



HAL
open science

Etude de mise en place d'une méthode de détection d'*Helicobacter pylori* par PCR en temps réel

Mathieu Noël

► **To cite this version:**

Mathieu Noël. Etude de mise en place d'une méthode de détection d'*Helicobacter pylori* par PCR en temps réel. Microbiologie et Parasitologie. 2022. hal-04586714

HAL Id: hal-04586714

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-04586714>

Submitted on 24 May 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

Mémoire diffusé sur recommandation des responsables du Master

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Faculté des Sciences et Technologies de Nancy

Master Microbiologie

Microbiologie Environnementale et Sanitaire

Etude de mise en place d'une méthode de détection d'*Helicobacter pylori* par PCR en temps réel

Rapport réalisé par Mathieu NOEL

Stage de 5 mois effectué du 11 avril au 12 septembre 2022 à

Laboratoire PAX EspaceBio – Ouilab de Saint-Avold

Sous l'encadrement du Dr Sarah MORVAN – SCHILLINGER, responsable des
laboratoires EspaceBio Moselle-Est, Pharmacienne Biologiste

Table des matières

Table des matières	1
Table des figures	4
Table des tableaux.....	5
Remerciements	6
Abréviations	7
Introduction.....	8
I <i>Helicobacter pylori</i>	8
I.1 Histoire d' <i>Helicobacter pylori</i>	8
I.2 Prévalence.....	8
I.3 Milieu de vie et adaptation à la muqueuse gastrique	9
I.4 Forme viable mais non cultivable : les coccoïdes	10
I.5 Voies de transmission et de propagation	10
II Importance actuelle d' <i>Helicobacter pylori</i> dans le domaine de la santé.....	12
II.1 Traitements thérapeutiques	12
II.2 Méthodes de détection actuelles	13
II.3 L'antibiorésistance chez <i>Helicobacter pylori</i>	15
III Contexte de l'étude.....	16
III.1 Présentation de la structure de stage.....	16
III.2 Principe de la PCR en temps réel	16
III.3 Objectifs du sujet de stage.....	17
Matériels et méthodes.....	18
I Souches de référence.....	18
II Mise en culture.....	18
III Biopsies gastriques.....	19
IV Design des amorces et des sondes.....	20

IV.1	Détection d' <i>Helicobacter pylori</i> et de sa résistance à la clarithromycine	20
IV.2	Détection de la résistance à la lévofloxacine.....	21
V	Extraction	22
VI	Amplification	23
Résultats.....		24
I	Etape d'extraction de l'ADN bactérien.....	24
II	Essais d'amplification de l'ADN bactérien par PCR en temps réel.....	24
II.1	Essais du kit RIDAGENE <i>Helicobacter pylori</i>	24
II.2	Essai du design des amorces et des sondes de Thermofisher.....	31
III	Détection de la résistance à la lévofloxacine.....	33
IV	Détection d' <i>Helicobacter pylori</i> à partir d'échantillons de selles	33
Discussion.....		35
Références bibliographiques.....		39
Références sitographiques.....		45
Annexes.....		46
Annexe 1 : Composition du milieu Columbia utilisé pour la mise en culture d' <i>Helicobacter pylori</i> avant repiquage sur milieu Pylori de BioMérieux.		46
Annexe 2 : Souches d' <i>Helicobacter pylori</i> en culture sur un milieu spécifique Pylori de BioMérieux.		47
Annexe 3 : Design d'amorces et de sondes conçues par Tib-Molbiol, basé sur une coloration SYBR-GREEN I dans le cadre de la détection d' <i>H. pylori</i> et des mutations conférant des résistances à la lévofloxacine.....		48
Annexe 4 : Protocole d'extraction du kit QIAamp DNA Mini kit de Qiagen.		49
Annexe 5 : Protocole d'amplification du TaqPath™ BactoPure™ Microbial Detection Master Mix.		50
Annexe 6 : Valeurs de cycle de seuil (Cq) pour chacune des 5 souches et leurs 3 répétitions de l'essai n°1.....		51

Annexe 7 : Représentation graphique de l'amplification du contrôle interne d'ADN (ICD) de l'essai n°4 des dilutions par PCR en temps réel.	52
Annexe 8 : Valeurs de cycle de seuil (Cq) pour chacune des 5 souches et leurs 3 répétitions de l'essai n°5 des biopsies gastriques négatives.	53
Résumé.....	55
Abstract.....	56

Table des figures

Figure 1 : Schéma de traitement thérapeutique ayant pour objectif l'éradication d' <i>Helicobacter pylori</i> (HAS).	12
Figure 2 : Séquence partielle du gène <i>gyrA</i> . Les codons 87 et 91 associés aux acides aminés concernés par les mutations sont encadrés en rouge.	21
Figure 3 : Représentation graphique de l'amplification d' <i>H.pylori</i> et de sa résistance à la clarithromycine (ClariR) de l'essai n°1 par PCR en temps réel.....	25
Figure 4 : Représentation graphique de l'amplification du contrôle interne d'ADN (ICD) de l'essai n°1 par PCR en temps réel.....	26
Figure 5 : Représentation graphique de l'amplification d' <i>H.pylori</i> et de sa résistance à la clarithromycine (ClariR) de l'essai n°2 par PCR en temps réel.....	26
Figure 6 : Représentation graphique de l'amplification du contrôle interne d'ADN (ICD) de l'essai n°2 par PCR en temps réel.....	27
Figure 7 : Représentation graphique de l'amplification d' <i>H.pylori</i> , de sa résistance à la clarithromycine (ClariR) et du contrôle interne d'ADN (ICD) de l'essai n°3 par PCR en temps réel.....	28
Figure 8 : Représentation graphique de l'amplification du contrôle interne d'ADN (ICD) de l'essai n°4 des dilutions par PCR en temps réel.	30
Figure 9 : Représentation graphique de l'amplification d' <i>H.pylori</i> , de sa résistance à la clarithromycine (ClariR) et du contrôle interne d'ADN (ICD) de l'essai n°5 réalisé à partir des biopsies gastriques négatives, par PCR en temps réel.....	31
Figure 10 : Représentation graphique de l'amplification d' <i>H.pylori</i> , et de ses mutations A2142G et A2143G conférant des résistances à la clarithromycine (ClariR) de l'essai réalisé à partir du design de Thermo Fisher, par PCR en temps réel.	32

Table des tableaux

Tableau 1 : Techniques de diagnostic dans le cadre de la détection d'infection à H. pylori (Lamarque et al. 2012).	14
Tableau 2 : Taux de résistance primaire et secondaire aux antibiotiques d'Helicobacter pylori en France (CNRCH, données de 2020).	15
Tableau 3 : Souches ayant servi de matériel pour les expérimentations de la mise au point de la PCR en temps réel. La Concentration Minimale d'Inhibition (CMI) est définie par antibiogramme.....	18
Tableau 4 : Composition du milieu Pylori de BioMérieux.....	19
Tableau 5 : Design des amorces et des sondes conçues par Thermo Fisher dans le cadre de la détection d'Helicobacter pylori et de ses résistances à la clarithromycine.	20
Tableau 6 : Design des amorces et des sondes conçues par Thermo Fisher dans le cadre de la détection de la résistance à la lévofloxacine d'Helicobacter pylori.....	22
Tableau 7 : Préparation du mélange-maitre du kit RIDAGENE H.pylori + ClariR de R-Biopharm. Issu du protocole relatif au kit d'amplification du fournisseur.....	23
Tableau 8 : Valeurs de cycle de seuil (Cq) pour chacune des 5 souches et leurs 3 répétitions de l'essai n°2.....	27
Tableau 9 : Valeurs de cycle de seuil (Cq) pour chacune des 5 souches et leurs 3 répétitions de l'essai n°3/	29
Tableau 10 : Valeurs de cycle de seuil (Cq) pour chacune des dilutions de l'essai n°4.	30
Tableau 11 : Valeurs de cycle de seuil (Cq) pour chacune des 5 souches et leurs 3 répétitions de l'essai du design conçu par Thermo Fisher.	33

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Madame MORVAN – SCHILLINGER, tutrice de stage, pharmacienne biologiste et responsable des laboratoires EspaceBio de Moselle-Est, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon stage auprès du Laboratoire EspaceBio de Saint-Avold. Je la remercie également pour sa confiance, et pour m'avoir permis de pratiquer ce stage en complète autonomie.

Je pense aussi à Monsieur RAULT, responsable du laboratoire EspaceBio de Metz, pour son expertise et ses conseils avisés.

Je tiens aussi à citer le CNRCH pour l'envoi des souches d'*Helicobacter pylori*, qui m'ont permis de réaliser les expérimentations.

A Nadine, Marion, Pauline et Jessica du service bactériologie, pour leur bonne humeur et le cadre de travail agréable.

Je remercie Nicolas et Lorraine, service Covid, pour m'avoir formé à la pratique de la technique PCR, avec qui il a été agréable de travailler.

A Amélie FINNUCI, ancienne camarade de Master et amie, assistante biologiste, grâce à qui j'ai pu intégrer cette structure de stage. Merci également pour ses avis et sa sollicitude.

Merci à mes parents et à mon frère qui m'ont tout particulièrement soutenu en ce début de stage assez éprouvant.

Abréviations

ARN : Acide Ribo Nucléotide

ARNr 16S : sous unité 16S de l'ARN ribosomique

ARNr 23S : sous unité 23S de l'ARN ribosomique

ClariR : Résistance à la Clarithromycine

ClariS : Sensibilité à la Clarithromycine

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNRCH : Centre National de Recherche Campylobacter et Helicobacter

GEFH : Groupe d'Etudes Français des Helicobacter

HAS : Haute Autorité de Santé

HP : *Helicobacter pylori*

MALT : Mucosa Associated Lymphoid Tissue

PCR : Polymerase in Chain Reaction

RUT : Rapid Urease Test

SAT : Stool Antigen Test

SPF : Santé Publique France

UBT : Urea Breath Test

UFC : Unité Formant Colonie

VBNC : Viable But Not Cultivable

Introduction

I *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori est une bactérie spiralée à gram-négatif, micro-aérophile, possédant entre 3 et 5 flagelles qui lui confèrent une mobilité, potentiellement infectieuse chez l'homme, et présente principalement dans le mucus gastrique de l'estomac. Elle présente des résultats positifs pour l'uréase, l'oxydase et la catalase. Elle peut induire des maladies comme des gastrites chroniques, des ulcères peptiques, le lymphome du MALT et est également un facteur impliqué dans l'apparition de cancers gastriques.

I.1 Histoire d'*Helicobacter pylori*

Cette bactérie a pu être observée pour la première fois en 1982 par Bizzozero (Figura et Bianciardi. 2002). Par la suite, Warren et Marshall ont pu isoler la bactérie de son milieu gastrique, l'ont étudiée et ont mis en évidence son pouvoir infectieux, leur permettant d'être récompensés par un prix Nobel en 1982 (Warren et Marshall. 1983). Ces derniers ont ainsi mis en évidence le lien entre la présence de *H.pylori* et l'apparition d'inflammation de l'estomac par des expérimentations d'auto-inoculation (Morris et Nicholson 1987).

Jusqu'en 1987, la bactérie était considérée comme faisant partie du genre *Campylobacter*, étant nommée auparavant *Campylobacter pylori*. Par la suite, une étude de comparaison des acides gras cellulaires et de la structure avec les bactéries du même genre ont permis de montrer des différences significatives. Des études se centrant sur l'analyse des séquences codant les sous-unités 5S et 16S de l'ARN ribosomique ont permis d'exclure définitivement *pylori* du genre *Campylobacter* (Lau et al. 1987) (Romaniuk et al. 1987) (Thompson et al. 1988). À la suite de l'étude faite par Goodwin, *pylori* est assigné à un nouveau genre *Helicobacter*, en référence à sa structure hélicoïdale caractéristique.

I.2 Prévalence

Il est estimé que la moitié de la population mondiale serait infectée par *Helicobacter pylori* (García et al. 2014). D'après la Haute Autorité de Santé (HAS), 15 à 30 % de la population française serait contaminée par cette bactérie.

L'Europe du Nord et l'Europe de l'Ouest présentent une faible prévalence de contamination par rapport à l'Europe du Sud et l'Europe de l'Est (Robert et al. 2016).

L'infection d'*Helicobacter pylori* de l'organisme humain intervient à tout âge de la vie. (Breckan et al. 2016). Une augmentation de la prévalence est proportionnelle à l'âge d'une personne, cela est notamment plus important à partir de 40 ans. Cependant, il est plus complexe d'identifier les contaminations durant l'enfance puisqu'*Helicobacter pylori* est généralement asymptomatique à cette période de la vie, une analyse visant à la détecter n'est alors pas entreprise.

Il n'y a pas de différence dans la prévalence de contamination en fonction du sexe de l'individu.

I.3 Milieu de vie et adaptation à la muqueuse gastrique

Helicobacter pylori établit son milieu de vie principalement au niveau du fundus, de l'antrum et du pylore de l'estomac humain. Le schéma d'implantation de HP dans la muqueuse gastrique résulte de plusieurs facteurs. La production d'uréase transforme l'urée en ammonium, neutralisant le pH acide de l'estomac ($\text{pH} < 4$). De plus, *H.pylori* se déplace sur la muqueuse gastrique selon une chimio-attraction pour l'urée et le bicarbonate. Les flagelles possèdent une gaine qui leur permettrait de résister au milieu acide de l'estomac (Spohn et Scarlato, 2001). La structure en spirale confère un pouvoir de mobilité à l'instar des flagelles. La bactérie est également munie d'adhésines pour la fixation de la bactérie sur l'épithélium gastrique (Andersen, 2007).

Le milieu caractéristique d'*H.pylori* est la muqueuse gastrique. Cette niche impose à la bactérie une adaptation constante face aux facteurs qui fluctuent tels que le pH, la température, la teneur en oxygène, l'activité métabolique de l'hôte.

Les adaptations à un tel environnement se regroupent en deux catégories : les adaptations à court terme qui se caractérisent par un système de régulation des gènes, et une adaptation à long terme au travers de mutations et de recombinaisons. La régulation des gènes chez *H.pylori* intervient dans l'absorption des ions métalliques tels que le fer ou le nickel, qui sont potentiellement toxiques pour la bactérie, exigeant ainsi un contrôle de cette absorption (Lee et al. 2004). En ce qui concerne l'adaptation à long terme, *pylori* possède des systèmes de réparation des mutations survenant face aux stress du milieu gastrique, notamment le système de réparation des mésappariements MutL et MutH (Alm et Trust. 1999).

I.4 Forme viable mais non cultivable : les coccoïdes

L'adaptation en une forme coccoïde est causée par des facteurs environnementaux, pouvant potentiellement induire un stress pour la bactérie, comme une carence nutritive ou une osmolarité défavorable. Azevedo déclare que le passage à la forme coccoïde entraîne une diminution de l'activité métabolique de la bactérie, dont un arrêt du pouvoir infectieux et de la multiplication (Azevedo et al. 2007).

Une distinction en trois catégories des formes coccoïdes a été faite en fonction d'un état d'avancement de cette transformation : les formes cultivables, les formes viables mais non cultivables et les bactéries mourantes (Saito et al. 2003).

Il est alors tout indiqué que les formes coccoïdes complexifient les procédures de mise en culture et qu'une certaine exigence des conditions du milieu est nécessaire.

I.5 Voies de transmission et de propagation

Il n'existe à ce jour aucune confirmation sur la transmission générale de la bactérie. Bien que certaines voies de transmission soient particulièrement probables, celles-ci restent de l'ordre de l'hypothèse (Burucoa et Axon. 2017).

