCR.



Figure 25: Principe du test à l'uréase

2.2. La Prévalence de l'infection à H. pylori selon le frotti coloré

L'observation de longs bacilles Gram-négatifs allongés, colorés en rose par le colorant H. E (Hématoxyline-éosine) et en bleu par le colorant Giemsa, présentant une structure hélicoïdale, indique la présence de H. pylori avec une spécificité de 80% selon le test anatomo-pathologique.

Cette observation confère au diagnostic par frottis une spécificité et une sensibilité similaires à celle de la culture. (Figure.26)

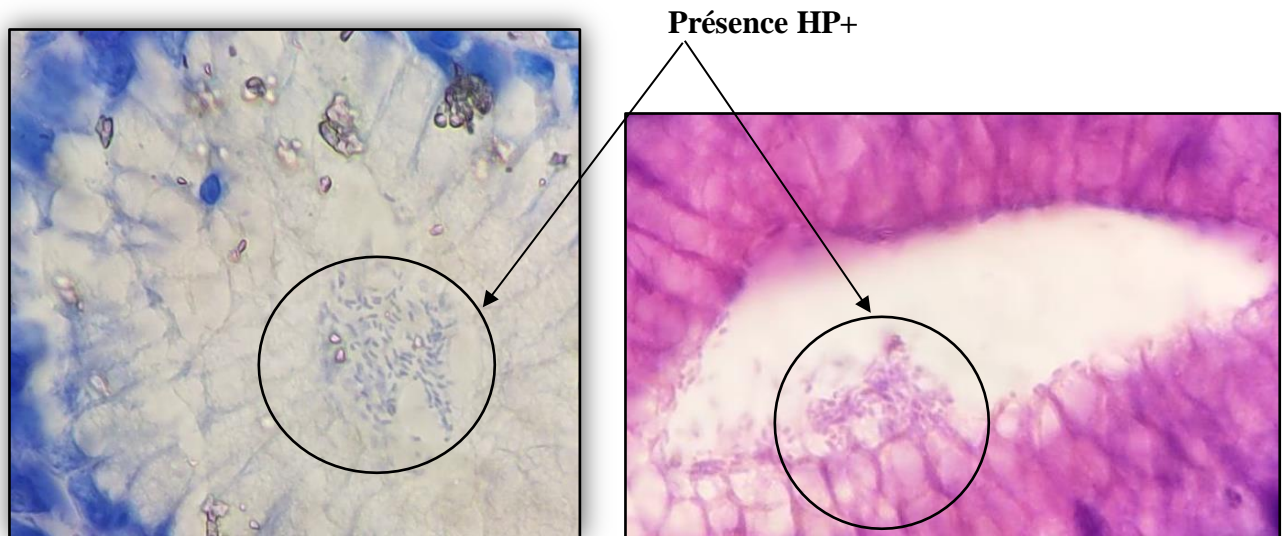


Figure 26: Frotti coloré par Giemsa et H.E en présence H.P x100 (Service anatomopathologie CHU-Tlemcen)

3. Caractère biochimiques associé à *Helicobacter pylori* :

L'identification de *Helicobacter pylori* par les tests biochimiques consiste en une recherche de la γ -glutamyl transférase, de la phosphatase alcaline, de la nitrate réductase, à l'uréase, de la catalase et de l'oxydase pour but de déterminer la sévérité et la charge bactérienne (Figure.27)

- **Catalase et oxydase** : Ils ont été détectés chez environ 90% des souches avec une forte activité enzymatique dans les groupes Hp. G et Hp. UB tandis que les autres groupes possèdent un pourcentage plus faible.
- **γ -GT** : Les groupes Hp G et Hp UB montrent une activité similaire et élevée avec un taux de 45%, et une forte charge bactérienne ce qui est probablement due à la sévérité de ces pathologies, contrairement aux autres groupes Hp B et Hp UG résultent une diminution d'activité enzymatique.
- **P.A** : Les résultats sont pratiquement similaires avec un taux de 42%.
- **N.R** : possèdent une légère activité enzymatique avec un taux de 17 % dans le groupe Hp. G et une faible activité chez les différentes pathologies.

- **UTB** : Le test de l'uréase montre une forte positivité dans les groupes Hp G et Hp UB avec une moyenne de 58%.

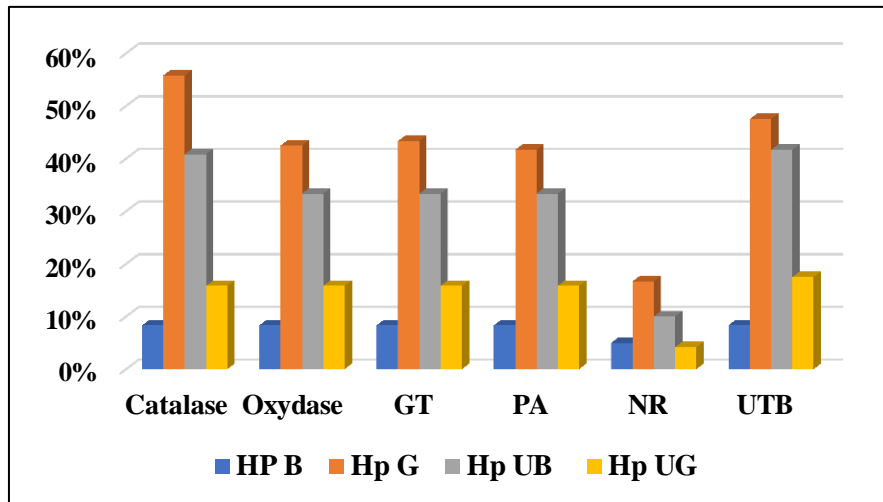


Figure 27: Détermination de la variabilité enzymatique chez les souches d'Helicobacter pylori

4. Détermination de la concentration et la pureté d'ADN extrait à partir des biopsies gastriques :

On a extrait une moyenne de 86% à partir des biopsies gastriques, avec 43% HP positives.

Concentration d'ADN :

Les acides nucléiques ont la propriété d'absorber les U.V très fortement a une longueur d'onde de 260 nm ce qui permet de déterminer la concentration d'ADN en ng/μl des échantillons et nos échantillons possède une bonne concentration qui varie entre 20 et 50 ng/μl (Tableau 6)

Pureté de l'ADN :

✚ Rapport A260/A280 :

Selon le tableau (6) les mesures du rapport d'absorbance A260/A280, nos échantillons présentent une pureté adéquate avec des valeurs comprises entre 1.8 et 1.9

✚ Rapport A260/230 :

Selon le tableau (6) les mesures de rapport d'absorbance A260/A230, nos échantillons présentent une faible pureté, avec des valeurs comprises entre 1.89 et 0.85 ce qui est inférieur à 2. Ces résultats indiquent la présence de contaminations dues à des impuretés ou des substances absorbant à 230nm

Les échantillons d'ADN ont une bonne concentration et une pureté adéquate qui permet des applications en biologie moléculaire tel que la PCR et le séquençage.

