

UTILISATION DE LA PCR POUR LE DIAGNOSTIC DE L'HELICOBACTERIOSE CHEZ LES CHIENS ATTEINTS DE TROUBLES DIGESTIFS CHRONIQUES (OCTOBRE 1998 – JUIN 1999)

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Marie, Catherine DUBESSET épouse DUMAS
Née, le 4 décembre 1974 à AMIENS (Somme)

Directeur de thèse : **M. le Docteur Olivier DOSSIN**

JURY

PRESIDENT :

M. Jean-Pierre VINEL

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

M. Olivier DOSSIN

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Corine BOUCRAUT-BARALON

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

| | | |
|-----------------------------|------|-------------------------|
| Directeur par intérim | : M. | G. BONNES |
| Directeurs honoraires..... | : M. | R. FLORIO |
| | M. | R. LAUTIE |
| | M. | J. FERNEY |
| | M. | G. VAN HAVERBEKE |
| Professeurs honoraires..... | : M. | A. BRIZARD |
| | M. | L. FALIU |
| | M. | C. LABIE |
| | M. | C. PAVAU |
| | M. | F. LESCURE |
| | M. | A. RICO |

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **CABANIE Paul**, Histologie, Anatomie pathologique
- M. **CAZIEUX André, (sur nombre)** Pathologie chirurgicale
- M. **DORCHIES Philippe**, Parasitologie et Maladies Parasitaires
- M. **GUELFY Jean-François**, Pathologie médicale des Equidés et Carnivores

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, Pathologie chirurgicale
- M. **BENARD Patrick**, Physique et Chimie biologiques et médicales
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, Physique et Chimie biologiques et médicales
- M. **CHANTAL Jean**, Pathologie infectieuse
- M. **DARRE Roland**, Productions animales
- M. **DELVERDIER Maxence**, Histologie, Anatomie pathologique
- M. **EECKHOUTTE Michel**, Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale
- M. **EUZEBY Jean**, Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie
- M. **FRANC Michel**, Parasitologie et Maladies Parasitaires
- M. **GRIESS Daniel**, Alimentation
- M. **MILON Alain**, Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie
- M. **PETIT Claude**, Pharmacie et Toxicologie
- M. **REGNIER Alain**, Physiopathologie oculaire
- M. **SAUTET Jean**, Anatomie
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, Physiologie et Thérapeutique

PROFESSEURS 2^o CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine-Animale
- M. **BERTHELOT Xavier**, Pathologie de la Reproduction
- M. **CORPET Denis**, Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, Parasitologie et Maladies parasitaires
- M. **ENJALBERT Francis**, Alimentation
- M. **LIGNEREUX Yves**, Anatomie
- M. **MARTINEAU Guy**, Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour
- M. **PICAVET Dominique**, Pathologie infectieuse
- M. **SCHELCHER François**, Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour

PROFESSEUR CERTIFIE DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES 1^{ère} CLASSE

- M. **ASIMUS Erick**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS- BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **GAYRARD Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **HAY Magali**, *Zootechne*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*
M. **MAREDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

A NOTRE PRESIDENT DE THESE :

Mr le Professeur Vinel,

Hépatogastro-entérologie,

Faculté de Médecine Toulouse Purpan.

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

A NOTRE JURY DE THESE,

Dr Olivier DOSSIN, maître de conférences,

Médecine Interne et Gastro-entérologie du chien et du chat.

Ecole Nationale vétérinaire de Toulouse.

Pour m'avoir transmis son intérêt pour la gastro-entérologie durant mon année d'assistantat,

Pour m'avoir offert la possibilité de pratiquer l'endoscopie digestive des carnivores domestiques,

Pour ce sujet de thèse qui m'a passionné,

Et enfin, pour toute l'aide et l'implication qu'il a montré pour ce travail.

Mille mercis et amitiés sincères.