L'une des méthodes de transmission de *H.pylori* serait la voie féco-orale, particulièrement dans les pays en développement où les taux d'infection de cette bactérie sont les plus importants. Cette possibilité de propagation de la bactérie a été mise en évidence dans un article en étudiant l'association entre *Helicobacter pylori* présent dans les selles et le virus de l'hépatite A, qui constitue un indicateur important dans la voie de contamination fécale-orale, et en analysant leur sérologie respective (Bui et al. 2016). Il est constaté que l'infection survient lors de l'enfance pour des motifs de manque d'hygiène (Graham et al. 1991). Cette tendance ne semble pas être observée dans les pays développés, où l'infection peut apparaître tout au long de la vie de l'individu.

L'hypothèse de la transmission oro-orale a été mise en évidence dans une étude (Payao et Rasmussen, 2016). *Helicobacter pylori* a ainsi pu être détecté dans la salive (Momtaz et al. 2012), la plaque dentaire (Gao et al. 2011) et différentes régions buccales.

Une controverse existe sur le lien de causalité entre la présence d'*Helicobacter pylori* dans la cavité buccale et dans l'estomac. En effet, certains articles déclarent retrouver un génotypage identique d'*Helicobacter pylori* entre les deux milieux, suggérant que la voie buccale peut

potentiellement être une entrée de la bactérie dans l'organisme humain, ou bien que des reflux gastriques seraient en cause de sa présence dans un tel milieu (Bharath et al. 2014). À l'inverse, des publications soutiennent que la présence de la bactérie est indépendante du milieu dans laquelle elle peut être retrouvée, du fait de sa diversité génotypique différente d'un milieu à un autre (Momtaz et al. 2012). Malgré cela, si sa présence a pu être confirmée, cela ne pourrait pas constituer un indicateur de réservoir buccal, la bactérie serait présente de manière transitoire lors des contaminations oro-orales ou des reflux gastriques.

Une piste pouvant causer la transmission d'*Helicobacter pylori* est la contamination intrafamiliale. Une étude a observé l'impact du contact entre une mère et son enfant dans la transmission de *H.pylori* en comparant le génotype de la bactérie présent chez les parents et leur enfant (Mamishi et al. 2016).

Une étude de 1991 a mis en évidence pour la première fois la possibilité que l'eau serait un vecteur de transmission pour *Helicobacter pylori* auprès des individus consommant une source contaminée (Klein et al. 1991). Ce sujet a fait l'objet d'un approfondissement en 2005 par Azevedo qui a souligné le fait que l'eau peut constituer un réservoir naturel pour *Helicobacter pylori*, notamment par l'intermédiaire de la formation en biofilm (Azevedo et al. 2006).

Des biofilms composés en partie par cette bactérie ont pu être observés dans des milieux d'eau naturels mais aussi dans de l'eau potable. Cela renforce la possibilité d'une voie de transmission par la consommation d'eau non traitée correctement.

De ce constat, il est facilement imaginable que les pays en développement sont plus susceptibles de contracter HP au sein de leur population, par manque d'accessibilité à l'eau potable ou à moindre lieu à un traitement efficace des sources d'eau. Néanmoins, les risques de contamination des sources d'eau par HP dans les pays développés subsistent également. La contamination de ces milieux serait causée par l'homme lui-même par des sources fécales, constituant ainsi un réservoir temporaire (Bellack et al. 2006). Ces auteurs émettent également l'hypothèse que la transmission se poursuit par voie féco-orale pour les individus qui ont consommé l'eau contaminée.

II Importance actuelle d'*Helicobacter pylori* dans le domaine de la santé

II.1 Traitements thérapeutiques

A ce jour, le traitement thérapeutique dans le but d'éradiquer *Helicobacter pylori* de l'organisme humain résulte d'un traitement combiné de plusieurs antibiotiques.

Afin de réduire l'usage empirique d'antibiotiques, la Haute Autorité de Santé a établi un schéma de traitement (figure 1).

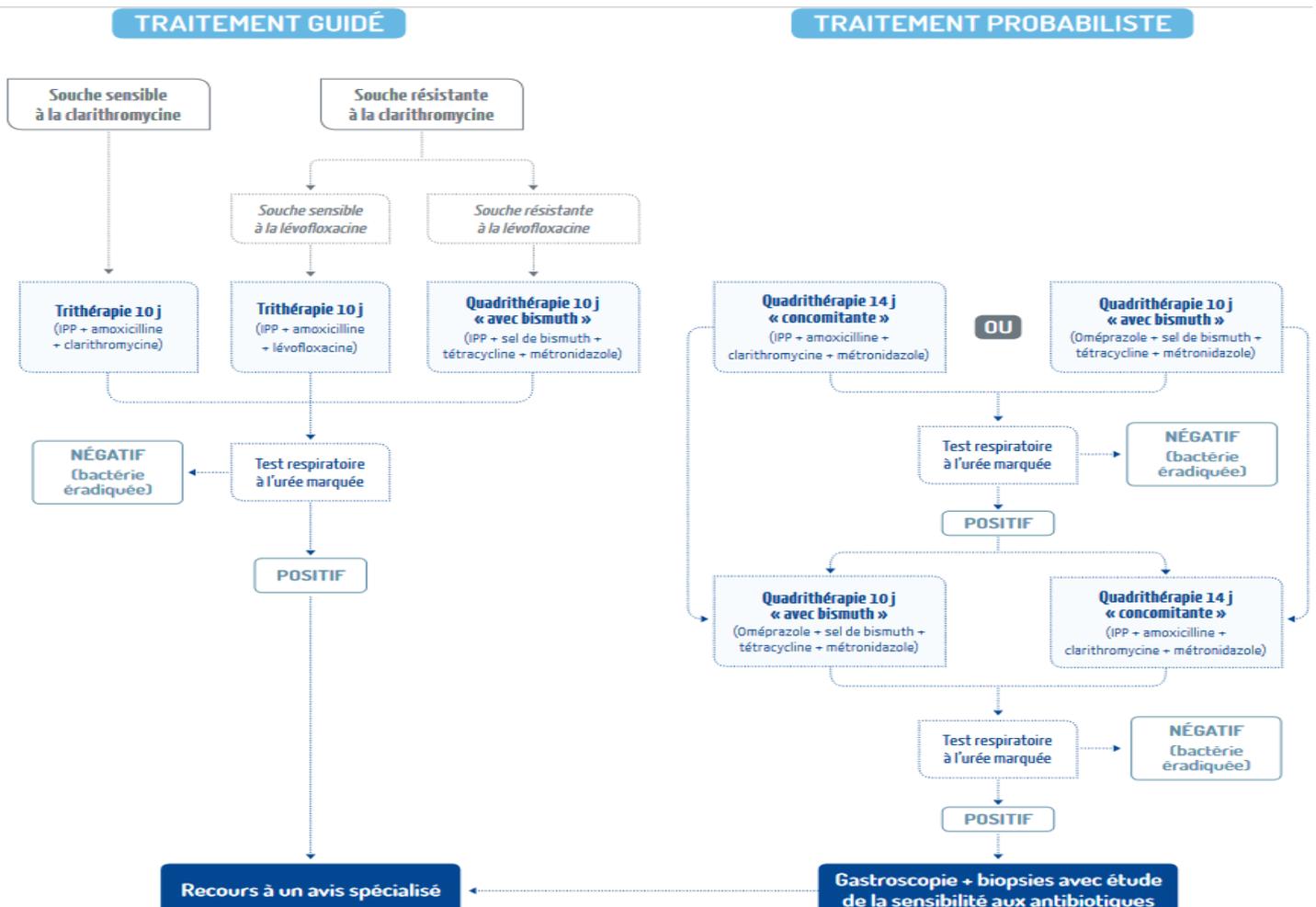


Figure 1: Schéma de traitement thérapeutique ayant pour objectif l'éradication d'*Helicobacter pylori* (HAS).

Un traitement standard nommé Pylera est prescrit de manière systématique dans le cas d'une infection d'*Helicobacter pylori*. Ce médicament comprend du métronidazole, de la tétracycline, et du sous-citrate de bismuth dont les effets sont encore inconnus pour la bactérie.

Une trithérapie de premier lieu est définie par une prise de clarithromycine, d'amoxicilline ou de métronidazole, et d'un inhibiteur de la pompe à proton (IPP) qui vise à réduire la production d'acide gastrique afin de diminuer le pH du milieu favorable à *H. pylori*. À cause de la dissémination de la résistance à la clarithromycine, cette thérapie devient de moins en moins efficace (Yang et al. 2014).

II.2 Méthodes de détection actuelles

Actuellement, il existe des méthodes de détection d'*Helicobacter pylori* définies pour une utilité de diagnostic clinique. On distingue ainsi deux catégories : les techniques invasives qui se déterminent par l'intervention d'une endoscopie afin de récolter un échantillon de biopsie gastrique. Les méthodes non invasives regroupent les autres techniques ne nécessitant pas l'acte endoscopique (tableau 1).

Les méthodes non invasives regroupent les techniques de diagnostic suivantes :

- **Le test antigénique des selles (SAT)** consiste à la recherche d'antigènes spécifiques à *Helicobacter pylori* dans des échantillons de selles. Cette technique peut impliquer soit un dosage immunoenzymatique (EIA), soit un dosage immunochromatographique (ICA). Une méta-analyse présente une sensibilité plutôt satisfaisante de 94 % et une spécificité de 97 % (Gisbert et al. 2006) ;
- **Le test sérologique** est basé sur la détection d'anticorps Immunoglobuline G (IgG) spécifiques à la bactérie à partir d'un prélèvement de sang. Cette technique est destinée à un rôle de dépistage, il ne permet donc pas d'évaluer l'infection. Ce test à lui-seul ne suffit pas lorsqu'un résultat positif est déterminé. La sensibilité des tests commercialisés est de 75 à 85 %, tandis que la spécificité est de 80 % à 100 % (Mentis et al. 2015) ;
- **Le test respiratoire à l'urée (UBT)** met en évidence l'activité uréasique *H. pylori* à l'aide de l'ingestion d'un isotope non radioactif tel que le carbone 13 (^{13}C) qui est hydrolysé en CO_2 , qui est absorbé dans le sang puis de nouveau expiré. La sensibilité de cette technique est de 96 % et sa spécificité de 93 % (Ferwana et al. 2015).

Les méthodes invasives quant à elles, se composent des méthodes suivantes :

- **Le test rapide d'uréase (RUT)** se base sur la détection de la transformation de l'urée en ammoniac par l'activité métabolique de *H. pylori*, dont la sensibilité est de 90 % (Perna et al. 2005) ;
- **La culture** des *Helicobacter pylori* sur un milieu gélosé au sang dont la confirmation de la bactérie s'effectue par spectrométrie de masse. La sensibilité est relative des conditions de mise en culture ;
- **L'histologie ou l'examen anatomo-pathologique** consiste à une colorisation standard ou immunohistochimique par l'application de colorants spécifiques ;
- **La réaction en chaîne de polymérase (PCR)** qui permet l'amplification de gènes spécifiques et conservées d'*Helicobacter pylori* tels que les gènes *UreA*, *VacA*, *ARNr 16S* ou *ARNr 23S*.

Selon la littérature scientifique, une référence « gold-standard » de ces techniques est préconisée dans la détection d'*Helicobacter pylori*. Dans cette optique, l'utilisation de la mise en culture, l'examen histologique et le test rapide d'uréase sont recommandés pour détecter la bactérie.

Tableau 1 : Techniques de diagnostic dans le cadre de la détection d'infection à *H. pylori* (Lamarque et al. 2012).

	Tests à partir des prélèvements gastriques				Tests non invasifs		
	Test rapide à l'uréase	Anatomo-pathologie	Culture	Amplification génique	Sérologie	Test respiratoire	Recherche antigènes dans les selles
Performances pour le diagnostic préthérapeutique	- Bonne	- Excellente si 5 biopsies réalisées	- Excellente spécificité - Sensibilité dépend des conditions d'acheminement des prélèvements et de l'expérience du laboratoire	- Excellente	- Excellente pour certains kits ELISA. Mauvaise pour tous les tests rapides	- Excellente	- Excellente pour les kits ELISA
Performances pour le contrôle de l'éradication	- Sensibilité insuffisante	- Bonne	- Bonne	- Données insuffisantes	- Inadaptée dans cette indication	- Excellente	- Excellente
Principales caractéristiques	- Diagnostic rapide - Non utilisable pour le contrôle de l'éradication - Non remboursé	- Résultat dépendant de la densité bactérienne et de l'expérience du pathologiste - Important pour détecter les lésions de la muqueuse gastrique	- Méthode de référence pour identifier <i>H. pylori</i> et identifier les résistances aux antibiotiques - Recommandée chaque fois que possible et particulièrement après échec d'un traitement d'éradication	- Permet la détection des principales mutations impliquées dans la résistance aux macrolides (clarithromycine) et aux fluoroquinolones (lévofloxacine) - Non remboursé	- Recommandée pour le diagnostic initial quand les autres tests sont mis en défaut: ulcère hémorragique, atrophie, lymphome du MALT, prise récente d'antibiotiques ou d'IPP - Non influencée par la charge bactérienne	sous réserve de sa réalisation au moins 4 semaines après l'arrêt des antibiotiques et au moins deux semaines après l'arrêt d'un traitement par IPP	- Recommandée pour le diagnostic et le contrôle de l'éradication, si le test respiratoire n'est pas réalisable

II.3 L'antibiorésistance chez *Helicobacter pylori*

L'antibiorésistance est une thématique importante dans la lutte médicale contre les bactéries pathogènes. Cela s'applique également pour *Helicobacter pylori*, dont la résistance aux antibiotiques est la cause principale dans l'échec des traitements thérapeutiques. La bactérie présente des résistances particulièrement fortes pour la clarithromycine qui inhibe la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité ribosomique 50S, la lévofloxacine qui inhibe l'action de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV, et la métronidazole qui altère la structure hélicoïdale de l'ADN (Mégraud et al. 2018) (tableau 2).

Tableau 2 : Taux de résistance primaire et secondaire aux antibiotiques d'*Helicobacter pylori* en France (CNRCH, données de 2020).

Antibiotique	Résistance primaire	Résistance secondaire
Clarithromycine*	78/392 (19,9 %)	44/92 (47,8 %)
Lévofloxacine	45/291 (17,1 %)	12/77 (15,6 %)
Métronidazole	164/291 (62,4 %)	64/77 (83,1 %)
Tétracycline	0/291 (0 %)	0/77 (0 %)
Rifampicine	0/291 (0 %)	2/77 (2,6 %)
Amoxicilline	1/291 (0,4 %)	3/77 (3,9 %)

La résistance à la clarithromycine, qui entre principalement dans les traitements antibiotiques contre l'infection d'*H. pylori*, est en augmentation régulière au fur et à mesure des années, au même titre que la lévofloxacine (Mégraud et al. 2012). L'impact de la résistance à la clarithromycine entraîne une réduction de la réussite du traitement thérapeutique de 70 % (Fishbach et Evans. 2007).

Cependant, la métronidazole ne semble pas impacter l'efficacité du traitement par antibiotique, bien qu'elle entraîne une forte présence de résistance chez *Helicobacter pylori* (Malfertheiner et al. 2007).

La résistance à la clarithromycine est conférée par des mutations de substitution d'une adénine en position 2142 ou 2143 en guanine, au niveau du gène codant la sous-unité 23S de l'ARN ribosomique (De Francesco et al. 2011). Ainsi, trois mutations sont responsables de l'acquisition de cette résistance : A2143G, A2142G et A2142C. La mutation A2143G est la plus

fréquente avec une prévalence de 69,8% tandis que la fréquence d'apparition de la mutation A2142C est de 2,6% (Mégraud. 2004).