Tableau 6 : Résultat d'ADN extrait après lecture par le spectrophotomètre

Echantillons	Concentration d'ADN en ng/ul	A 260/280 nm	A 260/230 nm
1	37,04	1,870	1,255
2	30,45	1,915	1,870
4	49,9	1,865	1,490
6	36,05	1,892	1,270
7	24	1,860	1,30
8	20,35	1,902	1,048
9	36,05	1,844	1,314
11	27,2	1,789	1,111
12	22,2	1,982	0,856
13	13,75	1,964	0,965

Comme exemple :

Echantillon 1 : (Figure.28)

- ✓ **Concentration ng/µl: 37.4**
- ✓ **Absorbance A260/A280 nm: 1.87**
- ✓ **Absorbance A260/A230 nm: 1.3**

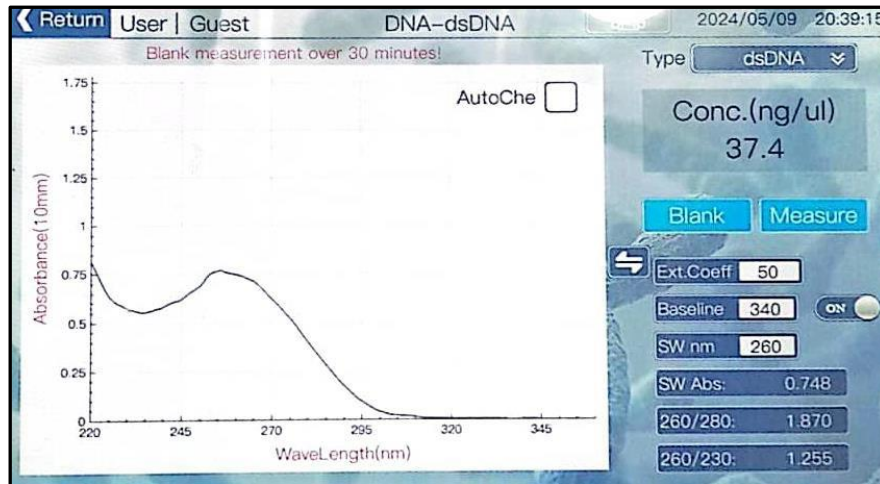


Figure 28: Quantité et pureté d’ADN extrait de échantillons 1 (Wiragen)

Echantillon 4 : (Figure.29)

- ✓ Concentration ng/ul: 49.9
- ✓ Absorbance A260/A280 nm: 1.86
- ✓ Absorbance A260/A230 nm: 1.50

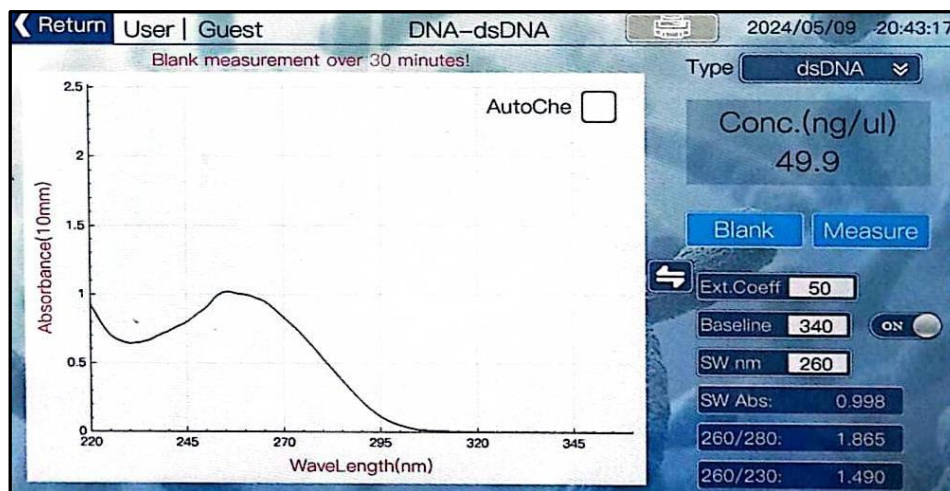


Figure 29: Quantité et pureté d’ADN extrait de l’échantillon 4 (Wiragen)

5. Détection des gènes de virulence de H. pylori par PCR :

5.1.Caractéristiques générales des patients porteurs des gènes de virulence :

La PCR en temps réel a été réalisé à Oran au niveau du laboratoire Wiragen, les résultats ont montré que 70% des biopsies avaient une PCR positive pour un ou plusieurs gènes de

virulence tandis que 30% étaient négatifs à tous les gènes. Leur tranche d'âge varie entre 37 et 66 ans, avec une prédominance féminine de 60% portent les gènes de virulence.

5.2. La détection des gènes de virulence (Vac A m, Vac A s, Cag A) de H. pylori :

Le gène Vac A a été détecté positif dans 70% des cas et 60% avec différentes combinaisons génotypiques.

Certains échantillons négatifs du test d'uréase (10% des cas), se sont révélés positifs par PCR et 20 % des cas s'est avéré négatif à l'examen anatomopathologique mais positif par PCR.

Le test Khi2 montre qu'il existe une différence significative entre les différentes méthodes d'identification de la présence d'H. pylori. (Tableau7)

Tableau 7 : Les différents méthodes d'identification d'H. pylori

Méthodes	Positive (%)	Négative (%)	<i>P value</i>
PCR	70%	30%	0.016
Uréase	60%	40%	
Anapathe	50%	50%	

5.2.1. Génotypage Vac A :

Le gène Vac A régions s et m été présent une forte amplification, avec une prédominance de 70% du gène Vac A m1+ tandis que le gène Vac A s1 était présent dans une seule souche de HP (10%).