Dr Corine BOUCRAUT-BARALON, maître de conférences,

Biologie moléculaire,

Ecole Nationale vétérinaire de Toulouse.

Pour sa patience à me former aux techniques de PCR pour lesquelles je ne présentais pas de dispositions particulières !,

Pour le temps qu'elle a consacré à rendre ce travail de qualité,

Pour sa disponibilité constante et sa gentillesse à mon égard,

Pour le congé de maternité que j'ai compromis !.

Profonde reconnaissance.

A Maxence Delverdier, Pr d'anatomopathologie de l'ENVT, pour sa précieuse contribution à ce travail et pour le temps qu'il y a consacré. Merci pour votre gentillesse.

Au service de médecine de l'ENVT, au sein duquel j'ai passé deux années enrichissantes tant sur le plan professionnel que personnel. J'y ai appris la rigueur dans le travail, et connu des expériences humaines inoubliables.

A tous mes amis rencontrés à l'école vétérinaire, avec lesquels j'ai passé six années toulousaines pleines de joies, et d'épreuves parfois...mais qui me laisseront des souvenirs exceptionnels. Merci pour l'amitié profonde et durable qu'ils m'ont accordée.

A mes amis d'enfance, que j'ai négligés durant mes années étudiantes. Vous étiez dans mon cœur ! J'espère m'être rattrapée depuis.

A toute ma famille qui a patienté jusqu'à ce jour de soutenance, y voyant depuis longtemps l'occasion de se réunir et de faire la fête ! Merci pour l'amour dont vous m'avez toujours entouré.

A la famille Dumas, pour la gentillesse avec laquelle vous m'avez accueillie, et pour les liens qui se tissent entre nous davantage chaque jour.

A mes parents qui ont toujours cru en moi et sans qui je ne serais jamais allée au bout de mon rêve : être vétérinaire. Cette thèse est pour vous. Le reste, vous le savez déjà !

A mon mari, qui aura passé de nombreuses heures à mes côtés pour ce travail, et qui se réjouit que ce soit fini ! Nous pouvons désormais nous concentrer sur l'avenir, et sur notre prochain heureux événement ! Je t'aime.

A notre ménagerie : à ceux qui ont partagé notre vie et à ceux qui viendront. Ils sont notre équilibre et indispensables à notre bonheur.

**Utilisation de la PCR pour le diagnostic de l'hélicobactériose chez
les chiens atteints de troubles digestifs chroniques
(Octobre 1998 à juin 1999).**

SOMMAIRE

INTRODUCTION :

1. LES HELICOBACTERIES :

- 1.1. Découverte
- 1.2. Le genre *Helicobacter*
- 1.3. Les différentes espèces et leurs caractéristiques

2. SYNTHESE DES CONNAISSANCES ACTUELLES:

- 2.1. Prévalence
- 2.2. L'expression clinique de l'infection
- 2.3. Les différents tests diagnostiques
- 2.4. Le pouvoir pathogène des hélicobactéries
- 2.5. Les lésions associées à l'infection
- 2.6. Le traitement
- 2.7. Le mode de contamination :répercussions sur la santé publique

3. EXPERIMENTATION :

- 3.1. But
- 3.2. Matériel et méthode
- 3.3. Résultats

4. DISCUSSION :

- 4.1. Les différentes possibilités diagnostiques
- 4.2. Les données manquantes dans notre expérimentation
- 4.3. Les actualités sur les hélicobactéries

CONCLUSION :

ANNEXES :

Annexe 1
CD Rom

INTRODUCTION :

Des bactéries spiralées furent décrites pour la première fois dans l'estomac de l'Homme par Bottcher en 1874. C'est à la fin du XIXe siècle que de telles bactéries sont également mises en évidence chez les animaux. En 1896, Salomon trouve des organismes spiralés dans les estomacs de chiens, de chats et de rats. Ces bactéries furent nommées tour à tour *Spirella*, Spirochètes, *Campylobacter*-like organisms, puis *Gastrospirillum hominis* like organisms (*GHLO's*), en rapport avec celles présentes chez l'Homme.