La résistance à la lévofloxacine résulte de mutations de substitution d'acides aminés en position 87 et 91 sur le gène *gyrA* (Wang et al. 2010), des mutations sur les gènes *rdxA* et *frxA* quant à elles, confèrent une résistance au métronidazole.

III Contexte de l'étude

III.1 Présentation de la structure de stage

Le laboratoire PAX de Saint-Avold fait parti du groupe EspaceBio, lui-même intégré à l'entité Ouilab. Il s'agit d'un rassemblement réalisé en 2019, avec EspaceBio, de plusieurs groupes de laboratoires de la région Grand-Est, dont Monsieur Michel PAX en est actuellement le directeur.

Le groupe dispose de 12 plateaux techniques équipés afin de répondre aux besoins de réalisations d'analyses chimiques, sérologiques, hématologiques, bactériologiques et de biologie moléculaire. Un séquenceur à haut-débit est installé sur le site de Laxou en Meurthe-et-Moselle, permettant de réaliser une surveillance des mutations du SARS-CoV-2. Le plateau technique de Saint-Avold est équipé d'un système Cobas® 6800 permettant l'automatisation de la détection par PCR en temps réel de plusieurs types d'analyses différentes, de l'extraction jusqu'à l'amplification.

III.2 Principe de la PCR en temps réel

La réaction en chaîne de polymérase en temps réel permet de suivre le déroulement de l'amplification d'une séquence d'intérêt tout le long de la réaction.

A l'instar de la PCR, l'amplification résulte de l'appariement d'une paire d'amorces qui sont des séquences complémentaires à la cible. Une sonde sur laquelle est fixée un fluorochrome s'établit à son tour au niveau de ces amorces, entraînant la libération de la molécule fluorescente.

Ainsi, cette technique mesure dans le temps le nombre de copies de cette séquence, qui est traduite par une mesure de la fluorescence.

Le cycle de seuil (Ct ou Cq) est une valeur particulièrement importante à observer lors d'une PCR en temps réel. Celle-ci est déterminée par l'intersection d'une ligne de seuil avec la courbe

d'amplification traduite par une phase exponentielle. Cette valeur est un indicateur de la concentration de la séquence cible : cette concentration est importante lorsque la valeur Cq est faible.

Cette technique présente un intérêt particulier dans le cadre de la détection de pathogènes tel qu'*Helicobacter pylori* puisqu'elle permet d'attester de la présence de la bactérie en détectant et en suivant l'amplification d'un gène conservé de son génome.

III.3 Objectifs du sujet de stage

L'objectif de ce stage au laboratoire de biologie médicale est de mettre en place une méthode de détection d'*Helicobacter pylori* sur la base d'une technique PCR en temps réel. Pour cela, une étude bibliographique a été réalisée afin de définir et de comparer les performances des différents kits d'extraction et d'amplification présents sur le marché. Cette étude a également permis d'analyser les données relatives à la performance de la PCR en fonction de la matrice à analyser. Des articles traitant de la détection de mutations conférant des résistances à des antibiotiques pour *H. pylori* ont été étudiés.

De ce fait, le but principal de ce rapport, au travers de la phase expérimentale, est de présenter les résultats des essais effectués afin de détecter *H. pylori* et sa résistance à la clarithromycine, en fonction de deux options : un kit commercialisé et un design d'amorces et de sondes.

Ensuite, cette démarche sera reprise afin de proposer une méthode de détection de la résistance à la lévofloxacine, un antibiotique dont la résistance augmente particulièrement avec les années chez *Helicobacter pylori*.

Enfin, une réflexion entreprise à partir d'une étude bibliographique, a été portée sur la mise en place d'une méthode de détection non invasive par PCR en temps réel, notamment à partir d'échantillons de selles.

Matériels et méthodes

I Souches de référence

Des souches d'*Helicobacter pylori* ont été transmises par le Centre National de Recherche Campylobacter et Helicobacter (CNRCH) de Bordeaux. Parmi ces souches, deux cultures présentent une sensibilité à la clarithromycine et trois autres sont résistantes à cet antibiotique (tableau 3).

Les souches proviennent de biopsies gastriques de patients, à partir desquels une mise en culture a été réalisée. Un antibiogramme a été effectué dans le but de déterminer la sensibilité ou la résistance à la clarithromycine pour chacune de ces souches.

Tableau 3 : Souches ayant servi de matériel pour les expérimentations de la mise au point de la PCR en temps réel. La Concentration Minimale d'Inhibition (CMI) est définie par antibiogramme.

Souche	Sensibilité/résistance à la clarithromycine	CMI clarithromycine (en µg/mL)
1	Sensible	0.016
2	Sensible	0.016
3	Résistant	12
4	Résistant	32
5	Résistant	4

II Mise en culture

Les souches fournies par le CNRCH ont été préalablement repiquées par le laboratoire donneur dans un milieu gélosé Columbia avec ajout de 10 % de sang de mouton. La composition du milieu Columbia est indiquée en annexe 1. Les souches sont par la suite repiquées tous les 15 jours sur un milieu spécifique Pylori de BioMérieux (tableau 4).

Tableau 4 : Composition du milieu Pylori de BioMérieux.

Composants	Quantité
Digestion pancréatique de caséine	12,0 g/L
Digestion peptique de tissu animal	5,0 g/L
Extrait de levure	3,0 g/L
Extrait de bœuf	3,0 g/L
Fécule de maïs	1,0 g/L
Chlorure de sodium	5,0 g/L
Gélose	13,5 g/L
Vancomycine	0,01 µg/L
Amphotéricine B	0,005 µg/L
Triméthoprim	0,02 µg/L
Cefsulodine	0,01 µg/L
Ajout de 7% de sang de cheval	
pH : 7,3 + 0,2	

Les milieux de cultures sont placés dans des sachets micro-aérophiles et sont ensuite incubés à 35°C dans une étuve.

Les milieux sont observés tous les 2 à 3 jours pour s'assurer de la présence d'*H.pylori*, qui se présente phénotypiquement par des colonies petites, brillantes, rondes et bombées (annexe 2).

III Biopsies gastriques

Cinq échantillons de biopsies gastriques de patients ont été fournis par des gastro-entérologues d'hôpitaux et de cliniques partenaires à Saint-Avold. Les biopsies ont été reconnues comme étant négatives à la présence d'*Helicobacter pylori* par une méthode de mise en culture après broyage d'un fragment de biopsie. Ce matériel organique a donc permis d'évaluer le déroulement de l'extraction d'une telle matrice. Une série d'amplification a pu être effectuée avec ces échantillons afin de confirmer l'absence d'*Helicobacter pylori*.

Les échantillons de biopsies ont été conservés au congélateur dans de l'eau physiologique à -20°C dès réception.

IV Design des amorces et des sondes

IV.1 Détection d'*Helicobacter pylori* et de sa résistance à la clarithromycine

Une demande de conception d'amorces et de sondes pour la détection d'*Helicobacter pylori* et des mutations conférant des résistances à la clarithromycine a été déposée auprès de Thermo Fisher. Un design a ainsi pu être proposé à partir de l'article suivant :

Development and Validation of Multiplex Quantitative PCR Assay for Detection of Helicobacter pylori and Mutations Conferring Resistance to Clarithromycin and Levofloxacin in Gastric Biopsy (Binmaeil et al. 2021).

La détection de la bactérie est établie sur l'amplification du gène *ureA* (tableau 5). Les essais réalisés à l'aide de ces amorces et de ces sondes ont été effectués en PCR simplex : les sondes ont été conçues avec le même fluorochrome, notamment pour pouvoir distinguer les mutations A2142G et A2143G entre elles.

Tableau 5 : Design des amorces et des sondes conçues par Thermo Fisher dans le cadre de la détection d'*Helicobacter pylori* et de ses résistances à la clarithromycine.

Amorces/sondes	Séquences (5' → 3')	Cibles	Taille en paire de bases (pb)
UreA-F (forward)	AGTTCCTGGTGAGTTGTCTT	<i>UreA</i>	120
UreA-R (reverse)	TGGAAGTGTGGAGCCGATTT		
Cla-F (forward)	CTGCGCATGATATCCCGTT	ARNr 23S	157
Cla-R (reverse)	CGACCTGCATGATGGCGTA		
UreA-P	FAM-AAATGTTGGCGACAGACGGTTC-TAMRA	<i>UreA</i>	
Cla-P2142G	FAM-AGGTCCACGGGGTCTTCCGTCT-BHQ2	A2142G	
Cla-P2143G	FAM-AGGTCCACGGGGTCTTCCGTCT-BHQ2	A2143G	

Ce design a été expressément conçu à la suite de ma demande ; aucun essai n'a pu être réalisé en amont afin de tester le bon appariement des amorces sur leur cible respective.

IV.2 Détection de la résistance à la lévofloxacine

La résistance à la lévofloxacine chez *Helicobacter pylori* résulte des mutations N87K, N87I, D91N et/ou D91Y, qui sont des mutations de substitution d'acides aminés sur le gène *gyrA*. Afin de formuler une demande de conception, les mutations au niveau des acides nucléiques correspondant aux acides aminés mutés de *gyrA* ont été retrouvées à partir d'une séquence référence du gène *gyrA* sur Genbank (référence L29481.1) (figure 2). Le lien permettant d'y accéder est le suivant : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/L29481>.

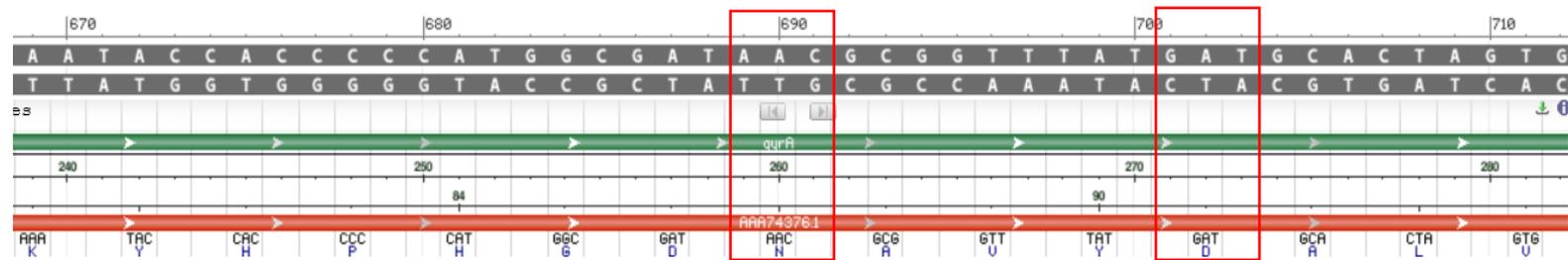


Figure 2 : Séquence partielle du gène *gyrA*. Les codons 87 et 91 associés aux acides aminés concernés par les mutations sont encadrés en rouge.

Un design réalisé par Tib-molbiol a été basé sur deux articles :

- Rapid Detection of Point Mutations in the *gyrA* Gene of *Helicobacter pylori* Conferring Resistance to Ciprofloxacin by a Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Real-Time PCR Approach (Glocker et Kist. 2004) ;
- Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low- and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori* (Tankovic et al. 2003).

Les amorces et les sondes conçues par TIB-Molbiol reposent sur une coloration par SYBR-GREEN I. Cependant, ce type de fluorescence ne permet pas une compatibilité avec un multiplexage, qui est un critère important dans le cadre d'une détection clinique, afin de minimiser le nombre de réactions pour un même échantillon. De plus, les amplificateurs QuantStudio 5 de Thermofisher sur lesquels les techniques PCR sont appliquées ne permettent pas une compatibilité avec le SYBR-GREEN I. Le design proposé par TIB-molbiol est présent en annexe 3.

Une seconde conception a été effectuée par Thermo Fisher. Le design a été basé sur la même étude ayant servi à la conception des amorces et des sondes pour la détection d'*Helicobacter pylori* à partir du gène *ureA*, et de ses résistances à la clarithromycine (tableau 6). Aucun essai n'a donc été réalisé pour garantir du bon appariement des amorces sur leur séquence respective. La fluorescence repose sur la technologie Taqman, et les amorces sont construites avec le même fluorochrome afin qu'elles puissent cibler chacune des mutations, ne permettant pas de réaliser des essais en multiplexage.

Tableau 6 : Design des amorces et des sondes conçues par Thermo Fisher dans le cadre de la détection de la résistance à la lévofloxacine d'*Helicobacter pylori*.

Amorces/Sondes	Séquences (5' → 3')	Cibles	Taille en paire de bases (pb)
Lev-F (forward)	CGCCATCAATAGAGCCAAAAG	<i>gyrA</i>	136
Lev-R (reverse)	GTGGGTGATGTGATTGGTAAAT		
Lev-N87 WT	HEX-CCG+C+G+TTA+T+CG-IowaBlack [®] FQ	Wild type	
Lev-N87K	6-FAM-CCG+C+T+TT+A+T+CGC-IowaBlack [®] FQ	N87K	
Lev-N87I	Cy5-CCG+C+A+AT+A+T+CGC-IowaBlack [®] RQ-Sp	N87I	
Lev-D91 WT	HEX-TA+T+G+AT+GCG+CT-IowaBlack [®] FQ	Wild type	
Lev-D91N	Cy5-TTA+T+A+ATG+C+G+CTAGT-IowaBlack [®] RQ-Sp	D91N	
Lev-D91Y	6-FAM-TTA+T+T+ATG+C+G+CTAGT-IowaBlack [®] FQ	D91Y	

V Extraction

L'extraction à partir des souches et des biopsies gastriques est réalisée à l'aide du kit des fournisseurs Qiagen : le QIAamp DNA mini kit. Le principe repose sur une extraction chimique impliquant des réactions enzymatiques.

L'extraction de l'ADN bactérien *H. pylori* a été réalisée manuellement en suivant les instructions du fournisseur pour le kit QIAamp DNA mini kit. Le protocole est présent en annexe 4.

A savoir que cette extraction est automatisable sur les machines d'extraction Qiacube Connect de Qiagen. Le laboratoire EspaceBio à Metz, où la technique de détection d'*Helicobacter pylori* par PCR sera mise en place, est en possession de ces extracteurs.

Lorsque l'extraction est terminée, les éluats obtenus sont conservés à l'état congelé à -20°C.

VI Amplification

Des essais d'amplification ont été réalisés à partir du kit RIDAGENE *Helicobacter pylori* de R-BIOPHARM.

Le kit RIDAGENE cible le gène codant la sous unité 16S de l'ARN ribosomique pour déterminer la présence d'*Helicobacter pylori*. Une paire d'amorce et une sonde associée permettent la détection d'une mutation du gène codant la sous-unité 23S de l'ARNR qui confère des résistances à la clarithromycine. Un contrôle interne d'ADN est également inclus afin de prévenir d'une inhibition de PCR. Des contrôles positifs et négatifs sont également fournis dans ce kit.

Le mélange-maître a été préparé selon les indications du fournisseur (tableau 7), additionné à un volume de 5µL d'éluat contenant l'ADN bactérien.

L'amplification est réalisée sur des thermocycleurs QuantStudio5 de l'entreprise Thermo Fisher. Celle-ci est basée sur un ensemble de 45 cycles : une dénaturation initiale de 1 minute à 95°C, puis dénaturation de 10 secondes à 95°C et hybridation - élongation à 60°C pendant 15 secondes.

Tableau 7 : Préparation du mélange-maitre du kit RIDAGENE *H.pylori* + ClariR de R-Biopharm. Issu du protocole relatif au kit d'amplification du fournisseur.

Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % supplémentaires)
Mélange réactif	19,9 µl	218,9 µl
Taq-Polymérase	0,1 µl	1,1 µl
ADN de contrôle interne	1,0 µl	11 µl
Total	21,0 µl	231,0 µl

L'amplification à partir des amorces et des sondes conçues par Thermo Fisher a également été expérimentée. Pour cela, le master mix TaqPath™ BactoPure™ Microbial Detection Master Mix a été appliqué selon les instructions du fournisseur (annexe 5). Un programme composé d'une étape de dénaturation initiale de 2 minutes à 95°C, suivi de 40 cycles avec une dénaturation de 10 secondes à 95°C et une étape d'hybridation/élongation de 30 secondes à 60°C.

Résultats

I Etape d'extraction de l'ADN bactérien

L'extraction de deux matrices différentes, les souches fournies par le CNRCH et les biopsies gastriques, ont pu être mises en place avec le kit QIAamp DNA Mini Kit.

Cette étape s'est réalisée sans problème notable et le kit est particulièrement simple à mettre à exécution. L'extraction de l'ADN à partir de souches d'*Helicobacter pylori* a été concluante puisqu'elle a permis le bon déroulement des essais d'amplification. L'extraction des biopsies gastriques a été réalisée afin de s'assurer que ce genre de matrice n'altère pas l'efficacité de ce processus.

Une observation phénotypique toutes les 10 minutes ont permis de constater l'évolution de la lyse des tissus. Une dissolution complète des fragments de biopsies gastriques a été observée à partir de 20 minutes en présence de la protéinase K, laissant supposer qu'un temps de 30 minutes de lyse suffit.

Un essai a été réalisé sur Qiacube Connect. L'automatisation de cette étape permet de réduire considérablement le délai d'exécution.

II Essais d'amplification de l'ADN bactérien par PCR en temps réel

II.1 Essais du kit RIDAGENE *Helicobacter pylori*

Des essais expérimentaux ont été réalisés avec le kit RIDAGENE *Helicobacter pylori* afin de tester et d'optimiser son utilisation pour une analyse de routine. Les 5 souches à disposition ont été traitées et 3 répétitions ont été effectuées pour chacune d'elles.

Le premier essai a été réalisé en suivant strictement les recommandations du fournisseur, indiquées dans le matériel et méthode de la partie concernant l'amplification. Les résultats ont indiqué une absence d'amplification générale pour les cibles détectant *H. pylori* et les résistances à la clarithromycine pour l'ensemble des 5 souches testées et de leurs 3 répliquats. Bien que certaines valeurs de Cq (cycle de seuil) aient pu être déterminées, celles-ci ne sont pas exploitables puisque ces valeurs Cq, présentes en annexe 6, ne sont pas observées pour toutes les répétitions d'une même souche.

Les courbes (figure 3) permettent de constater le bon appariement des amorces et des sondes sur leurs cibles respectives. Rn en ordonnée correspond à la fluorescence traduite par la libération du fluorochrome de la sonde associée, en fonction du nombre de cycles en abscisse. L'allure générale pour les cibles *H. pylori* et les résistances à la clarithromycine (ClariR) ne permettent pas d'observer une phase exponentielle traduite par une augmentation de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. Ces informations permettent de suggérer fortement que l'absence d'amplification est potentiellement due à une quantité insuffisante de Taq polymérase dans le master mix par rapport à la quantité d'ADN bactérien.

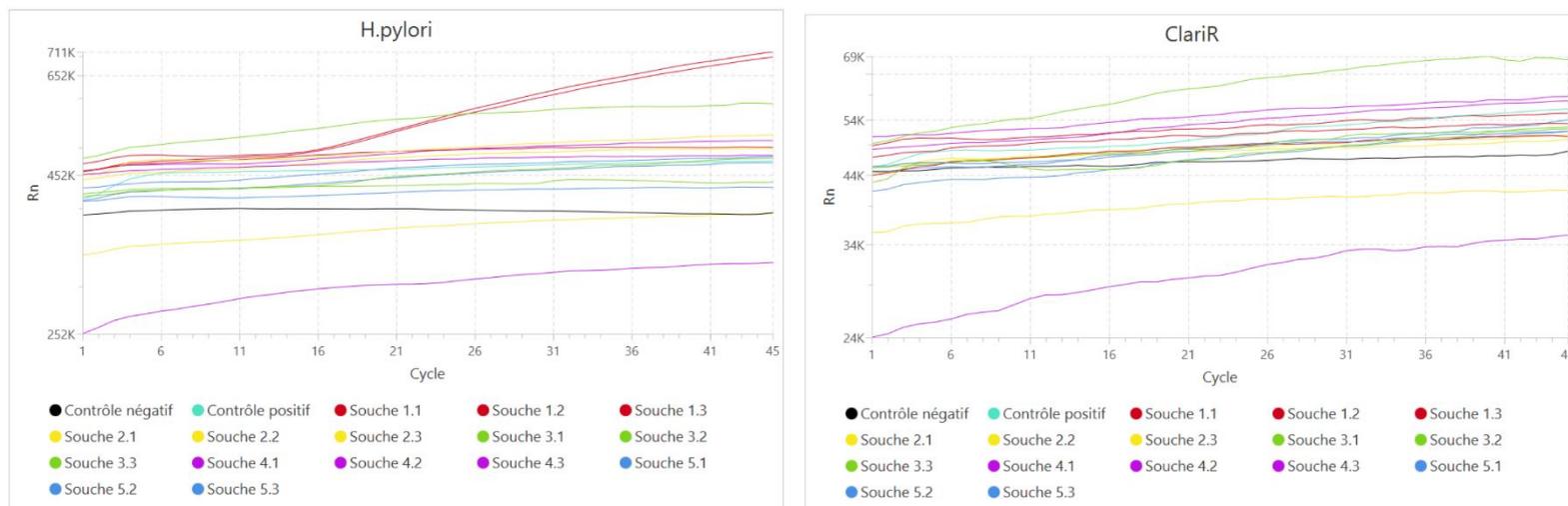


Figure 3 : Représentation graphique de l'amplification d'*H.pylori* et de sa résistance à la clarithromycine (ClariR) de l'essai n°1 par PCR en temps réel.

Le contrôle interne d'ADN (ICD) présente également une absence totale d'amplification, à l'exception du contrôle positif (figure 4). Des hypothèses peuvent être formulées : l'absence d'amplification de l'ICD peut traduire soit une inhibition du bon déroulement de la PCR, soit une quantité importante d'ADN bactérien par rapport à la quantité d'ICD ajouté à chaque échantillon.

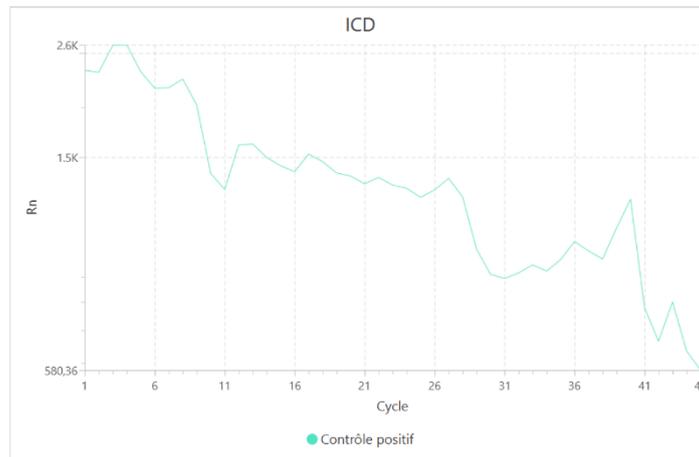


Figure 4 : Représentation graphique de l'amplification du contrôle interne d'ADN (ICD) de l'essai n°1 par PCR en temps réel.

La deuxième phase d'essai a été réalisée en augmentant le volume de Taq-polymérase de 0,1 μ L à 0,7 μ L dans le master mix. De plus, le temps de dénaturation initiale a été augmenté de 1 minute à 5 minutes pour une température fixée à 95°C. Les résultats permettent d'indiquer une amplification satisfaisante : une valeur de Cq est obtenue pour l'ensemble des souches et leurs répliquats (tableau 8). Néanmoins, nous pouvons constater une valeur Cq pour les cibles d'amplification correspondant à une mutation conférant une résistance à la clarithromycine pour 2 des 3 répliquats de la souche 1 et pour les 3 répliquats de la souche 2, qui sont sensibles à la clarithromycine. Cela peut notamment se traduire par une surcharge de l'ADN bactérien par rapport au volume de réaction, causant un « bruit de fond ».

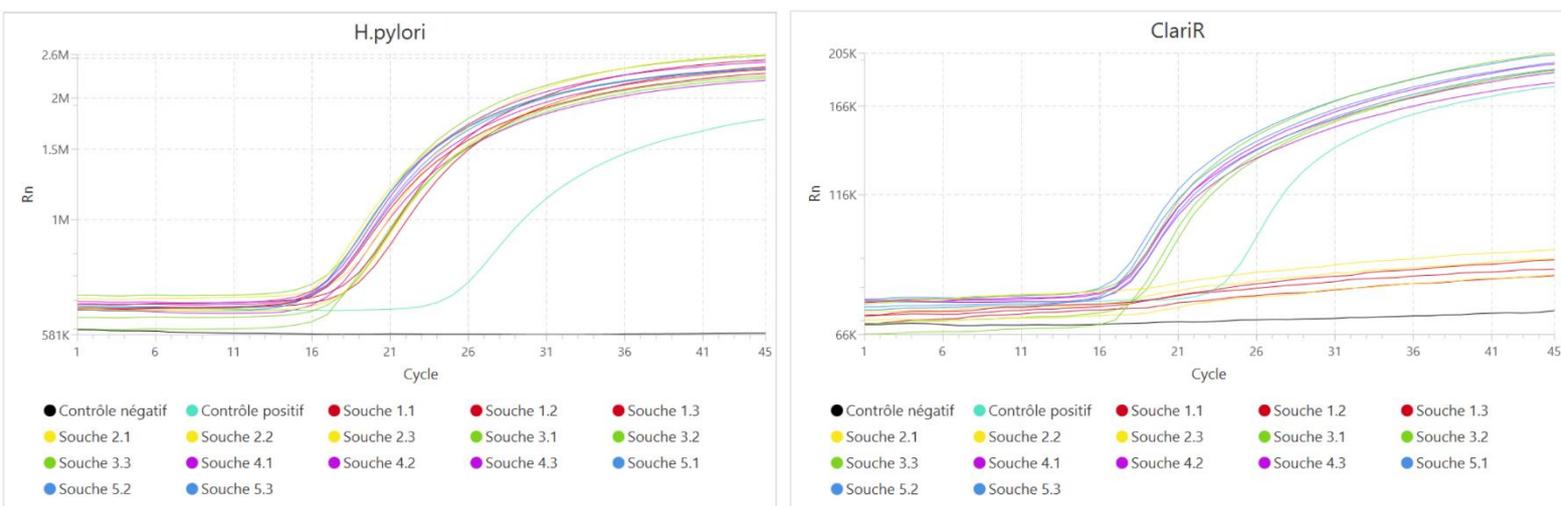


Figure 5 : Représentation graphique de l'amplification d'H.pylori et de sa résistance à la clarithromycine (ClariR) de l'essai n°2 par PCR en temps réel.

Tableau 8 : Valeurs de cycle de seuil (Cq) pour chacune des 5 souches et leurs 3 répétitions de l'essai n°2.

Valeurs de Cq	Souche 1 (sensible à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	18,814	18,416	17,071	18,1003333	0,91337086
ClariR	/	23,788	22,083	22,9355	1,20561706
ICD	/	/	/	/	/

Valeurs de Cq	Souche 2 (sensible à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	17,999	18,065	16,133	17,399	1,09688468
ClariR	24,265	21,537	20,767	22,1896667	1,83806456
ICD	/	/	/	/	/

Valeurs de Cq	Souche 3 (résistante à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	16,92	17,91	17,412	17,414	0,49500303
ClariR	17,128	17,975	17,191	17,4313333	0,47188169
ICD	/	/	/	/	/

Valeurs de Cq	Souche 4 (résistante à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	16,78	16,953	17,037	16,9233333	0,13104325
ClariR	16,961	16,92	16,995	16,9586667	0,0375544
ICD	/	/	/	/	/

Valeurs de Cq	Souche 5 (résistante à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	16,796	16,335	16,326	16,4856667	0,26879422
ClariR	16,992	16,406	16,416	16,6046667	0,33547777
ICD	/	/	/	/	/

	Contrôle positif	Contrôle négatif
H.pylori	25,278	/
ClariR	23,269	/
ICD	25,025	24,91

De plus, aucune valeur de Cq pour la détection de l'ICD de chaque échantillon n'est présente pour cet essai également (figure 6). Bien que la fonction du contrôle interne, lorsqu'il est amplifié, est de s'assurer qu'il n'y a pas d'inhibition de la PCR, sa présence n'est pas requise lorsque des échantillons se révèlent positifs.

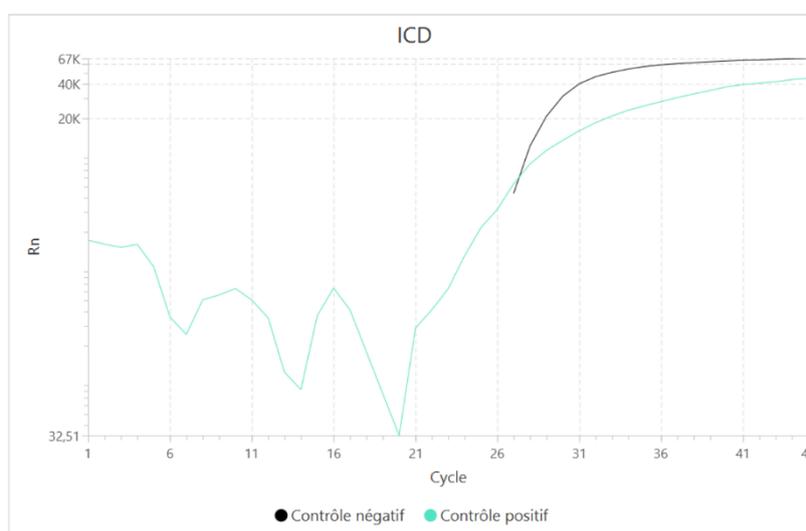


Figure 6 : Représentation graphique de l'amplification du contrôle interne d'ADN (ICD) de l'essai n°2 par PCR en temps réel.

Pour le troisième essai, l'éluat contenant l'ADN d'*Helicobacter pylori* a été dilué à 1/2 avec de l'eau distillée, le volume de prise pour l'éluât reste inchangé. Le volume d'ICD a été augmenté de 1µL à 5µL

Les résultats démontrent une amplification conforme aux attentes : une valeur Cq relative à l'amplification du gène codant l'ANRr 16S est présente pour les 5 souches testées, les valeurs Cq pour la résistance à la clarithromycine sont présentes pour les souches 3, 4 et 5 qui sont reconnues résistantes à cet antibiotique (tableau 9). La dilution de l'ADN bactérien a ainsi permis de supprimer le bruit de fond observé dans l'essai n°2. L'absence d'amplification de l'ICD est néanmoins toujours observée (figure 7).