La Figure. 30 montre la présence du gène Vac A s1 avec une taille de 286 pb dans un seul puits, le gène Vac A m1 était présent dans plusieurs puits avec une taille de 244 pb (Figure. 30, annexe 2)

5.2.2. Génotypage Cag A :

Le gène Cag A été présent dans les 60% des cas, La Figure. 31 montre la présence du gène Cag A+ dans les 60% des cas, et dans plusieurs puits avec une taille de 252 pb (Figure. 31, annexe 2)

Le gène *vag A m1* est retrouvé en association soit avec le gène Cag A+ soit avec le gène *s1* (Figure. 30,31)

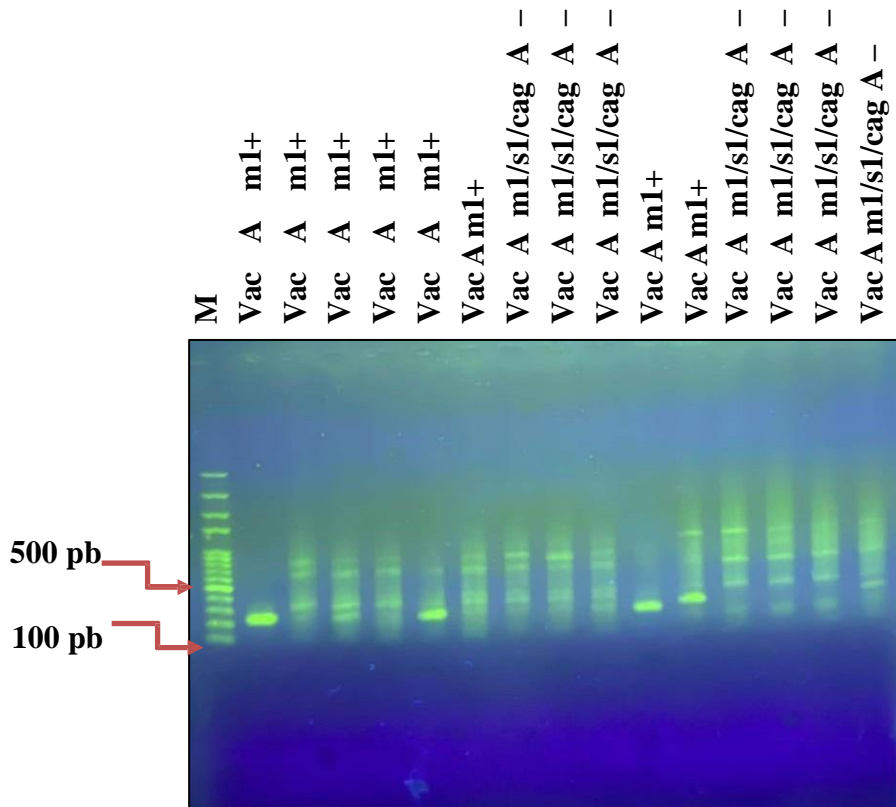


Figure 30: Electrophorèse de migration sur gel d’agarose à 1% des gènes de virulence de l’H. pylori Vac A m1, s1 et Cag A (Wiragen)

M : Marqueur de taille

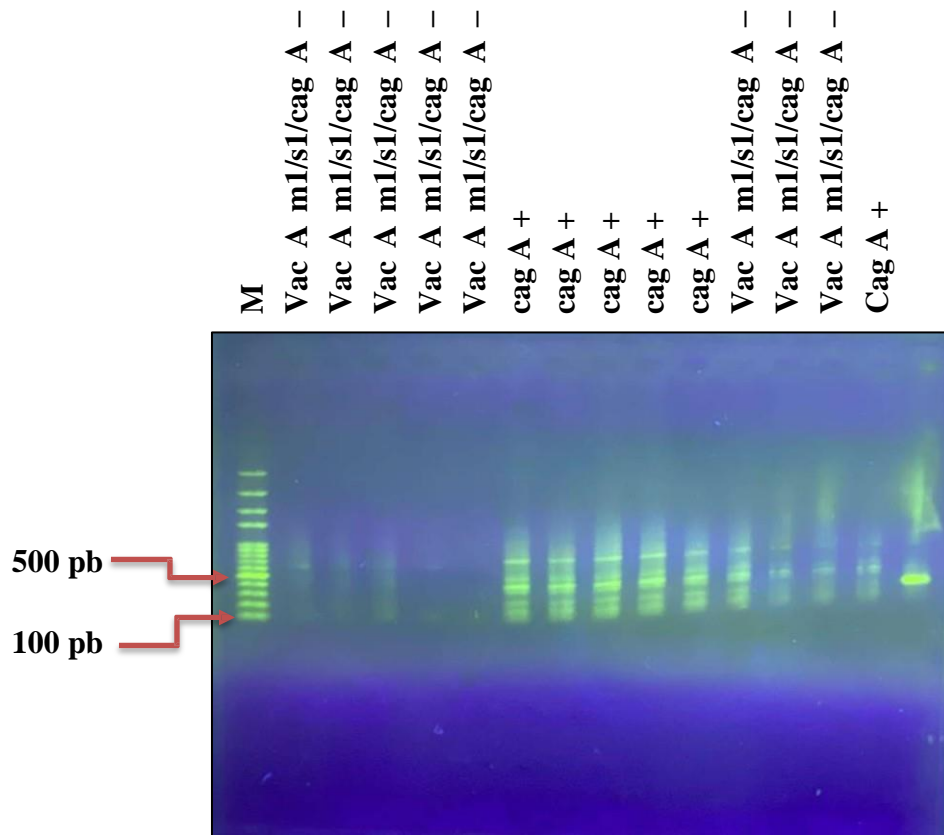


Figure 31: Electrophorèse de migration sur gel d'agarose à 1% de résultats des gènes de virulence de l'H. pylori Vac A m1, s1 et Cag A (Wiragen)

M : Marqueur de taille

Le tableau résume les paramètres anthropométriques, cliniques en fonction des génotypes (Vac A m1, Vac A s1 et Cag A+) de notre population d'étude (Tableau 8)

Concernant le sexe, il existe une différence significative ($p=0.04$) du sexe en fonction des génotypes avec une prédominance féminine, 50% des femmes avaient les 2 gènes de virulence Vac A m1/Cag A+. Tandis que ce génotype est retrouvé que chez 10% des hommes. (Tableau 8).

Le test khi 2 montre que l'âge est significativement différent selon les génotypes, dont 50% des patients âgés de plus de 35 ans avaient le gène Vac A m1/Cag A + et 10% des cas présentent soit Vac A m1/s1 soit sont négative pour tous les gènes de virulence. Le gène Vac A m1/ Cag A+ était présent aussi chez les patients qui avaient un âge de 35 ans ou moins (≤ 35), sinon les autres patients étaient négatifs pour les gènes de virulence (Tableau 8).

Tous les patients atteints de gastrite chronique de notre population d'étude étaient positifs pour tous les gènes de virulence, dont 30% des cas avaient le gène Vac A m1/Cag A+ et 10% des cas avaient Vac A m1/Vac A s1+. Tandis que les patients avec une gastrite, 20% des cas avaient le génotype Vac A m1 /Cag A+ et 20% des cas n'avaient pas les gènes de virulence. Pour l'ulcère 10% des cas soit présente le génotype Vac A m1 /Cag A+ ($p=0.00$) (Tableau 8)

Tableau 8 : Les paramètres anthropométrique, cliniques en fonction des génotypes identifiés par PCR dans notre étude.