Il fallut attendre 1988 et les travaux de Lee et coll. pour commencer à les étudier de manière plus approfondie chez les carnivores domestiques (50, 51).

Aujourd'hui, le rôle des hélicobactéries gastriques est clairement établi dans la genèse des gastropathies inflammatoires humaines, d'où l'intérêt porté aux modèles animaux.

Le but de l'étude réalisée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse sera en premier lieu de mettre au point une technique de PCR pour la détection des hélicobactéries sur les biopsies gastriques de chien ou de chats. Une fois la technique mise au point, elle sera comparée aux autres méthodes de détection dont nous disposons au service de médecine : l'histologie et le test à l'uréase. La comparaison avec d'autres tests pratiqués classiquement dans le secteur hospitalier humain, tel que le test à l'urée marquée expirée, moins facilement applicable aux carnivores domestiques, ne sera pas faite lors de cette étude.

1. LES HELICOBACTERIES :

1.1. DECOUVERTE :

Les diverses bactéries adaptées au tractus digestif de l'homme et des animaux sont pour la plupart de forme spiralée ou hélicoïdale ; celles découvertes dans l'estomac de l'homme dès 1874 par Bottcher furent nommées pendant longtemps « *Gastrospirillum hominis* ». Ce furent Rappin en 1881, puis Bizzozero en 1893, et Salomon en 1896 qui notèrent les premiers la présence de bactéries spiralées gastriques chez les carnivores domestiques. Ces études démontraient que l'estomac du chien, du chat et du rat, bien que très acide et traditionnellement considéré comme stérile, pouvait être colonisé de façon importante par certains types de bactéries (15, 18, 48).

Ces bactéries furent nommées « GHLO's » pour *Gastrospirillum Hominis Like Organisms*. Ce terme regroupait en fait ce qui serait identifié plus tard comme étant des bactéries du genre *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Wolinella*, *Flexispira* et *Helicobacter* (les hélicobactéries furent classées longtemps dans le genre *Campylobacter* en raison de caractéristiques morphologiques, culturelles et métaboliques).

En 1983, Marshall et Warren montrent qu'en faisant avaler à des hommes un repas contenant certaines bactéries spiralées, ceux-ci développent des symptômes cliniques identiques, des lésions endoscopiques et histologiques similaires, associés à une gastrite chronique : c'est la découverte du rôle pathogène de celles qui seront nommées *Helicobacter pylori*.

En 1988, Lee et al. parvinrent à isoler et à cultiver une bactérie spiralée de l'estomac d'un chat : elle fut nommée *Helicobacter felis* car très proche morphologiquement et nécessitant les mêmes caractéristiques culturelles que *Helicobacter pylori* (15).

1.2. LE GENRE *HELICOBACTER* :

Le genre *Helicobacter* regroupe les bactéries Gram négatives, microaérophiles, motiles, de forme spiralée à enroulée, isolées du tractus digestif de l'homme, des mammifères, et des oiseaux. On distingue les hélicobactéries gastriques de celles colonisant les autres portions du tube digestif. Elles mesurent de 5 à 15 micromètres de long et 0.3 à 1.2 micromètres de diamètre (9) : aussi la distinction entre les différentes espèces ne peut être réalisée avec exactitude en microscopie classique. Le classement entre les espèces est réalisé par séquençage de l'ARN ribosomal 16S, par hybridation d'ADN, par analyse du profil protéique en SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis), ou par microscopie électronique (44, 48, 55).

La comparaison des ARNr 16S montre que phylogénétiquement les genres *Helicobacter*, *Arcobacter* et *Campylobacter* sont très proches (Fig 1).