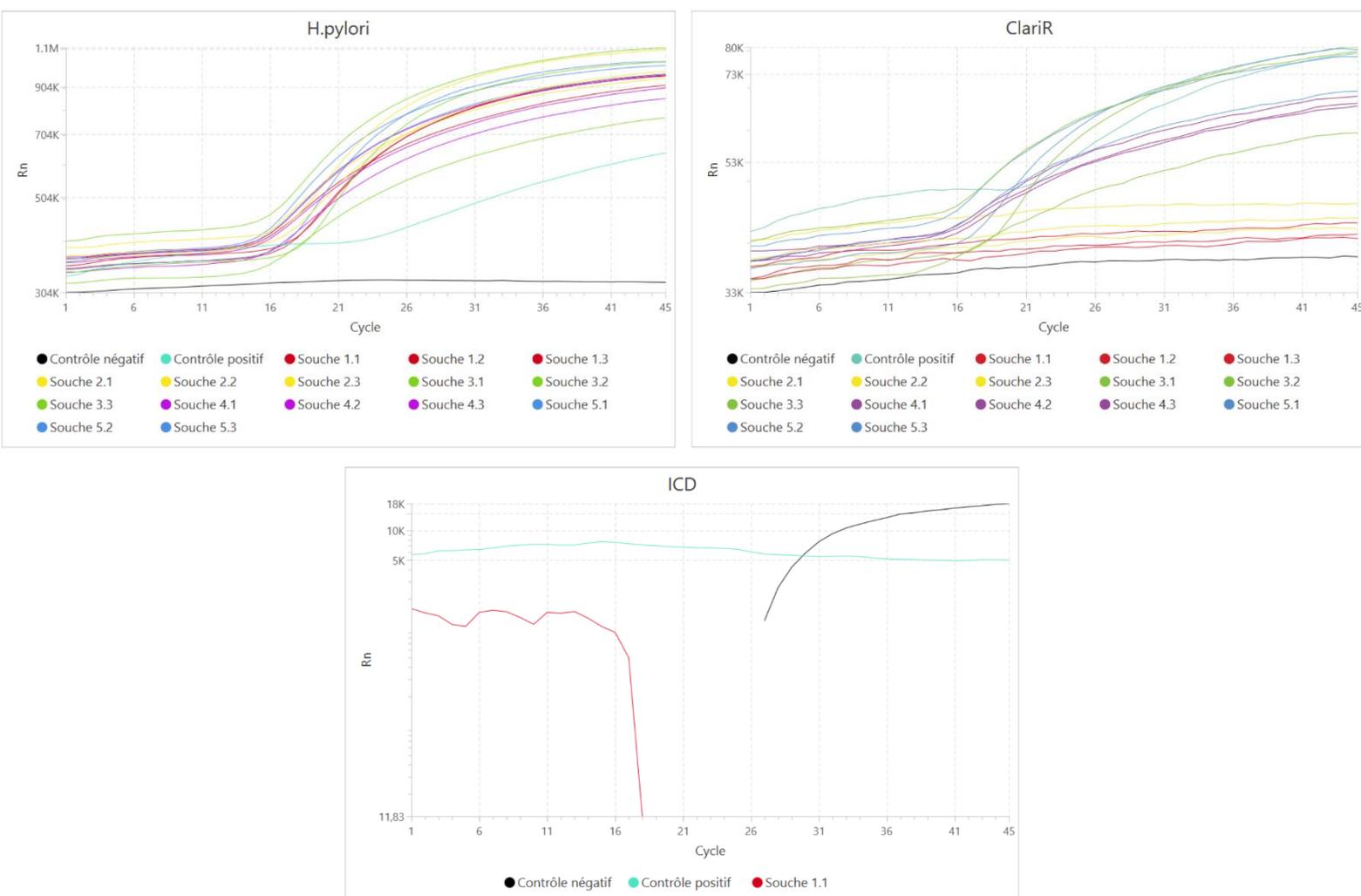


Figure 7 : Représentation graphique de l'amplification d'H.pylori, de sa résistance à la clarithromycine (ClariR) et du contrôle interne d'ADN (ICD) de l'essai n°3 par PCR en temps réel.

Tableau 9 : Valeurs de cycle de seuil (Cq) pour chacune des 5 souches et leurs 3 répétitions de l'essai n°3/

Valeurs de Cq	Souche 1 (sensible à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	17,348	16,68	15,447	16,4916667	0,96439221
ClariR	/	/	/	/	/
ICD	/	/	/	/	/

Valeurs de Cq	Souche 2 (sensible à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	16,789	16,629	14,685	16,0343333	1,17129216
ClariR	/	/	/	/	/
ICD	/	/	/	/	/

Valeurs de Cq	Souche 3 (résistante à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	15,431	17,834	15,607	16,2906667	1,33945972
ClariR	12,291	16,966	13,052	14,103	2,5084571
ICD	/	/	/	/	/

Valeurs de Cq	Souche 4 (résistante à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	15,271	15,369	15,565	15,4016667	0,14969747
ClariR	13,662	14,611	11,254	13,1756667	1,73053527
ICD	/	/	/	/	/

Valeurs de Cq	Souche 5 (résistante à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	15,313	16,412	15,024	15,583	0,73233257
ClariR	14,655	15,917	13,818	14,7966667	1,05664674
ICD	/	/	/	/	/

	Contrôle positif	Contrôle négatif
H.pylori	26,286	/
ClariR	22,032	/
ICD	/	16,866

Afin de confirmer l'hypothèse que la quantité importante d'ADN bactérien réalise une compétition dans l'amplification des contrôles internes, une dilution en cascade est réalisée à partir de l'éluat de la souche 4.

Les représentations graphiques d'amplification, présentes en annexe 7, montrent un décalage progressif des courbes au fur et à mesure des dilutions.

Une amplification de l'ICD est observée à partir d'une dilution 10^{-3} de l'éluat, démontrant ainsi que la détection de l'ICD dépend d'une proportion inverse de la concentration d'ADN de la bactérie, qui provoque une compétition et consomme les dNTPs en priorité (figure 8 et tableau 10).

De plus, une limite de détection d'*H. pylori* et de la cible ClariR est constatée à partir d'une dilution 10^{-5} de l'éluat (tableau 10), bien que cette information manque de pertinence du fait que la concentration d'ADN bactérien est inconnue.

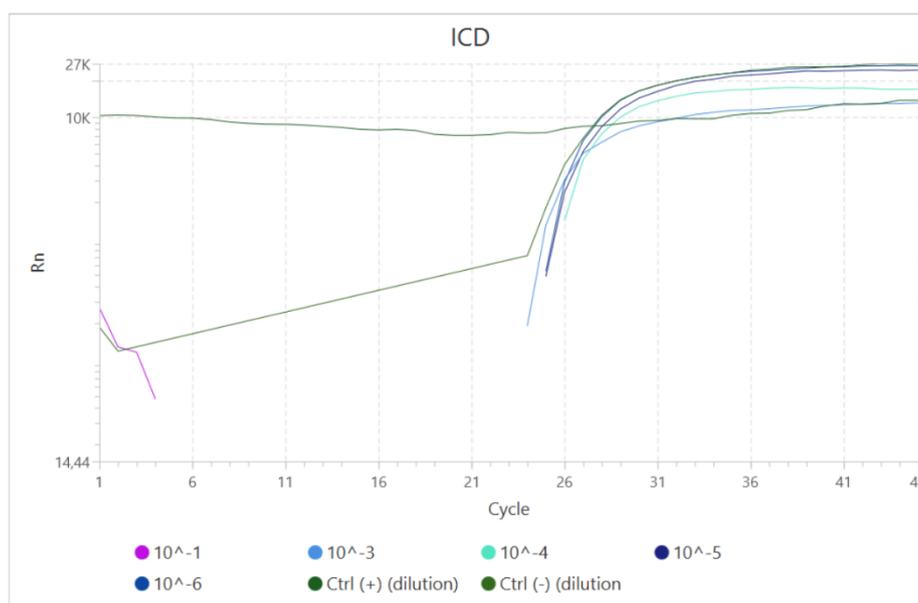


Figure 8 : Représentation graphique de l'amplification du contrôle interne d'ADN (ICD) de l'essai n°4 des dilutions par PCR en temps réel.

Tableau 10 : Valeurs de cycle de seuil (Cq) pour chacune des dilutions de l'essai n°4.

Valeurs de Cq	Dilution											
	10^0	1/2	1/4	1/6	1/8	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
H.pylori	14.929	15.995	16.906	17.881	17.435	17.79	20.583	24.196	25.841	28.575	/	
ClariR	14.805	15.121	16.049	18.157	17.705	18.086	19.808	19.422	24.393	/	/	
ICD	/	/	/	/	/	/	/	22.351	22.498	21.756	22.197	

	Contrôle positif	Contrôle négatif
H.pylori	22.342	
ClariR	20.545	
ICD	22.763	21.609

Afin de garantir la détection de l'ICD lorsque des échantillons négatifs sont présents, des fragments de biopsies gastriques négatives à *Helicobacter pylori* ont subi une extraction suivie d'une amplification dans les mêmes conditions que l'essai n°3.

Pour s'assurer du bon déroulement de l'extraction, le contrôle interne a été préalablement ajouté pendant cette étape. Les résultats permettent de confirmer l'absence d'*Helicobacter pylori* dans chacun des échantillons de biopsies gastriques, conformément au diagnostic établi préalablement par une mise en culture (figure 9). Plus important, une valeur Cq associée à l'ICD est exprimée pour chaque échantillon négatif, permettant ainsi d'affirmer l'amplification de ce contrôle interne lorsque des échantillons sont négatifs, et d'écarter la possibilité des

« faux négatifs » dus à une inhibition de la PCR (annexe 8). Néanmoins, l'absence d'amplification de l'ICD au niveau du contrôle positif persiste malgré tout.

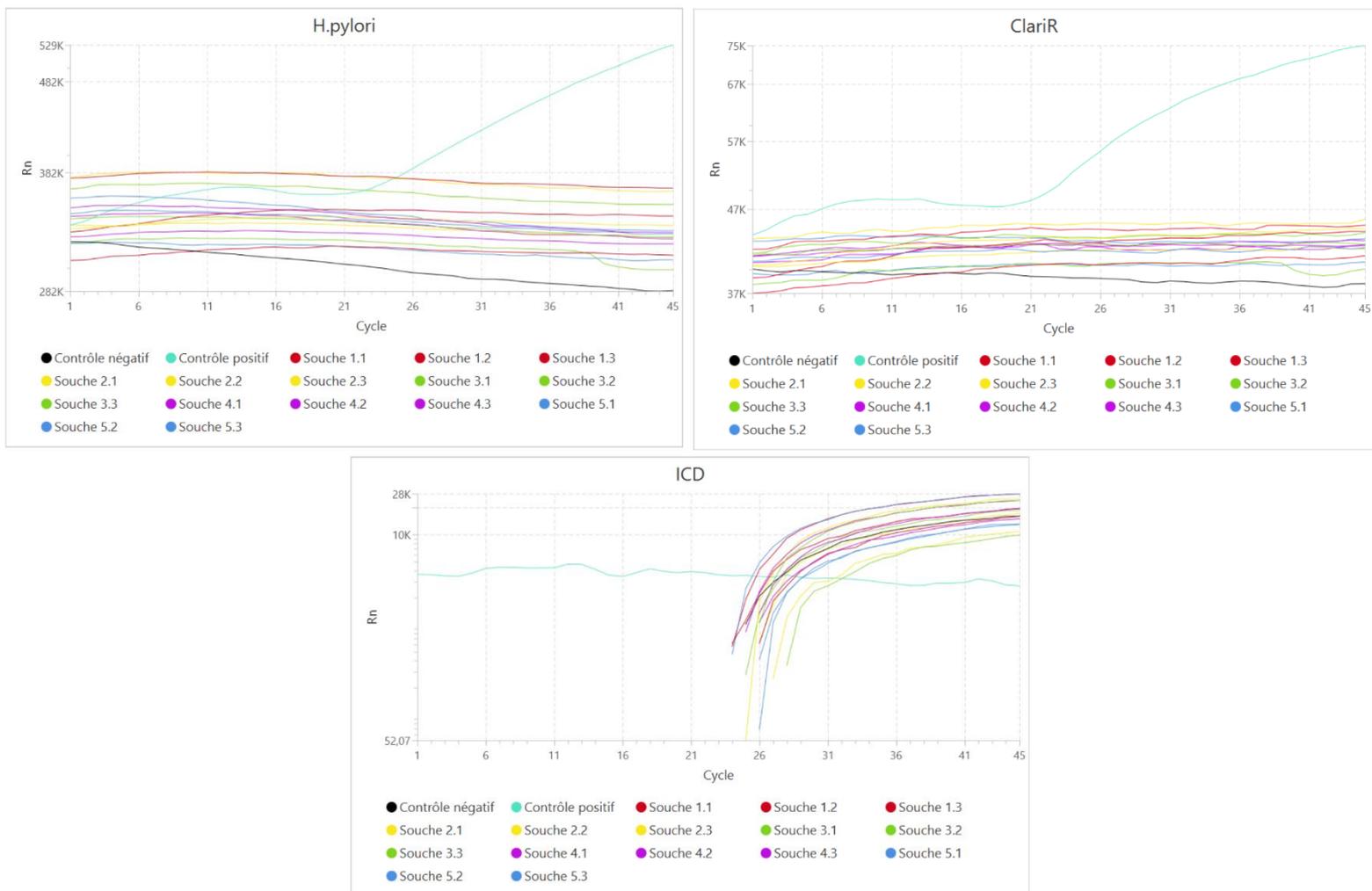


Figure 9 : Représentation graphique de l'amplification d'H.pylori, de sa résistance à la clarithromycine (ClariR) et du contrôle interne d'ADN (ICD) de l'essai n°5 réalisé à partir des biopsies gastriques négatives, par PCR en temps réel.

II.2 Essai du design des amorces et des sondes de Thermofisher

Les amorces et sondes ont été expérimentées sur les 5 souches d'*Helicobacter pylori* en appliquant le protocole concernant le master mix et le programme de la PCR recommandés par le fournisseur.

En ce qui concerne les amorces ciblant les mutations A2143G et A2142G, une détection anormale d'amplification pour les souches 1 et 2, sensibles à la clarithromycine, est observée (figure 10 et tableau 11). Plus important, la détection d'une double mutation pour l'ensemble des souches testées laisse fortement suggérer à un mésappariement des amorces sur les séquences spécifiques ciblées du gène codant l'ARNr 23S, possiblement induit par une mauvaise conception de ces paires d'amorces. En effet, les mutations ciblées qui confèrent une résistance à la clarithromycine sont peu communes, la mutation A2143G est majoritaire.