Paramètres	VacA m1/s1	VacA m1/Cag A+	VacA -/CagA-	P value
Sexe (%)				
F	10%	50%	20%	0.04
H	0%	10%	10%	
Age				
≤35	0%	10%	20%	0.00
>35	10%	50%	10%	
Pathologies				
Gastrite chronique	10%	30%	0%	0.00
Gastrite	0%	20%	20%	
Ulçère bulbaire	0%	10%	10%	

Nous avons réalisé une étude analytique de régression multiple, nous avons intégré toutes les combinaisons génotypiques Vac A m1/s1, Vac A m1 /et Cag A) qui sont retrouvées dans notre population d'étude en fonction des différentes pathologies. Le modèle de régression à retenue Vac A m1/Cag A+ avec une $p = 0.003$, $R^2 = 31\%$, R^2 (ajusté) = 23% et une équation de régression :

$$\text{Les pathologies} = 0,667 + \text{Cag A+}_0 - 0,400 \text{Cag A+}_0 + 0,0 \text{Vac A m1}_0 + 0,333 \text{Vac A m1}_0 + 0,0 \text{Vac A m1/Cag A+}_0 + 1,400 \text{Vac A m1 / Cag A+}$$

Tableau 9 : Régression multiple des différents génotypes en fonction des pathologies identifiées dans notre population d'étude

Les génotypes	Coef	Coef Ert	<i>P value</i>
Constante	0,667	0,223	0.006
Cag A+	-0,400	0,422	0.46
Vac A m1+	0,333	0,445	0.461
Vac A m1/Cag A+	1.400	0.422	0.003

Nous avons réalisé 3 plans d'ACP et un dendrogramme (Figure. 32), le plan ACP 1-2 avec une inertie de 74% montre une forte liaison du génotypes Vac A m1 /Cag A+ avec la gastrite chronique, tandis que le génotype Vac A + s1 s'oppose fortement avec la gastrite chronique (Figure. 32)

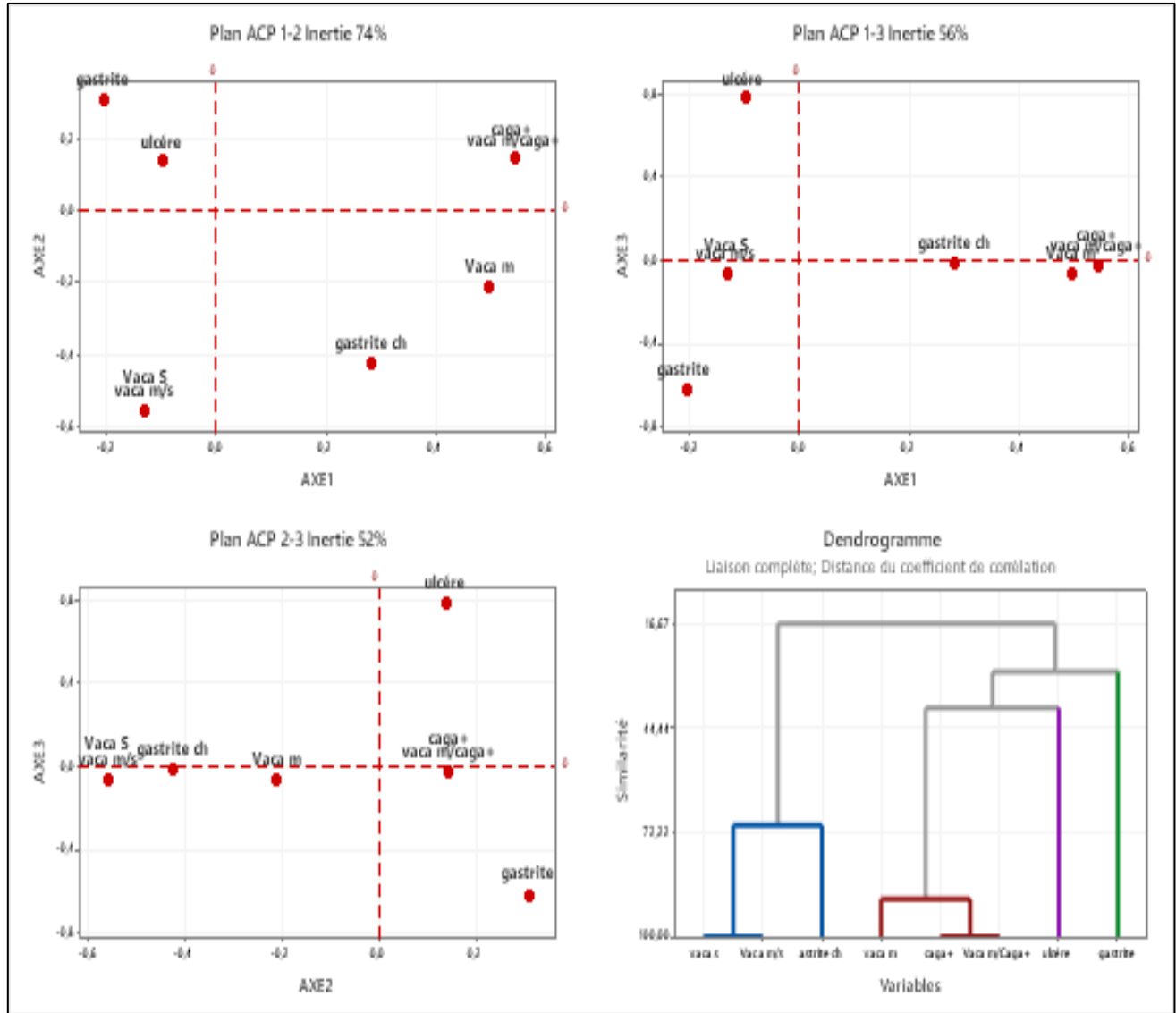


Figure 32: Représentation d'un Plan ACP et dendrogramme des différents génotypes Vac A m1, s1 et Cag A et différentes pathologies Gastro-duodénales

Discussion

L'épidémiologie de l'infection à *H. pylori* diffère considérablement d'une région à une autre dans le monde (RAAF N.,2018), elle est la 2^e infection bactérienne chronique la plus répandue au monde, sa prévalence est de 45 à 50 % de la population mondiale. Cependant, elle est élevée dans les pays en voie de développement et plus faible dans les pays industrialisés (GUILLEMOT G., 2015). Certaines recherches ont trouvé que l'infection à *H. pylori* a eu tendance à diminuer ces dernières années dans beaucoup de pays.

Ainsi dans cette étude, nous avons procédé en premier lieu à déterminer les caractérisations moléculaires de la pathogénicité de *Helicobacter pylori* à partir de biopsies gastriques, qui a été réalisé au niveau de la wilaya de Tlemcen.