1.3. LES DIFFERENTES ESPECES ET LEURS CARACTERISTIQUES :

Les hélicobactéries ne poussent pas toutes dans des conditions identiques, et ont une sensibilité aux antibiotiques variable (Fig 2). Toutes les hélicobactéries gastriques sont Uréase + et Catalase + (55).

Plusieurs espèces différentes ont été isolées chez le chien et le chat ; les plus fréquemment rencontrées étant *Helicobacter felis* et *bizzozeronii*. *Helicobacter pylori* n'a jamais été isolé de façon naturelle chez le chien, alors qu'il le fut chez le chat.

Les hélicobactéries sont des bactéries à localisation préférentiellement digestive, mais pas exclusivement intestinale (Fig 3).

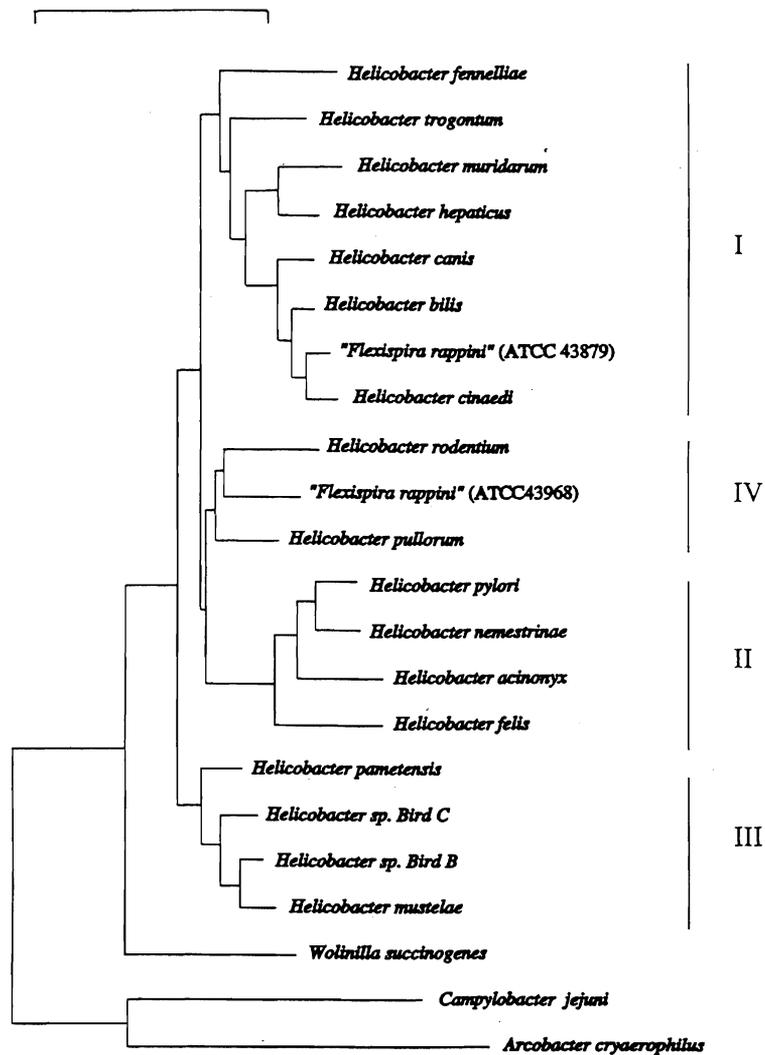


Fig.1. Arbre phylogénétique de quelques espèces d'*Helicobacter*, *Wolinella*, *Arcobacter* et *Campylobacter*, basé sur les similitudes de leurs séquences d'ARN 16S. L'échelle représente une différence de 5% de la séquence nucléotidique, déterminée en mesurant la longueur des lignes horizontales reliant deux espèces (55).