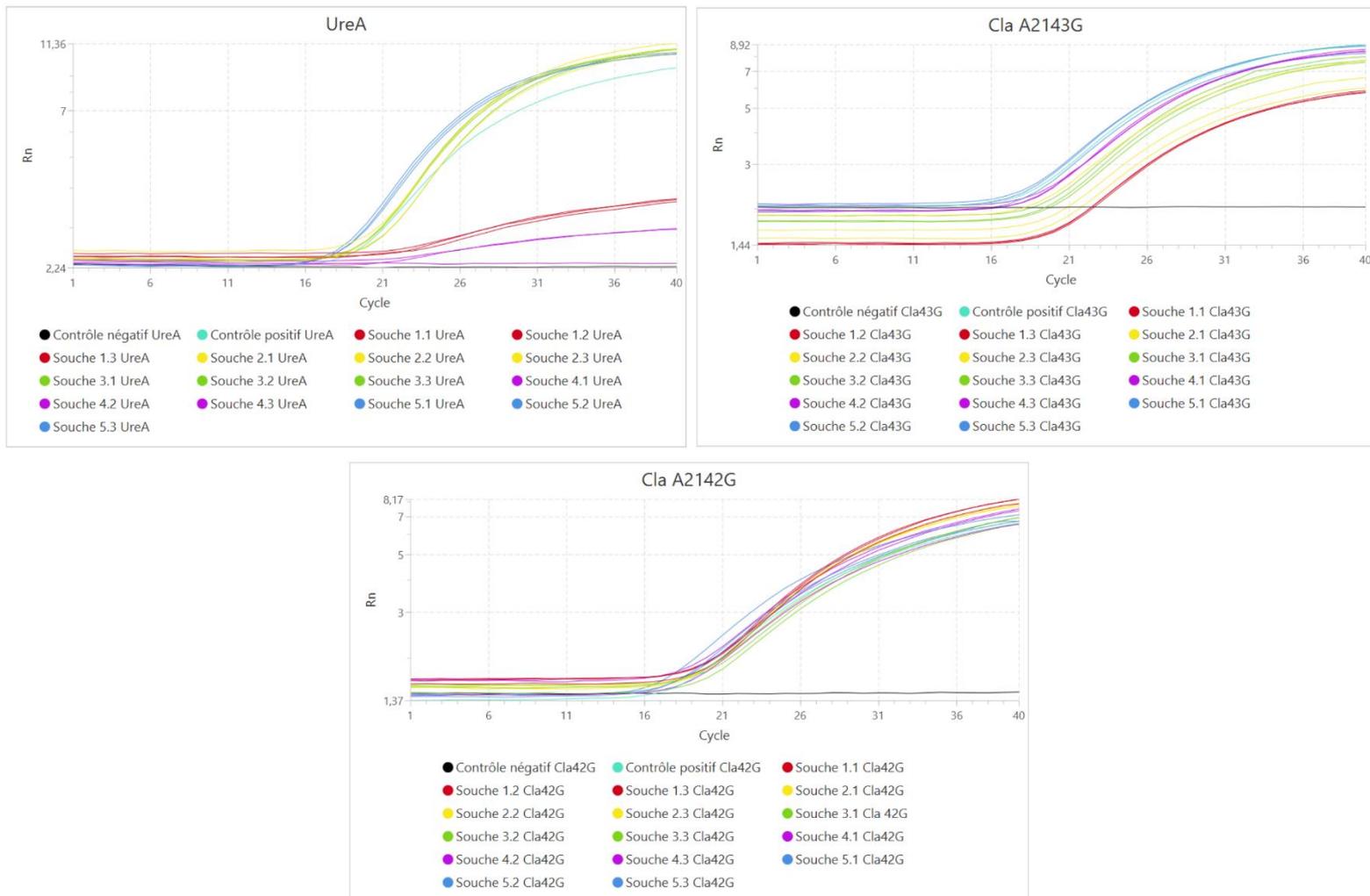


Figure 10 : Représentation graphique de l'amplification d'*H.pylori*, et de ses mutations A2142G et A2143G conférant des résistances à la clarithromycine (*ClariR*) de l'essai réalisé à partir du design de Thermo Fisher, par PCR en temps réel.

Tableau 11 : Valeurs de cycle de seuil (Cq) pour chacune des 5 souches et leurs 3 répétitions de l'essai du design conçu par Thermo Fisher.

Valeurs de Cq	Souche 1 (sensible à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
UreA	23,917	23,773	23,413	23,701	0,25959969
A2142G	19,949	20,099	19,969	20,0056667	0,08144528
A2143G	20,975	20,889	20,852	20,9053333	0,06310573

Valeurs de Cq	Souche 2 (sensible à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
UreA	19,263	19,459	18,959	19,227	0,2519365
A2142G	19,908	19,81	19,635	19,7843333	0,13829799
A2143G	20,342	19,306	20,476	20,0413333	0,64033221

Valeurs de Cq	Souche 3 (résistante à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
UreA	19,502	18,661	18,844	19,0023333	0,44229214
A2142G	20,386	20,194	19,71	20,0966667	0,34835231
A2143G	19,829	19,752	20,069	19,8833333	0,16533703

Valeurs de Cq	Souche 4 (résistante à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
UreA	25,013	/	24,102	24,5575	0,64417428
A2142G	19,755	18,934	19,408	19,3656667	0,41213388
A2143G	19,214	19,043	18,992	19,083	0,11627983

Valeurs de Cq	Souche 5 (résistante à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
UreA	17,509	17,414	17,535	17,486	0,06369458
A2142G	18,553	18,316	17,467	18,112	0,57101751
A2143G	18,432	18,248	18,115	18,265	0,15918229

	Contrôle positif	Contrôle négatif
UreA	18.578	/
A2142G	18.891	/
A2143G	18.534	/

III Détection de la résistance à la lévofloxacine

La phase d'expérimentation concernant la détection de mutations conférant la résistance à la lévofloxacine chez *Helicobacter pylori* n'a pas pu être traitée durant ce stage : le manque d'échantillons positifs à une résistance à cet antibiotique en est la cause. Cette résistance, bien qu'elle soit émergente, n'est pas encore répandue. Il a donc été complexe de se procurer des souches résistantes à la lévofloxacine durant la période de stage.

Cependant, une étude de prospection sera menée sur le long terme afin de récolter des échantillons qui permettront d'effectuer cette procédure de tests.

Des amorces et des sondes ont été conçues par Thermo Fisher à la suite de la démarche que j'ai entreprise avec ces fournisseurs. La procédure de tests est donc prête à être effectuée lorsqu'un nombre suffisant de souches résistantes à la lévofloxacine sera disponible.

IV Détection d'*Helicobacter pylori* à partir d'échantillons de selles

La phase d'essai de détection d'*Helicobacter* sur des échantillons de selles a été abandonnée : l'étude bibliographique menée sur ce sujet a permis de conclure que cette matrice n'est pas pertinente à appliquer pour une méthode de détection par PCR. En effet, l'activité digestive a tendance à dégrader *Helicobacter pylori*. De plus, les essais qui ont pu

être réalisés dans la littérature démontrent une sensibilité de détection peu satisfaisante pour assurer une bonne précision des résultats, ce qui peut engendrer un risque de « faux négatifs ». La matrice selles comporte également de nombreux inhibiteurs naturels de PCR tels que les sels biliaires, les sucres complexes.

De plus, il existe à ce jour un développement important de techniques de recherche d'antigènes d'*Helicobacter pylori* par des anticorps monoclonaux à partir d'échantillons de selles. Cette méthode s'est avérée particulièrement efficace pour le diagnostic et le suivi d'éradication d'*H.pylori*. Il est prévu que cette technique, inscrite désormais dans la nomenclature des techniques de diagnostic recommandées, soit prochainement remboursée par l'assurance maladie auprès des patients nécessitant son usage.

Discussion

La réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR) est une technique particulièrement efficace dans le cadre de la détection de micro-organismes dans un contexte d'analyse clinique. Cette méthode offre une sensibilité relativement excellente, en fonction du type d'échantillon exploité pour une analyse.

L'ensemble des travaux expérimentaux réalisés durant cette période de stage a permis de mettre en évidence la possibilité de détecter l'ADN d'*Helicobacter pylori* à partir d'une technique PCR en temps réel.

La mise en place d'une méthode de détection d'*Helicobacter pylori* par PCR en temps réel permettra de remplacer la méthode actuellement employée de la mise en culture à partir de biopsies gastriques. L'avantage majeur de cette substitution réside dans le gain de temps de restitution des résultats. En effet, la mise en culture exige au minimum 5 à 6 jours pour pouvoir observer une croissance de *H.pylori*, et 12 jours afin de confirmer l'absence de croissance. De plus, la PCR présente une meilleure sensibilité dans les résultats obtenus, ainsi qu'une spécificité plus importante puisque le risque d'une mauvaise observation phénotypique est écarté.

Cette technique permettra également de déterminer la présence de résistances à des antibiotiques et ainsi de proposer un traitement personnalisé, limitant le développement de l'antibiorésistance.

La technique par PCR en temps réel permet également de réaliser plusieurs analyses d'échantillons en même temps, et d'effectuer la détection de plusieurs cibles pour un même échantillon.

Il est important de savoir que les méthodes de biologie moléculaire, notamment au travers de la technique PCR, commencent à obtenir une importance dans le domaine de la bactériologie appliquée à la biologie médicale, jusqu'à maintenant établie principalement sur la mise en culture. A l'instar de la virologie, l'intérêt de la PCR commence à émerger dans le cadre de la détection de la bactériologie, puisqu'elle s'inscrit au fur et à mesure du temps dans la nomenclature des actes médicaux et acquiert une notoriété auprès des institutions médicales telles que la Haute Autorité de Santé (HAS), ce qui est le cas pour *Helicobacter pylori*. L'ajout

dans la nomenclature de la détection de *Helicobacter pylori* par PCR en temps réel est en cours et pourra bénéficier par la suite d'un remboursement de cet acte de diagnostic par l'assurance maladie.

Le défaut majeur des essais qui ont été réalisés est le manque d'échantillons de biopsies positives à la bactérie étudiée. En effet, bien que des essais ont permis de démontrer l'amplification des séquences spécifiques à *Helicobacter pylori* à partir de souches issues de biopsies gastriques de patients, il aurait été particulièrement intéressant de pouvoir mener des essais à partir de cette matrice directement et de réaliser une comparaison des différents rendus de résultats avec l'amplification à partir de souches. Néanmoins, l'utilisation des biopsies gastriques négatives mises à disposition, avec ajout d'un contrôle interne, a permis de constater l'efficacité du kit d'extraction de Qiagen à lyser les tissus et à purifier l'ADN bactérien. La présence d'une amplification du contrôle interne indique que la technique PCR n'a pas été affectée par une inhibition.

Bien que les biopsies gastriques soient négatives à *Helicobacter pylori*, ces tissus sont le foyer d'autres bactéries, permettant d'attester d'une spécificité relative des amorces et des sondes du kit RIDAGENE testé dans cette étude.

La dilution en cascade réalisée dans l'essai n°4 présente rapidement des limites : en effet, cette dilution a été réalisée à partir d'un éluat dont la concentration d'ADN bactérien est inconnue, et aucun moyen n'a pu être mis en place pour pouvoir la déterminer. Cependant, il aurait été judicieux de réaliser une extraction à partir d'une UFC et d'extrapoler la quantité d'ADN bactérien à partir de la valeur Cq exprimée après amplification.

Nous pouvons néanmoins constater qu'en vue des faibles valeurs de Cq obtenues durant les essais, la concentration d'ADN d'*H. pylori* est sensiblement importante. Comme il a pu être constaté lors de l'essai n°2, cette surcharge peut potentiellement entraîner la génération d'un bruit de fond et ainsi engendrer des résultats faussement positifs dans le cas d'une PCR multiplex. Ce problème a nécessité de diluer l'éluat, mais il est peu envisageable de réaliser une seconde PCR avec une dilution adaptée en fonction des résultats obtenues avec une PCR initiale. Malgré tout, on peut aisément affirmer que la quantité d'*Helicobacter pylori* présente dans une biopsie gastrique est bien moins importante qu'à partir d'UFCs cultivées. L'intérêt de déterminer la concentration en ADN des bactéries extraites permettrait de la comparer avec la concentration d'ADN d'*H. pylori* présente dans une biopsie gastrique.

Une procédure de validation de méthode est maintenant à entreprendre afin de garantir une reproductibilité plus conséquente de la technique. Une étude de prospection ayant pour objectif de recueillir des échantillons de biopsies positives et négatives doit être menée pour mettre en place cette validation de méthode. La procédure de validation de méthode, résulte notamment des tests de sensibilité, de spécificité, de répétabilité et de reproductibilité sur un effectif d'au moins trente échantillons.

Concernant les essais réalisés à partir du design d'amorces et de sondes de Thermo Fisher, les résultats peuvent laisser prétendre qu'un problème de conception des deux paires d'amorces ciblant les mutations A2142G et A2143G subsiste : une présence de mutations est détectée pour les souches 1 et 2 qui sont confirmées comme sensible à la clarithromycine. Cette anomalie peut potentiellement provenir du fait que les deux mutations ciblées s'avoisinent au niveau des acides nucléiques de la séquence du gène codant l'ARNr 23S, provoquant un mésappariement des amorces à leur séquence cible. Cette hypothèse semble d'autant plus renforcée par la présence des deux mutations simultanées pour chaque souche testée, la double mutation est peu commune, la mutation A2143G est majoritaire chez *H. pylori*.

Des pistes d'amélioration concernant la conception de ces amorces et de ces sondes peuvent être envisagées avec la collaboration des fournisseurs. Dans un premier temps, il serait judicieux de réaliser une seule paire d'amorce destinée à la détection de la résistance à la clarithromycine. En effet, il paraît peu impactant, dans un cadre de diagnostic clinique, d'être en mesure d'identifier et de distinguer les deux mutations. De cette manière, il est plus facilement imaginable de réaliser un multiplexage de la PCR en assignant un fluorochrome différent pour chaque sonde, réduisant ainsi le nombre de réactions à effectuer pour un même échantillon.

Il est aussi possible de réaliser cette détection à partir d'une paire d'amorce qui permet de cibler la même séquence type sauvage dite Wild-type (WT), incluant la position des mutations A2142G et A2143G. cette alternative nécessite d'adopter une logique inversée : la détection d'une amplification à partir de cette paire d'amorce permettrait de déduire l'absence de mutation, et ainsi, la présence de mutations conférant la résistance à la clarithromycine serait déduite par l'absence d'amplification.

La mise en place d'une procédure de détection de la résistance à la lévofloxacine n'a pas pu être réalisée durant le stage, il est particulièrement complexe de récolter des

échantillons d'*Helicobacter pylori* présentant des résistances à la lévofloxacine, sous l'état de souches ou bien de biopsies gastriques. Une étude prospective sera donc réalisée par la suite afin de mener une expérimentation à partir des amorces et des sondes du fournisseur Thermofisher.

La démarche expérimentale concernant la détection d'*H.pylori* à partir d'échantillons de selles a été abandonnée. L'intérêt de cette thématique était de proposer une méthode non invasive, n'impliquant pas un acte endoscopique au préalable. Néanmoins, le recueil d'échantillons de selles est particulièrement complexe et délicat, puisque cela implique une prestation de conseil auprès des patients ayant déjà été détectés positifs à *Helicobacter pylori*, impliquant donc un rappel des patients pour leur demander un prélèvement d'échantillons de selles.

Des publications de la littérature scientifique ont pu mettre en place des procédures de tests visant à détecter *H.pylori* à partir de cette matrice. Les résultats de ces articles ne présentent pas une bonne sensibilité et une variabilité de résultats entre les répliquats d'un même échantillon. Les selles contiennent également des composés reconnus comme étant des inhibiteurs naturels de la PCR tels que les sels biliaires. De plus, il s'avère que le système digestif est potentiellement capable de dégrader et d'éliminer totalement *Helicobacter pylori*, induisant un risque de « faux-négatifs ».

Une autre raison nous a contraint à ne pas procéder à ces expérimentations : la technique immuno-chromatographique basée sur la détection d'antigènes d'*Helicobacter pylori* par anticorps monoclonaux a été recommandée en guise de méthode non invasive par la Haute Autorité de Santé (HAS). Cette méthode va ainsi être inscrite dans la nomenclature des actes à but diagnostic, bénéficiant prochainement d'un remboursement par l'assurance maladie.

Références bibliographiques

Figura, N., & Bianciardi, L. (2002). Helicobacters were discovered in Italy in 1892 : An episode of the scientific life of an eclectic pathologist, Giulio Bizzozero; in Helicobacter pioneers. Firsthand accounts from the scientists who discovered helicobacters, 1892-1982.

Warren, J. R., & Marshall, B. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* (London, England), 1(8336), 1273-1275.

Morris, A., & Nicholson, G. (1987). Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *The American Journal of Gastroenterology*, 82(3), 192-199.