La distribution des patients atteint de HP+ selon les deux sexes présentent une prédominance féminine soit 58% et un sexe ratio H/F de 0.72, ce qui rejoint les résultats trouvés dans une étude marocaine de 2010 à 2016 qui ont constaté que sur 938 individus ayant HP+, 59 % étaient des femmes. (M. Sokpon *et al.*, 2016)

La prévalence globale de l'infection a HP selon notre étude été de 61%, ce qui est en accord avec des études faites récemment en Asie de l'Ouest et en Amérique du Sud avec 60 % à 70 % de la population infecté (L Erdman *et al.*, 2019). En États-Unis 2023, la prévalence est de 50%, l'infection est plus fréquente dans la population noire plus précisément en Afrique suite à un environnement propice à la contamination et le manque d'hygiène (H.A.H. Joutei., 2007).

Contrairement en Europe, comme dans le cas de la France avec une prévalence globale comprise entre 15 et 30 %. (Eurofins, infectiologie *Helicobacter pylori* ;2023 et L Erdman *et al.*, 2019 et Nimish V, MD.,2023)

L'âge moyen des patients était de 45 ans (Ecart type 15,77) avec un minimum de 18 ans et un maximum de 80 ans. La tranche d'âge la plus représenté était celle de 37 jusqu'à 51 ans, ce qui rejoint les résultats trouvés dans une étude faite en Afrique plus précisément en Côte-D'Ivoire réalisé en 2020 qui ont constaté que sur 169 individus, la tranche d'âge la plus présenté était celles des 51 ans avec un âge moyen de 43.5 ans. (Diplo B., 2020)

Nos résultats ont révélé que 62% des patients vivaient dans des habitations collectives, en ce qui concerne les antécédents familiaux de pathologies gastro-duodénale, ce qui est assez

similaire aux résultats d'une étude menée en Côte-d'Ivoire, où environ 79,9% des patients vivaient en promiscuité c'est-à-dire avec plus de deux personnes par habitat. 58.6% avaient des antécédents familiaux et des syndromes ulcéreux. (Diplo B ;2020)

Par ailleurs, une étude socio-économique réalisée à Bénin, montre que 80.6% des patients vivaient en couple et 36% vivaient dans une habitation de plus de dix personnes. De plus, 17.2 % rapportaient un antécédent familial au premier degré d'ulcère (Aboudou Raimi K *et al.*, 2021)

D'autres études ont montré que la prévalence de la gastrite chronique à *H. pylori* varie de 72 à 91,3% en Afrique et de 64 à 100% en Europe et en Amérique du Nord. Selon des résultats nationaux, la prévalence de la gastrite chronique à *H. pylori* a été de 89.25%. (N. ATTAFF., 2004)

Concernant l'ulcère gastrique qui est responsable d'un taux de mortalité de 2,5%, Il est à noter que cette population atteinte de gastrites et d'ulcères constituerait un terrain à risque pour la survenue d'un cancer. (H.A.H. Joutei., 1998-2007).

En Chine, une étude a révélé que la prévalence de l'infection augmente avec l'âge avec un taux le plus élevé de 57,58 % dans le groupe d'âge de ≥ 60 ans et diminue dans la tranche d'âge de 40 à 60 ans (Danni L *et al.*, 2023), ce qui est en accord avec notre étude dont les patients de plus de 60 ans augmente le risque de l'infection et de plus la sévérité de la pathologie.

Notre étude a montré un taux d'infection de 55% selon le test à l'uréase et une spécificité de 70%, ce qui correspond les résultats réalisés sur 137 patients en Amérique du sud, 67,5% était positif à l'uréase et possède une spécificité de 88,1%. (H montes *et al.*, 2003)

La PCR est une technique permettant d'obtenir rapidement de multiples copies d'un fragment d'ADN bactérien cible à partir de biopsies gastriques (HELUWAERT F., 2022)

Elle est plus précise et plus fiable avec une spécificité de 100% (Singh V *et al.*, 2008) pour le diagnostic de l'infection à *H. pylori* (Mehasni S., 2019). Elle est conçue pour cibler des séquences bien spécifiques du génome de *Helicobacter pylori*. Contrairement aux test anatomopathologie et l'uréase se sont révélés négatifs sur certaines populations de notre étude.

Dans une étude tunisienne portant sur 101 patients, la rentabilité diagnostique de l'examen anatomopathologique des biopsies gastrique pour la détection de *H. pylori* a été de 79% en comparaison avec l'étude génétique PCR., en revanche dans notre étude portant sur 10 patients la concordance entre la PCR et l'examen anatomopathologique a été de (80%) (L. Chtourou.,2021)

L'identification moléculaire de *H. pylori* et la détection des gènes *vacA* et *cagA* ont été réalisées à l'aide d'amorces spécifiques (M Bachir *et al.*, 2018), dont le polymorphisme est à la base d'un déterminisme pathologique plus ou moins sévère, et considérée comme un candidat potentiel responsable de la virulence de *H. pylori* ainsi que de la cause de l'inflammation et de la formation d'ulcères dans l'estomac et le duodénum (Keiji O *et al.*, 2000)

Nos résultats ont révélé que 60% des souches de HP présentent le gène de virulence Cag A, 10% Vac A s1, tandis que 70% des souches possèdent le gène Vac A m1 et 60% ont des combinaisons génotypiques différentes Vac A m1/m2/Cag A et Vac A m1/s1.

Nos résultats étaient proches de ceux d'une étude régionale, les gènes *vacA* et *cagA* ont été identifiés respectivement dans 61,6 % et 53 % des souches de *H. pylori*. Sur les 60 souches de *H. pylori*, 66 % possédaient au moins un gène de virulence et 34 % ne présentaient aucun gène de virulence. (Kishk R., 2020)

Notre étude était presque similaire avec les pays du moyen orient plus précisément à Iran en 2020 dont 27,88% des souches avaient le génotype Vac A s1/m1 et il a été démontré que les génotypes *vacA* tels que m1, s1 étaient les allèles *vacA* les plus répandus parmi les patients iraniens atteints d'ulcère gastroduodéal. (Massoud K *et al.*, 2020). La présence du gène *cagA* variait de 50 % à 99 % dans la région. Le taux de souches *cagA* positives était inférieur aux données européennes et nord-américaines (74 % à 88 %). (H Sedaghat *et al.*, 2014)

En 2020, parmi les 74 patients positifs pour *H. pylori*, 94,5 % étaient positifs pour le gène *cagA* et 91,8 % pour le gène *vacA*. (H Masoumi Asl., 2020)

En Asie de l'Est, le taux était plus élevé avec un pourcentage de 85,3 % étaient positifs pour *cagA* (163/191). Les génotypes *Vac A m1* étaient parmi les génotypes les plus répandus qui hébergeant le gène *Cag A* (Massoud Keikha *et al.*, 2020). Les souches *cagA (+)* étaient plus fréquentes chez les patients atteints d'ulcère gastroduodéal. (Zhonghua Nei Ke Za Zhi., 2000)

Au Maroc, 59,6 % des cas étaient positifs pour *cagA* et l'allèle unique *vacA (s ou m)* était le profil le plus prédominant (31,27 %). (S Alaoui Boukhris *et al.*, 2013)

Selon le test khi 2 nos résultats ont révélé que l'âge est significativement différent selon les génotypes, dont 50% des patients âgés de plus de 35 ans avaient le gène *Vac A m1/Cag A +* et 10% des cas présentent soit *Vac A m1/s1* soit sont négative pour tous les gènes de virulence.