| Caractéristiques | <i>H. pylori</i> | <i>H. felis</i> | <i>H. canis</i> |
|---|------------------|-----------------|-----------------|
| Production d'oxydase | + | + | + |
| Production de catalase | + | + | - |
| Production de phosphatase alcaline | + | + | + |
| Production de gamma-glutamyl transpeptidase | + | + | - |
| Croissance à :25°C | - | - | - |
| 42°C | - | + | + |
| Pousse sur :Glycine à 1% | - | - | - |
| NaCl à 1.5% | - | + | - |
| Sensibilité antibiotiques : | | | |
| Céphalotine | S | S | I |
| Acide Nalidixique | R | R | S |
| Métronidazole | S | S | S |

Fig 2. Les caractéristiques phénotypiques de quelques *Helicobacter* (+ réaction positive, - réaction négative, S sensible, R résistant, I intermédiaire) (55).

| NOM | HOTE | ORGANE INFECTE |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>H.acinonychis</i> | Singe | Estomac |
| <i>H.bilis</i> | Souris | Intestin, foie, bile |
| <i>H.bizzozeronii</i> | Chien, chat | Estomac |
| <i>H.canis</i> | Chien | Intestin |
| <i>H.cholecystus</i> | Hamster | Vésicule biliaire |
| <i>H.cinaedi</i> | Hamster, Homme | Intestin |
| <i>H.felis</i> | Chien, chat | Estomac |
| <i>H.fennelliae</i> | Homme | Intestin |
| <i>H.heilmannii</i> | Homme, chien | Estomac |
| <i>H.hepaticus</i> | Souris | Intestin, foie |
| <i>H.muridarum</i> | Souris, rat | Intestin, estomac |
| <i>H.mustalae</i> | Furet | Estomac |
| <i>H.nemestrinae</i> | Macaque, gorille | Estomac |
| <i>H.pametensis</i> | Porc | Intestin |
| <i>H.pullorum</i> | Poulet, Homme | Foie, intestin |
| <i>H.pylori</i> | Homme, chat | Estomac |
| <i>H.rodentium</i> | Souris | Intestin |
| <i>H.salomonis</i> | Chien, chat | Estomac |
| <i>H.trogontum</i> | Rat | Intestin |
| <i>H.westmeadi</i> | Homme | Sang |
| <i>H.sp.Bird B</i> | Oiseau | Intestin |
| <i>H.sp.Bird C</i> | Oiseau | Intestin |
| <i>Flexispira rappini</i> | Souris, chien, Homme, ovin | Intestin, estomac, avortons |

Fig 3. Les hélicobactéries et leurs localisations chez leurs hôtes (9, 19, 55).

2 SYNTHÈSE DES CONNAISSANCES ACTUELLES :

2.1. PREVALENCE :

Selon les études, la prévalence de l'infection chez les carnivores domestiques est très variable ; d'anciens travaux (Salomon 1896, Weber 1958, ou Henry 1987) annonçaient déjà une prévalence proche de 100% chez le chien. De façon générale, on trouve dans la littérature des prévalences de l'ordre de 61 à 82% (moyenne 73%) chez les chiens atteints de vomissements ou autres troubles gastro-intestinaux, de 57 à 76% (moyenne 71%) chez les chats également atteints de ces troubles, de 44 à 86% (moyenne 66%) chez les chiens sains, et 41 à 100% (moyenne 77%) chez les chats sains. Quant aux animaux vivant en élevage, chenil ou laboratoire d'expérimentation, tout le monde s'accorde à dire que la prévalence des hélicobactéries dans ce type de population serait de 100% (4, 8, 22, 28, 31, 48).

Les travaux de Yamasaki (54) ont montré que dans un échantillon d'étude constitué de chiens et chats de propriétaires, la prévalence de l'infection était significativement plus élevée chez les chiens sains que chez les malades, mais pas chez les chats.