Lau, P. P., DeBrunner-Vossbrinck, B., Dunn, B., Miotto, K., MacDonnell, M. T., Rollins, D. M., Pillidge, C. J., Hespell, R. B., Colwell, R. R., Sogin, M. L., & Fox, G. E. (1987). Phylogenetic diversity and position of the genus *Campylobacter*. *Systematic and Applied Microbiology*, 9, 231-238. [https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(87\)80027-9](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(87)80027-9)

Romaniuk, P. J., Zoltowska, B., Trust, T. J., Lane, D. J., Olsen, G. J., Pace, N. R., & Stahl, D. A. (1987). *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. *Journal of Bacteriology*, 169(5), 2137-2141. <https://doi.org/10.1128/jb.169.5.2137-2141.1987>

Thompson, L. M., Smibert, R. M., Johnson, J. L., & Krieg, N. R. Y. 1988. (s. d.). Phylogenetic Study of the Genus *Campylobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(2), 190-200. <https://doi.org/10.1099/00207713-38-2-190>

García, A., Salas-Jara, M. J., Herrera, C., & González, C. (2014). Biofilm and *Helicobacter pylori* : From environment to human host. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(19), 5632-5638. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5632>

Roberts, S. E., Morrison-Rees, S., Samuel, D. G., Thorne, K., Akbari, A., & Williams, J. G. (2016). Review article : The prevalence of *Helicobacter pylori* and the incidence of gastric cancer across Europe. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 43(3), 334-345. <https://doi.org/10.1111/apt.13474>

- Breckan, R. K., Paulssen, E. J., Asfeldt, A. M., Kvamme, J.-M., Straume, B., & Florholmen, J. (2016). The All-Age Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection and Potential Transmission Routes. A Population-Based Study. *Helicobacter*, 21(6), 586-595. <https://doi.org/10.1111/hel.12316>
- Spohn, G., & Scarlato, V. (2001). Motility, Chemotaxis, and Flagella. In H. L. Mobley, G. L. Mendz, & S. L. Hazell (Éds.), *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2423/>
- Andersen, L. P. (2007). Colonization and infection by *Helicobacter pylori* in humans. *Helicobacter*, 12 Suppl 2, 12-15. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00574.x>
- Lee, H. W., Choe, Y. H., Kim, D. K., Jung, S. Y., & Lee, N. G. (2004). Proteomic analysis of a ferric uptake regulator mutant of *Helicobacter pylori*: Regulation of *Helicobacter pylori* gene expression by ferric uptake regulator and iron. *PROTEOMICS*, 4(7), 2014-2027. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300740>
- Burucoa, C., & Axon, A. (2017). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 22(S1), e12403. <https://doi.org/10.1111/hel.12403>
- Alm, R. A., & Trust, T. J. (1999). Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: The tale of two genomes. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 77(12), 834-846. <https://doi.org/10.1007/s001099900067>
- Azevedo, N. F., Almeida, C., Cerqueira, L., Dias, S., Keevil, C. W., & Vieira, M. J. (2007). Coccoid Form of *Helicobacter pylori* as a Morphological Manifestation of Cell Adaptation to the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3423-3427. <https://doi.org/10.1128/AEM.00047-07>
- Saito, N., Konishi, K., Sato, F., Kato, M., Takeda, H., Sugiyama, T., & Asaka, M. (2003). Plural Transformation-Processes from Spiral to Coccoid *Helicobacter pylori* and its Viability. *Journal of Infection*, 46(1), 49-55. <https://doi.org/10.1053/jinf.2002.1047>
- Bui, D., Brown, H. E., Harris, R. B., & Oren, E. (2016). Serologic Evidence for Fecal–Oral Transmission of *Helicobacter pylori*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(1), 82-88. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0297>

Graham, D. Y., Adam, E., Reddy, G. T., Agarwal, J. P., Agarwal, R., Evans, D. J., Malaty, H. M., & Evans, D. G. (1991). Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. Comparison of developing and developed countries. *Digestive Diseases and Sciences*, 36(8), 1084-1088. <https://doi.org/10.1007/BF01297451>

Payão, S. L. M., & Rasmussen, L. T. (2016). *Helicobacter pylori* and its reservoirs : A correlation with the gastric infection. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 7(1), 126-132. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v7.i1.126>

Momtaz, H., Souod, N., Dabiri, H., & Sarshar, M. (2012). Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. *World Journal of Gastroenterology*, 18(17), 2105-2111. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i17.2105>

Gao, J., Li, Y., Wang, Q., Qi, C., & Zhu, S. (2011). Correlation between distribution of *Helicobacter pylori* in oral cavity and chronic stomach conditions. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban*, 31(3), 409-412. <https://doi.org/10.1007/s11596-011-0391-6>

Bharath, T. S., Reddy, M. S., Dhanapal, R., Raj Kumar, N. G., Neeladri Raju, P., & Saraswathi, T. (2014). Molecular detection and corelation of *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric biopsies of dyspeptic patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, 18(1), 19-24. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.131885>

Mamishi, S., Eshaghi, H., Mahmoudi, S., Bahador, A., Hosseinpour Sadeghi, R., Najafi, M., Farahmand, F., Khodadad, A., & Pourakbari, B. (2016). Intrafamilial transmission of *Helicobacter pylori* : Genotyping of faecal samples. *British Journal of Biomedical Science*, 73(1), 38-43. <https://doi.org/10.1080/09674845.2016.1150666>

Klein, P. D., Graham, D. Y., Gaillour, A., Opekun, A. R., & Smith, E. O. (1991). Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Gastrointestinal Physiology Working Group. Lancet (London, England)*, 337(8756), 1503-1506. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)93196-g](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)93196-g)

Azevedo, N. f., Pacheco, A. p., Keevil, C. w., & Vieira, M. j. (2006). Adhesion of water stressed *Helicobacter pylori* to abiotic surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 718-724. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03029.x>

- Bellack, N. R., Koehoorn, M. W., Macnab, Y. C., & Morshed, M. G. (2006). A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission : A review of the evidence. *Epidemiology and Infection*, 134(3), 439-449. <https://doi.org/10.1017/S0950268806006005>
- Yang, J.-C., Lu, C.-W., & Lin, C.-J. (2014). Treatment of *Helicobacter pylori* infection : Current status and future concepts. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(18), 5283-5293. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5283>
- Lamarque D, Burucoa C, Courillon-Mallet A, de Korwin JD, Delchier JC, Fauchere JL, Kalach N, Labigne A, Lehours P, Megraud F, Raymond J. Revision des recommandations françaises sur la prise en charge de l'infection par *Helicobacter pylori*. *Hepato Gastro* 2012 ; 19 : 475-502. doi : 10.1684/hpg.2012.0761
- Gisbert, J. P., de la Morena, F., & Abaira, V. (2006). Accuracy of monoclonal stool antigen test for the diagnosis of *H. pylori* infection : A systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 101(8), 1921-1930. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00668.x>
- Mentis, A., Lehours, P., & Mégraud, F. (2015). Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 20(S1), 1-7. <https://doi.org/10.1111/hel.12250>
- Ferwana, M., Abdulmajeed, I., Alhajiahmed, A., Madani, W., Firwana, B., Hasan, R., Altayar, O., Limburg, P. J., Murad, M. H., & Knawy, B. (2015). Accuracy of urea breath test in *Helicobacter pylori* infection : Meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 21(4), 1305-1314. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i4.1305>
- Perna, F., Ricci, C., Gatta, L., Bernabucci, V., Cavina, M., Miglioli, M., & Vaira, D. (2005). Diagnostic accuracy of a new rapid urease test (Pronto Dry), before and after treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Minerva Gastroenterologica E Dietologica*, 51(3), 247-254.
- Mégraud, F., Alix, C., Charron, P., Bénéjat, L., Ducournau, A., Bessède, E., & Lehours, P. (2021). Survey of the antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in France in 2018 and evolution during the previous 5 years. *Helicobacter*, 26(1), e12767. <https://doi.org/10.1111/hel.12767>
- Megraud, F., Coenen, S., Versporten, A., Kist, M., Lopez-Brea, M., Hirschl, A. M., Andersen, L. P., Goossens, H., Glupczynski, Y., & Participants, on behalf of the S. G. (2013). *Helicobacter*

pylori resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*, 62(1), 34-42. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302254>

Fischbach, L., & Evans, E. L. (2007). Meta-analysis : The effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(3), 343-357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03386.x>

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D., Hunt, R., Rokkas, T., Vakil, N., & Kuipers, E. J. (2007). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection : The Maastricht III Consensus Report. *Gut*, 56(6), 772-781. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.101634>

Francesco, V. D., Zullo, A., Hassan, C., Giorgio, F., Rosania, R., & Ierardi, E. (2011). Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance : An updated appraisal. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 2(3), 35-41. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v2.i3.35>

Mégraud, F. (2004). H pylori antibiotic resistance : Prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*, 53(9), 1374-1384. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.022111>

Wang, L.-H., Cheng, H., Hu, F.-L., & Li, J. (2010). Distribution of gyrA mutations in fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* strains. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 16(18), 2272-2277. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2272>

Glocker, E., & Kist, M. (2004). Rapid Detection of Point Mutations in the gyrA Gene of *Helicobacter pylori* Conferring Resistance to Ciprofloxacin by a Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Real-Time PCR Approach. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2241-2246. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2241-2246.2004>

Tankovic, J., Lascols, C., Sculo, Q., Petit, J.-C., & Soussy, C.-J. (2003). Single and double mutations in gyrA but not in gyrB are associated with low- and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(12), 3942-3944. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3942-3944.2003>

Binmaeil, H., Hanafiah, A., Mohamed Rose, I., & Raja Ali, R. A. (2021). Development and Validation of Multiplex Quantitative PCR Assay for Detection of *Helicobacter pylori* and

Mutations Conferring Resistance to Clarithromycin and Levofloxacin in Gastric Biopsy.
Infection and Drug Resistance, 14, 4129-4145. <https://doi.org/10.2147/IDR.S325056>

Références sitographiques

SPF. (s. d.). Épidémiologie de l'infection à *Helicobacter pylori* en France en 2020 : Données de surveillance du CNR Campylobacters et Hélicobacters. Disponible à l'adresse : <https://www.santepubliquefrance.fr/import/epidemiologie-de-l-infection-a-helicobacter-pylori-en-france-en-2020-donnees-de-surveillance-du-cnr-campylobacters-et-helicobacters>

Infection par *Helicobacter pylori* chez l'adulte : La HAS précise les actes de diagnostic et les modalités de traitement. (s. d.). Haute Autorité de Santé. Disponible à l'adresse : https://www.has-sante.fr/jcms/c_2775406/fr/infection-par-helicobacter-pylori-chez-l-adulte-la-has-precise-les-actes-de-diagnostic-et-les-modalites-de-traitement

Hélicobacters | Centre National de Référence des Campylobacters et Hélicobacters. (s. d.). Disponible à l'adresse :

<https://www.cnrch.fr/le-centre-national-de-referance-des-campylobacters-et-helicobacters/helicobacters/>

Informations sur *Helicobacter pylori*. (s. d.). Helicobacter. Disponible à l'adresse : <http://www.helicobacter.fr/informations-sur-helicobacter-pylori/>

TaqPath™ BactoPure™ Microbial Detection Master Mix. (s. d.). Disponible à l'adresse : <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A52699>

RIDA®GENE *Helicobacter pylori* (en). (s. d.). Clinical Diagnostics. Disponible à l'adresse : <https://clinical.r-biopharm.com/products/ridagene-helicobacter-pylori/>

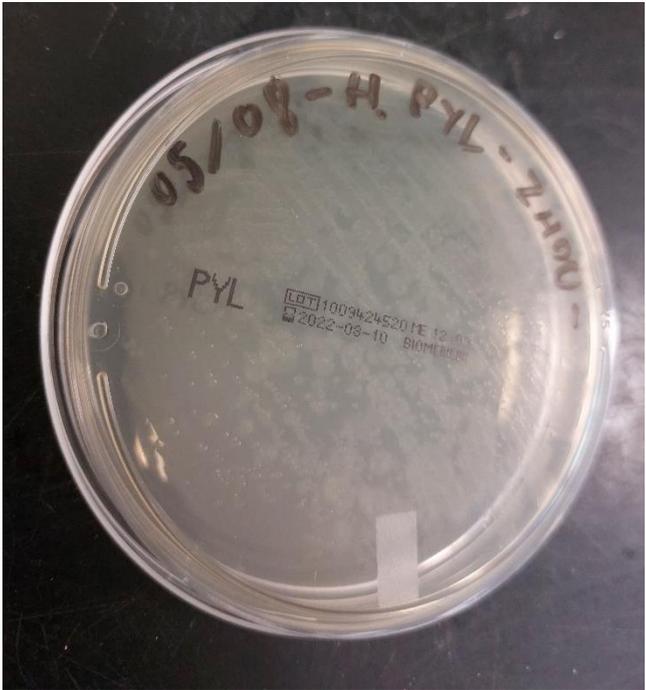
QIAamp DNA Accessory Set, Micro and Mini Kits—QIAGEN. (s. d.). Disponible à l'adresse : <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-kits/>

Annexes

Annexe 1 : Composition du milieu Columbia utilisé pour la mise en culture d'*Helicobacter pylori* avant repiquage sur milieu Pylori de BioMérieux.

Composants	Quantité en gramme/litre
Digestion pancréatique de caséine	12,0g/L
Extrait de levure	3,0g/L
Fécule de maïs	1,0g/L
Gélose	13,5g/L
Digestion peptique de tissu animal	5,0g/L
Extrait de bœuf	5,0g/L
Chlorure de sodium	5,0g/L
+ 10% de sang de mouton	
pH final : 7,3 +/- 0,2	

Annexe 2 : Souches d'*Helicobacter pylori* en culture sur un milieu spécifique Pylori de BioMérieux.



Annexe 3 : Design d'amorces et de sondes conçues par Tib-Molbiol, basé sur une coloration SYBR-GREEN I dans le cadre de la détection d'*H. pylori* et des mutations conférant des résistances à la lévofloxacine.

	H pylori lévofloxacine		CP000241	Tm
GyrHPfor	AATTAaggCCTTACTTCCAAAgTCgCTTACA	S	719921-950	64,5°C
CP000241	AATTAaggCCTTACTTCCAAAgTCgCTTATA	S	719921-950	
GyrHPrev	TCTTCACTCgCCTTAgTCATTCTggC	A	720158-133	63,5°C
gyrA_F	gTATTTTgTATgCgATgCATgAA	S	719900-922	54,7°C
gyrA_S	CgTgggTgATgTgATTggTAA	S	719967-987	57,0°C
gyrA_A	gCCATCAATAgAgCCAAAgTT	A	720102-082	54,7°C
gyrA_R	ggCACAAAATCAATggTgTCT	A	720200-180	55,9°C
anc probe 87*	AAAAATCTTgCgCCATTCTCACTAgCgC--FL	A	720049-022	68,4°C
mut probe 87*	LC-ATAAACgCgTTATCgCCA--p	A	720018-000	55,8°C
probe 87 [A]	LC-ATAAACgCATTATCgCCA-p	A	720018-000	54,5°C
probe 87 [C]	LC-ATAAACgCATTATCgCCA--p	A	720018-000	56,4°C
anc probe 91*	AAAAATCTTgCgCCATTCTCACTAgCg--FL	A	720049-023	66,1°C
mut probe 91*	LC-ACATAAACgCATTATCgCCA--p	A	720021-000	59,8°C
probe 91 [T]	LC-ATCATAAACgCATTATCgCCA--p	A	720021-000	58,6°C

Annexe 4 : Protocole d'extraction du kit QIAamp DNA Mini kit de Qiagen.