Tous les patients atteints de gastrite chronique de notre population d'étude étaient positifs pour tous les gènes de virulence, dont 30% des cas avaient le gène *Vac A m1/Cag A+* et 10% des cas avaient *Vac A m1/Vac A s1*.

La Régression et l'ACP montrent que le génotype *Vac A m+/Cag A+* est corrélé à la pathologie gastrite chronique avec une P significative de 0.003, $R^2=31\%$, R^2 (ajusté)=23%.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'infection à *Helicobacter pylori* constitue un problème majeur de santé public, sa prévalence varie selon le lieu géographique, le statut socioéconomique et l'âge. Cette étude a été réalisée au niveau de la wilaya de Tlemcen, l'objectif de ce travail avait pour but de déterminer la diversité génétique en particulier les gènes de virulence par PCR et tester l'association entre ces gènes avec les différents types de pathologies gastriques (gastrite chronique et l'ulcère).

Helicobacter pylori a été détecté à partir des biopsies gastriques au niveau antral, fundique et angulaire chez des patients présentant des pathologies gastro-duodénales plus ou moins sévère. La présence de cette bactérie est retrouvée dans 66% de gastrites chroniques, 83% duodénite subaigüe, 60% ulcères bulbaire et 80% bulbite.

Quant à la recherche moléculaire, la PCR multiplex est une méthode plus fiable (avec une spécificité de 100%) en comparaison avec le test à l'uréase et le test anatomo-pathologie, et cela va servir d'un bon diagnostic de l'infection à *H. pylori*.

Cela nous a permis d'identifier 21 souches de *Helicobacter pylori*, les souches que nous avons pu isoler révèlent des particularités biochimiques avec présence élevés de 100% pour la catalase et oxydase et 36% de nitrate réductase, isoler de patients qui présentent essentiellement des gastriques chroniques et des ulcères gastriques et bulbite.

Les géotypes Vac A et Cag A ont été identifiés à partir des biopsies gastriques et les profils génotypiques Vac A s1+/m1 et Cag A + étaient impliqué dans la chronicité de l'infection plus élevés dans les gastrites chroniques et les ulcères gastriques, dont 60% était Vac A m1/Cag A + et 10% Vac A m1/s1+.

L'éradication de *H. pylori* nécessite une approche multifacette combinant des nouvelles stratégies de traitement et des préventions basé sur les gènes de virulence qui existe dans notre population, et la recherche de nouvelles cible thérapeutiques comme la vaccination et une thérapie antimicrobienne aux gènes Cag A et Vac A. La recherche moléculaire va conduire à des avancées significatives dans le diagnostic grâce à la PCR, le traitement et la prévention des maladies associés.

Annexes

Annexe 1 : Fiche d'enquête

Etude sur l'Helicobacter pylori

Prélèvement N° :

Date de prélèvement :

Nom du malade :

Prénom du malade :

Age :

Sexe :

Féminin

Masculin

Tél/ Adresse :

HABITAT

Nombre de pièces :

1-2 pièces

3-4 pièces

plus de 4 pièces

Nombre de personnes habitant dans le domicile :

< 5 personnes

de 5 – 10 personnes

> 10 personnes

Nombre de sanitaire dans le domicile :

1 sanitaire

plusieurs

ANTECEDANT FAMILIAUX

Oui

Non

ANTECEDANT MEDICAUX

Consommation d'antibiotiques (Macrolides) dans les 15 jours :

Oui

Non

SI OUI ; préciser la nature :

Le traitement a-t'il été efficace ?

Oui

Non

Avez-vous déjà été diagnostiqué (e) ?

Oui

Non

Avez-vous déjà fait une fibroscopie gastro-duodéal ?

Oui

Non

Membre de familles se plaignant du syndrome ulcéreux ou épigastriques

Oui

Non

PATHOLOGIE LIE A H. PYLORI

- Ulcère gastrique ou Bulbaire
- Adénocarcinome gastrique
- Lymphome du MALT
- Tabagisme
- Alcoolisme
- Bulbite subaiguë

TABLEAU CLINIQUE

Aspect endoscopique :

Avez-vous déjà subi une biopsie pour confirmer la présence d'H. pylori ?

Oui

Non

Avez-vous déjà fait une sérologie ?

Oui

Non

TEST A L'UREASE

Antre :

Positive

Négative

Fundus :

Positive

Négative

RESULTAT DE LA PCR

Gène de virulence :

Vac A m1, s1

Cag A

Annexe 2 : Electrophorèse de migration sur gel d'agarose à 1% de résultats de l'amplification d'ADN codé par puits

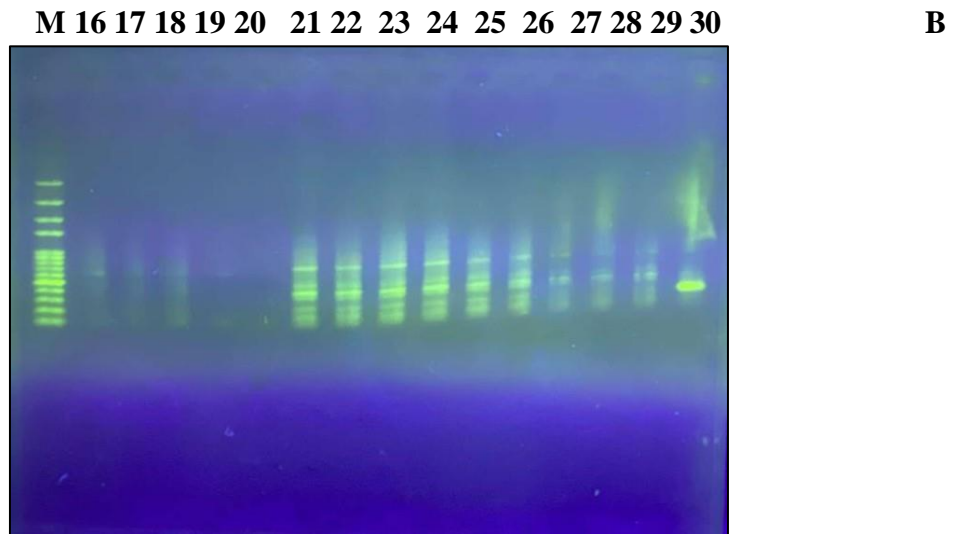
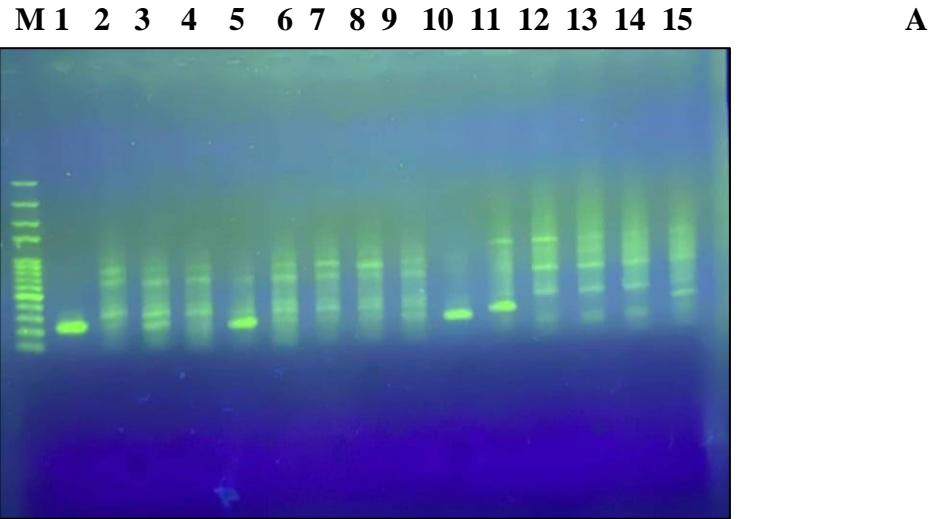
A. Génotypage vac a :