2.2. L'EXPRESSION CLINIQUE DE L'INFECTION :

Afin de montrer l'éventuelle susceptibilité des chiens à l'infection par *Helicobacter pylori*, différents chercheurs ont inoculé à des Beagles gnotobiotiques des solutions contenant *Helicobacter pylori*, isolé chez l'Homme. Si la réceptivité des chiens a été clairement établie, aucune manifestation clinique caractéristique de maladie ulcéreuse gastroduodénale comparable à ce qui est observé dans ces situations chez l'homme, n'a été mise en évidence avec certitude. Certains auteurs (37) ont cependant constaté qu'après 3 inoculations dans la même semaine de 10^9 CFU (Colony Forming Unit) d'*Helicobacter pylori* à des chiens, il se déclare dans les 7 jours une phase aiguë de troubles gastro-intestinaux comprenant une incontinence fécale ou une diarrhée, ainsi que des vomissements (chez l'Homme dont l'estomac est infecté par *Helicobacter pylori*, de telles phases aiguës sont parfois décrites associant vomissements, augmentation du péristaltisme, et selles molles).

D'autres auteurs (34) ne notent, dans des conditions d'expérimentation similaires, aucun symptôme.

En utilisant un inoculum composé d'espèces d'hélicobactéries adaptées au chien (ex :*Helicobacter felis*), même au bout de 26 semaines, aucun signe clinique n'est exprimé (44).

Aussi est-il impossible à l'heure actuelle, compte-tenu des valeurs élevées de prévalence de l'infection des espèces canines et félines par les hélicobactéries, d'être catégorique quant à une possible relation entre l'infection et l'apparition de symptômes digestifs, tant sur un mode aigu que chronique.

2.3. LES DIFFERENTS TESTS DIAGNOSTIQUES :

2.3.1 Le test Uréase :

L'uréase est une enzyme que possèdent les hélicobactéries, et dont l'activité est induite par un pH gastrique bas. Elle clive l'urée présente dans l'estomac en ammoniac et en bicarbonates, ce qui entraîne une élévation locale du pH, et crée un environnement moins acide et donc plus favorable à leur survie.

Cette propriété est utilisée pour mettre en évidence la présence des Hélicobactéries dans des prélèvements gastriques réalisés par endoscopie ou lors d'autopsies. En effet, peu de bactéries pouvant être retrouvées dans l'estomac possèdent cette enzyme en dehors de *Proteus mirabilis* ou *Pseudomonas aeruginosa*, chez les chiens coprophages ; les résultats faussement positifs étant ainsi rares (16).

Ce test est commercialisé sous forme de cupules contenant de l'urée et un indicateur coloré virant de couleur lorsque l'uréase est présente (ex : CLO testnd), mais il est également possible de réaliser l'expérience comme suit, dans des tubes à essai :

| EX 1 (37) | EX 2 (49) |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| 1ml d'urée à 10% | 0.33M d'urée |
| Eau distillée | 0.02% d'acide de sodium |
| 2 gouttes rouge phénol à 1% | 0.02%rouge phénol |
| Tampon phosphate de sodium PH=6.5 | 10 mM tampon phosphate PH=6.5 |

Les prélèvements doivent être immergés immédiatement dans la solution.

L'incubation des biopsies dure de 24 à 48 heures selon les auteurs. Les lectures de résultats (virement de couleur du jaune au rouge ou rose foncé) sont faites en général à 15min, 30min, 1H, 4H, 24H, 48H (16, 44, 49). Certains observent la réaction toutes les 20 min pendant 24H (54).

Certains auteurs recensent comme positifs tous les prélèvements dont la couleur a viré dans les 24 (49) à 48H (44), tandis que d'autres ne considèrent comme positifs que ceux ayant viré de couleur avant 2H (17) ou 3H (8). Il est supposé que la vitesse de réaction soit directement corrélée à la quantité de bactéries sur l'échantillon (34).