1. Cut tissue (≤ 25 mg) into small pieces and place in a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 180 μ l Buffer ATL and 20 μ l Proteinase K, mix by vortexing and incubate at 56°C until completely lysed (1–3 h). Vortex occasionally during incubation.
2. Add 200 μ l Buffer AL. Mix thoroughly by vortexing for 15 s.
3. Incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the lid.
4. Add 200 μ l ethanol (96–100%). Vortex for 15 s. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the lid.
5. Pipet the mixture onto the QIAamp Mini spin column (in a 2 ml collection tube). Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Discard the flow-through and collection tube.
6. Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube and add 500 μ l Buffer AW1. Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Discard the flow-through and collection tube.
7. Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube and add 500 μ l Buffer AW2. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min. Discard the flow-through and collection tube.
8. **Recommended:** Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and centrifuge at full speed for 1 min. This eliminates the chance of possible Buffer AW2 carryover.
9. Place the QIAamp Mini spin column in a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), add 200 μ l Buffer AE or distilled water and incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min to elute the DNA.
10. **Optional:** Repeat step 10 for increased DNA yield with a further 200 μ l Buffer AE or distilled water.

Annexe 5 : Protocole d'amplification du TaqPath™ BactoPure™ Microbial Detection Master

Mix.



Prepare qPCR optical reaction plates

- Mix the master mix well, then combine the components shown in the table in the order listed.
- Apply the optical adhesive film to seal the plate.
- Turn the plate upside down, then shake the plate vigorously three times.
- Turn the plate upright, then shake the plate vigorously three more times.
- Repeat steps 7 and 8 two more times.
- Spin down the plate at $\geq 1,500 \times g$ for 1 minute.

Component	Final concentration	Volume per reaction	Volume per reaction with 10% overage [‡]
TaqPath BactoPure Microbial Detection Master Mix (2X)	1X	5–25 μL	5.5–27.5 μL
Decontaminated assay (20X) [§]	1X	0.50–2.5 μL	0.55–2.75 μL
Template	>2 copies/ μL	Variable	Variable
RT-PCR grade water	—	Fill to 10–50 μL	Fill to 11–55 μL
Total	—	10–50 μL	11–55 μL

[‡] After calculating the number of reactions required, prepare qPCR mix for the appropriate number of reactions and scale those components by 10% for overage. We recommend preparing at least two replicates for each sample, including negative and positive controls.

[§] If the starting concentration of your decontaminated assay is not 20X, adjust the volume of assay and water as needed to achieve a final concentration of 1X.

Annexe 6 : Valeurs de cycle de seuil (Cq) pour chacune des 5 souches et leurs 3 répétitions de l'essai n°1.

Valeurs de Cq	Souche 1 (sensible à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	15,516	13,723	/	14,6195	/
ClariR	/	/	/	/	/
ICD	/	/	/	/	/

Valeurs de Cq	Souche 2 (sensible à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	20.165	/	/	/	/
ClariR	/	/	/	/	/
ICD	/	/	/	/	/

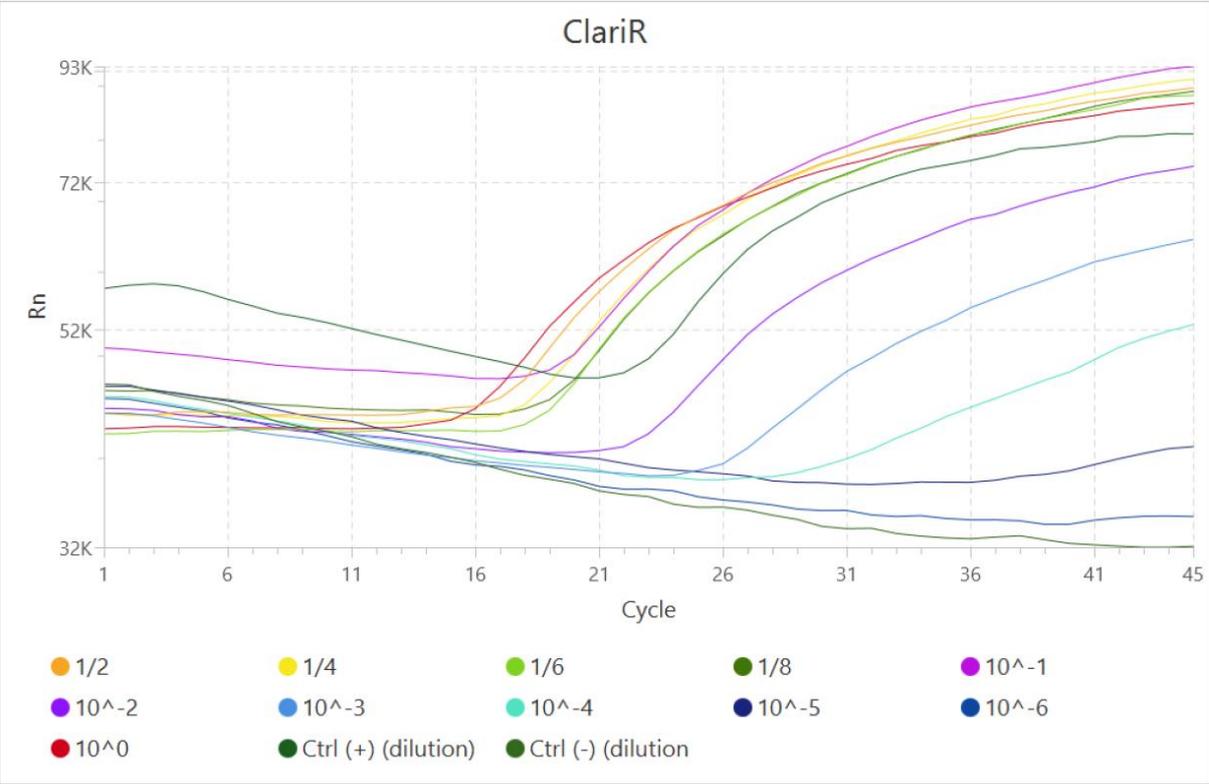
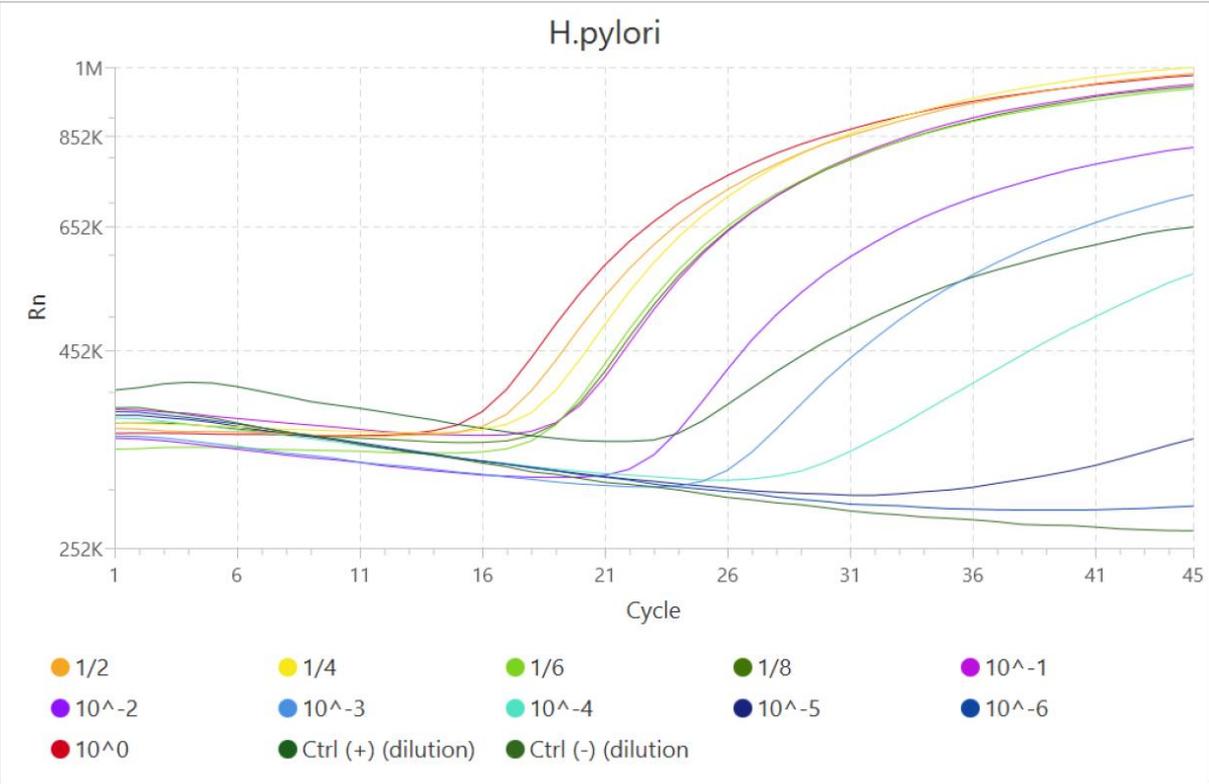
Valeurs de Cq	Souche 3 (résistante à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	/	/	/	/	/
ClariR	13.381	/	/	/	/
ICD	/	/	/	/	/

Valeurs de Cq	Souche 4 (résistante à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	/	/	/	/	/
ClariR	/	/	/	/	/
ICD	/	/	/	/	/

Valeurs de Cq	Souche 5 (résistante à la clarithromycine)				
	Répétitions			Moyenne	Ecart type
H.pylori	/	/	/	/	/
ClariR	/	/	/	/	/
ICD	/	/	/	/	/

	Contrôle positif		Contrôle négatif	
H.pylori	/	/	/	/
ClariR	/	/	/	/
ICD	/	/	/	/

Annexe 7 : Représentation graphique de l'amplification du contrôle interne d'ADN (ICD) de l'essai n°4 des dilutions par PCR en temps réel.



Annexe 8 : Valeurs de cycle de seuil (Cq) pour chacune des 5 souches et leurs 3 répétitions de l'essai n°5 des biopsies gastriques négatives.

Well	Sample	Target	Task	Cq	Cq Confidence	Amp Score	Amp Status	Cq Threshold	Baseline Start/End
A1	Souche 1.1	ClariR	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
A1	Souche 1.1	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
A1	Souche 1.1	ICD	Unknown	13.975	0.02	1.987	AMP	293.266	3-16
A2	Souche 2.1	ClariR	Unknown	Undetermined	-	1.366	NO_AMP	0.04	3-44
A2	Souche 2.1	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
A2	Souche 2.1	ICD	Unknown	16.404	0.052	1.967	AMP	293.266	3-16
A3	Souche 3.1	ClariR	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
A3	Souche 3.1	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
A3	Souche 3.1	ICD	Unknown	21.978	0.945	1.958	AMP	293.266	3-18
A4	Souche 4.1	ClariR	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
A4	Souche 4.1	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
A4	Souche 4.1	ICD	Unknown	20.966	0.624	1.93	AMP	293.266	3-18
A5	Souche 5.1	ClariR	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
A5	Souche 5.1	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	1.172	NO_AMP	0.04	3-44
A5	Souche 5.1	ICD	Unknown	20.677	0.69	1.981	AMP	293.266	3-19
B1	Souche 1.2	ClariR	Unknown	Undetermined	-	1.244	NO_AMP	0.04	3-44
B1	Souche 1.2	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
B1	Souche 1.2	ICD	Unknown	21.973	0.751	1.821	AMP	293.266	3-20
B2	Souche 2.2	ClariR	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
B2	Souche 2.2	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
B2	Souche 2.2	ICD	Unknown	18.632	0.211	1.862	AMP	293.266	3-17
B3	Souche 3.2	ClariR	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
B3	Souche 3.2	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
B3	Souche 3.2	ICD	Unknown	17.951	0.134	1.862	AMP	293.266	3-15
B4	Souche 4.2	ClariR	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
B4	Souche 4.2	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
B4	Souche 4.2	ICD	Unknown	18.574	0.16	1.879	AMP	293.266	3-16
B5	Souche 5.2	ClariR	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
B5	Souche 5.2	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
B5	Souche 5.2	ICD	Unknown	19.014	0.323	1.755	AMP	293.266	3-16

Well	Sample	Target	Task	Cq	Cq Confidence	Amp Score	Amp Status	Cq Threshold	Baseline Start/End
B7	Contrôle positif	ClariR	Positive Control	21.62	0.523	1.901	AMP	0.04	3-18
B7	Contrôle positif	H.pylori	Positive Control	23.597	0.371	2.232	AMP	0.04	3-21
B7	Contrôle positif	ICD	Positive Control	Undetermined	-	-	NO_AMP	293.266	3-44
C1	Souche 1.3	ClariR	Unknown	12.115	0.122	-	Inconclusive	0.04	3-9
C1	Souche 1.3	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
C1	Souche 1.3	ICD	Unknown	21.453	0.587	1.766	AMP	293.266	3-20
C2	Souche 2.3	ClariR	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
C2	Souche 2.3	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
C2	Souche 2.3	ICD	Unknown	19.123	0.221	1.756	Inconclusive	293.266	3-18
C3	Souche 3.3	ClariR	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
C3	Souche 3.3	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
C3	Souche 3.3	ICD	Unknown	22.181	0.6	1.659	AMP	293.266	3-20
C4	Souche 4.3	ClariR	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
C4	Souche 4.3	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
C4	Souche 4.3	ICD	Unknown	21.822	0.683	1.815	AMP	293.266	3-20
C5	Souche 5.3	ClariR	Unknown	Undetermined	-	1.265	NO_AMP	0.04	3-44
C5	Souche 5.3	H.pylori	Unknown	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
C5	Souche 5.3	ICD	Unknown	19.241	0.306	1.793	AMP	293.266	3-16
C7	Contrôle négatif	ClariR	Negative Control	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
C7	Contrôle négatif	H.pylori	Negative Control	Undetermined	-	-	NO_AMP	0.04	3-44
C7	Contrôle négatif	ICD	Negative Control	21.847	0.756	1.784	AMP	293.266	3-19

Résumé

Helicobacter pylori est une bactérie spiralée à gram-négatif, micro-aérophile, présente principalement dans le mucus gastrique de l'estomac chez l'homme. Elle est la cause de nombreuses pathologies, de l'ulcère gastrique jusqu'au développement du cancer de l'estomac. La bactérie présente de nombreuses résistances aux antibiotiques, dont la clarithromycine et la lévofloxacine. Ces résistances induisent une diminution de la réussite des traitements thérapeutiques pour l'éradication d'*Helicobacter pylori*.

Le but de ce stage a été de réaliser des essais de mise en place d'une méthode de détection d'*Helicobacter* et de sa résistance à la clarithromycine, par PCR en temps réel.

Des essais expérimentaux sur des souches ont permis de présenter des résultats favorables de détection avec l'utilisation du kit RIDAGENE *H.pylori* + ClariR. D'autres essais sont à poursuivre afin de proposer une détection à d'autres antibiotiques tels que la lévofloxacine et la métronidazole.

Mots-clés : *Helicobacter pylori*, pathogène de l'estomac, PCR en temps réel, résistance à la clarithromycine

Abstract

Helicobacter pylori is a gram-negative, micro-aerophilic, spiral-shaped bacterium found mainly in the gastric mucus of the human stomach. It is the cause of many pathologies, from gastric ulcers to the development of stomach cancer. The bacterium is resistant to many antibiotics, including clarithromycin and levofloxacin. These resistances lead to a decrease in the success of therapeutic treatments for the eradication of *Helicobacter pylori*.

The aim of this internship was to carry out tests to set up a method of detection of *Helicobacter* and its resistance to clarithromycin by PCR in real time.

Experimental trials on strains have shown favorable detection results with the use of the RIDAGENE *H.pylori* + ClariR kit. Other trials are to be continued in order to suggest detection with other antibiotics such as levofloxacin and metronidazole.

Keywords : *Helicobacter pylori*, stomach pathogen, real-time PCR, clarithromycin resistance