Le gène vac a régions s et m été présent une forte amplification par PCR dans le puit 1,5,10,11 avec une prédominance de 70% du gène vac a m1+ tandis que le gène vac a s1 était présent dans une seule souche de HP (10%) et une faible amplification des gènes dans les puits 2,3,4,6

- Puits 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 10 : présence du gène vac a m1 avec des tailles de 244 pb
- Puits 11 : Présence du gène vac a s1 avec une taille de 286 pb.
- Puits 15 et 20 ont été négatifs

B. Génotypage Cag A :

Le gène Cag A été présent dans les 60% des cas, dont le puit 30 été positive avec une taille de 252 pb, et les Puits de 16 jusqu'à 29 été Cag A négatif.



Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- **Aboudou Raïmi Kpossou, Homagnissin Benoît Kouwakanou, Carin Ahouada, Rodolph Koffi Vignon, Comlan N'déhougbèa Martin Sokpon, Vincent Zoundjiekpon, Nicolas Kodjoh, et Jean Séhonou.** Infection par *Helicobacter pylori* : prévalence et facteurs associés dans une population générale d'après une recherche par test respiratoire à l'urée marquée au carbone 14. " *The Pan African Medical Journal*, 40(1), 2021
- **Alicja Forma, Amr Maani, Elżbieta Radzikowska, Elżbieta Sitarz, Izabela Korona-Głowniak, Jacek Baj, Mansur Rahnama-Hezavah, Piero Portincasa.** Mechanisms of the Epithelial–Mesenchymal Transition and Tumor Microenvironment in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. *Cells*, 9(4), April 2020
- **Adjéka Stanislas, Doffou, Kouamé Guillaume Dimitri, Bangoura Aboubacar Demba.** "Prevalence of gastroduodenal ulcers and precancerous gastric lesions in chronic gastritis with *Helicobacter pylori* according to the Sydney system: about 52 cases," *Health Sci. Dis*, Vol 21 (3), March 2020.
- **Aurélien Amiot, Mehdi Belhassan, Chantal Andre, Jean-Charles Delchier, Jean-Pierre Farcet, Charlotte Gagniere, Anne Hulin, Sophie Hüe, Yann Le Baleur.** Therapeutic drug monitoring is predictive of loss of response after de-escalation of infliximab therapy in patients with inflammatory bowel disease in clinical remission. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. Volume 40, February 2016
- **Aziz, Ramy K., Khalifa, Mohammed M., Sharaf, Radwa R.** "Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: a review," *Journal of Advanced Research*, Volume 6, July 2015
- **Kendouli Fatima, Aichouche Khaoula, Abdelali Houda,**. Étude des bactéries de l'espèce *Helicobacter pylori*. Université de Constantine. Juin 2014
- **Baj, J., Korona-Głowniak, I., Forma, A., Maani, A., Sitarz, E., Rahnama-Hezavah, M., Radzikowska, E., & Portincasa, P:** Mechanisms of the Epithelial–Mesenchymal Transition and Tumor Microenvironment in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. *Cells*. April 2020.
- **Bigard, M. A., & Colin, R.** Consensus conference: " Ulcer and gastritis at the time of *Helicobacter pylori*". Why and how?. *Gastroenterologie clinique et biologique*, 20 (1), 1996.

Références Bibliographiques

- **Bessède, Emilie.** "Gastric carcinogenesis linked to H.pylori," Université de Bordeaux, 2012.
- **Bessède et coll.** Helicobacter pylori generates cells with cancer stem cell properties via epithelial–mesenchymal transition-like changes. *Oncogene*, édition en ligne du 7 octobre 2013
- **Blaser, Martin J., Berg, Douglas E.** "Helicobacter pylori genetic diversity and risk of human disease," April 1, 2001.
- **Boukhirs, Samia Alaoui.** "Helicobacter pylori Genotypes Associated with Gastric Histopathological Damages in a Moroccan Population," *PLoS One*, 2013.
- **Bridge, Dacie R., Merrell, D. Scott.** "Polymorphism in Helicobacter pylori CagA and VacA toxins and diseases," 4(2), March 1, 2013
- **Chen, Yu-Li, Mo, Xiao-Qiang.** "Genetic polymorphisms of pathogenic Helicobacter pylori in patients with different types of gastrointestinal diseases," 22(44), November 28, 2016
- **Dawn A. Israel, Nina Salama, Carrie N. Arnold, Steven F. Moss, Takafumi Ando, Hans-Peter Wirth, Kyi T. Tham, Margorita Camorlinga, Martin J. Blaser,** Stanley Falkow, and Richard M. Peek Jr. Helicobacter pylori strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest.* 2001 Mar 1
- **De Korwin, J.-D., Lehours, P.** "Helicobacter pylori: fundamental notions, epidemiology, diagnostic methods," *Encycl Med Chir*, 2010.
- **Erdman, Laura, Nicola Jones, Susan Kuhn.** "Infection par Helicobacter pylori, 2019
- **Gerhard, Markus, Norbert Lehn, Nina Neumayer, Thomas Borén, Roland Rad, Wolfgang Schepp, Stephan Miehke, Meinhard Classen, and Christian Prinz.** Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin. October 26, 1999
- **Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., McConnell, W., Harper, W.E.** Transfer of Campylobacter pylori and Campylobacter mustelae to Helicobacter gen., nov. as Helicobacter pylori. comb. 1989
- **Guillemot, Glenn.** "Étude Hélixirun, épidémiologie de l'infection à Hélicobacter pylori et de la résistance à la clarithromycine à la Réunion en 2014 : étude chez 200 patients adultes ayant une indication d'endoscopie digestive supérieure au CHU de Saint Pierre," Thèse de doctorat, 2015.

Références Bibliographiques

- **Heluwaert, Frédéric.** "Helicobacter pylori : diagnostique et modalités d'éradication," Conférence, 2022.
- **Hélène Scornec.** Identification des gènes impliqués lors de l'établissement de *Lactobacillus casei* dans l'intestin et caractérisation de l'opéron. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne. 2020
- **Wan Ying Lai, Hooi, James KY, Pet Khoon, Suen, Michael MON, Underwood, Richard E., Tanyingoh, Divine, Malfertheiner,** "Global prevalence of Helicobacter pylori infection: systematic review and meta-analysis," *Gastroenterology*, Volume 153, Issue 2, August 2017.
- **HWANG, I. R., KODAMA, T., KIKUCHI, S.,** Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1 beta production in Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology*, 2002, 123: 1793-1803.
- **Joutei, H.A.H.** "Helicobacter pylori infection in 755 patients with digestive complaints : Pasteur Institute, Morocco, 1998–2007."
- **Kishk, R. M., Soliman, N. M., Anani, M. M., Nemr, N., Salem, A., Attia, F., Allithy, A. N. A., & Fouad, M.** Genotyping of Helicobacter pylori virulence genes cagA and vacA: A regional and national study. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2021, 5540560.
- **Kamiri.** "Stratégies thérapeutiques dans la récurrence de la maladie ulcéreuse à Helicobacter pylori," Thèse pour obtenir le grade de docteur en pharmacie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, 2007.
- **Keikha, M., Ali-Hassanzadeh, M., & Karbalaie, M.** Association of *Helicobacter pylori* vacA genotypes and peptic ulcer in Iranian population: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterology*, August 2020.
- **Lamarque, D.** "Révision des recommandations françaises sur la prise en charge de l'infection par Helicobacter pylori," 2012.
- **L. Chtourou, M. Moalla, M. Mallouli, B. Mnif, S. Charfi, A. Hammami, T. Boudawara, T. Nabil.** Évaluation de l'examen anatomopathologique dans le diagnostic de l'infection à Helicobacter pylori. Service d'Hépatogastroentérologie, hôpital Hedi Chaker, Sfax, Tunisie., 2021
- **Liu, D., Pan, J., Chen, Z., Li, S., Ma, J., Xiao, Y., Wang, D., Mu, G., Lin, Y., Li, J., Chen, Z., & Huang, X.** A survey on the current status of Helicobacter pylori infection in households in Hainan Province, China. *BMC Gastroenterology*, 2023.

Références Bibliographiques

- **Marshall, B., Warren, J.R.** Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration., 1984. *The Lancet* 323, 1311–1315.
- **Mégraud, F.** "When and how does *Helicobacter pylori* infection occur?" *Gastroenterology Clinical and Biological*, 27(3), March 1, 2003
- **Mehasni, Samiha.** "Identification des souches de *Helicobacter pylori* par l'utilisation des marqueurs génétiques," Thèse de doctorat, Université des Frères Mentouri Constantine, 2019.
- **Pascale Mustapha.** "Etude des interactions entre *Helicobacter pylori* et cellules épithéliales gastriques," Thèse de doctorat, Université de Poitiers, 2011.
- **M. Sokpon, M. Salihoun, L. Lahlou, M. Acharki, R. Razine, N. Kabbaj.** Facteurs prédictifs d'une infection à *Helicobacter pylori* dans la gastrite chronique : à propos d'une étude marocaine. *Journal Africain d'Hépatogastroentérologie*, 14 septembre 2016.
- **Nomura UN, A., Stemmermann, G. N., Chyou, P. H., Kato, I., Pérez-Pérez, G. I., & Blaser, M. J.** *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii 1991. *New England Journal of Medicine*, 325(16), 1132-1136.
- **Nishikawa, Hiroko, Hatakeyama, Masanori.** "Sequence polymorphism and intrinsic structural disorder related to the pathobiological performance of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein," April 13, 2017.
- **Ontsira, Esther Nina.** "Résistance de *Helicobacter pylori* aux antibiotiques et d'autres substances antimicrobiennes. Aspects moléculaires des mécanismes de détections," Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, 2017.
- **Raaf, Naïma.** "Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* et typage moléculaire des souches isolées à Alger (Algérie)," 16 mai 2018.
- **Rili, I., Oulaldj, L., & Bettache, A.** Caractérisation moléculaire d'un isolat fongique par traitement bio-informatique. 2021
- **Sahi, M.** "*Helicobacter pylori* : son implication dans la genèse de la pathologie ulcéreuse gastroduodénale et du cancer gastrique," Thèse en ligne, Université Aboubekr Belkaid-Tlemcen, 1998.
- **Stacy S. Duncan, Pieter L. Valk, Carrie L. Shaffer, Seth R. Bordenstein, and Timothy L. Cover:** J-Western Forms of *Helicobacter pylori* cagA Constitute a Distinct Phylogenetic Group with a Widespread Geographic Distribution. *J Bacteriol.* March 2012.

Références Bibliographiques

- **Salaün Laurence.** (2001). *Etude de la structure génétique de l'espèce Helicobacter pylori par l'analyse comparative de plusieurs marqueurs moléculaires.* Lyon (FRA) ; Montpellier : Université Claude Bernard
- **Singh, V., Mishra, S., Rao, G.R., Jain, A.K., Dixit, V.K., Gulati, A.K., Mahajan, D., McClelland, M., Nath, G.** "Evaluation of nested PCR in the detection of Helicobacter pylori targeting a highly conserved gene: HSP60," *Helicobacter*, 13(1), February 2008
- **Sobhani, Iradj.** "Helicobacter pylori and gastric cancer," *Hepato-Gastro-Enterology Service*, Volume 20, April 2004.
- **Tan S., Tompkins LS., Amieva MR.,** *Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche., 2009. *Plos Pathogens*
- **Vakil, Nimish.** "Infection par helicobacter pylori," University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, 2023.
- **Varon, Christine, Mégraud, Francis.** "Helicobacter pylori infection and gastric cancer," *Francophone Review of Laboratories*, Volume 2013, Issue 456, November 2013.
- **Zacharie, Sabri.** "Helicobacter pylori : étude rétrospective sur l'efficacité de pylera," Thèse de doctorat, Université de Limoges, 2014.

Références Bibliographiques