La sensibilité de ce test est comprise entre 70 et 90%. Selon Happonen (16) la sensibilité du test à 30min est respectivement pour le chat et le chien de 94% et 85.7%, et augmente quand la lecture est effectuée après 60min à 100% et 87.5%. Il semblerait nécessaire d'avoir au

moins 10^4 bactéries dans la biopsie pour observer une réaction colorée (20). D'autre part, la localisation du site de prélèvement dans l'estomac fait beaucoup varier ce pourcentage : en effet, le corps et le fundus (Fig 4) seraient les zones les plus intensément colonisées, le cardia et l'antra pylorique l'étant nettement moins (24, 44,48). D'où la possibilité de faux négatifs lorsque la biopsie est réalisée dans l'antra si l'infestation est globalement légère (16).

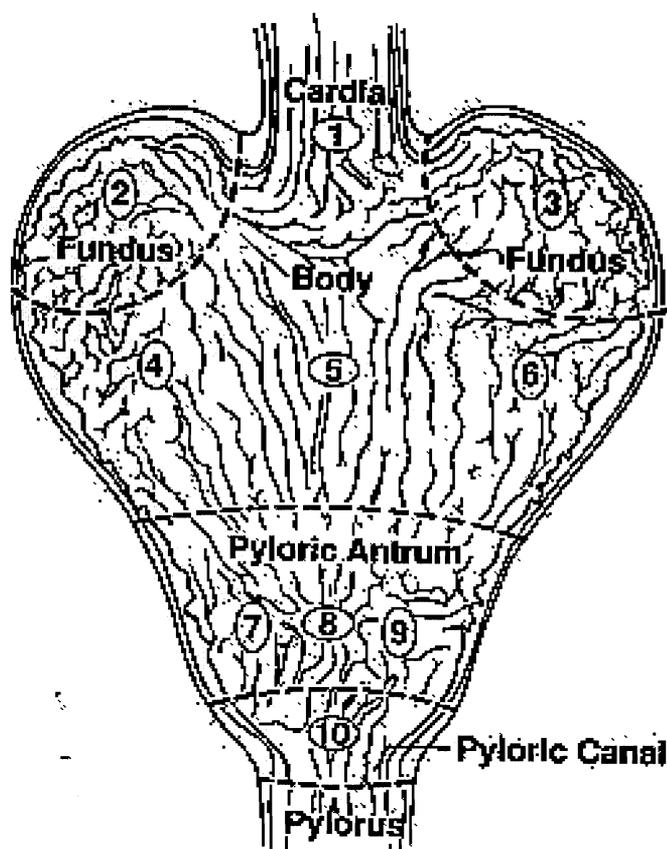


Fig.5. Schéma des sites de prélèvement des biopsies gastriques pour le test à l'Uréase, sur un estomac de chien ouvert (24).

Exemple de prévalence de l'infection par cette méthode (d'après (16)):

| | CHIENS | CHATS |
|---------------|---------------|--------------|
| Antre | 62% | 91.5% |
| Corps | 100% | 100% |
| Fundus | 95% | 87.5% |

Simpson (44) constate que la vitesse de réaction colorée est plus lente chez les chiens SPF infectés expérimentalement (24H en moyenne), que chez les chiens ayant une infection naturellement acquise (1 à 2H) ; ceci est contredit par l'étude de Rossi (37) dont les chiens infectés expérimentalement 1 semaine auparavant sont tous positifs en moins de 2H.

2.3.2. Breath test ^{13}C (test respiratoire à l'urée ^{13}C) :

Le principe de ce test repose sur la mise en évidence de l'activité uréasique des hélicobactéries : de l'urée marquée au carbone 13 ou 14 est administrée per os au patient, de manière à être clivée dans l'estomac par l'enzyme uréase. La réaction produit de l'ammoniac et des bicarbonates marqués par le carbone 13 ou 14, qui passent dans la circulation générale et sont ensuite exhalés en isotopes stables ($^{13}\text{CO}_2$) ou radioactifs ($^{14}\text{CO}_2$). Le CO_2 est collecté de manière à calculer le rapport $^{12}\text{CO}_2 / ^{13}\text{CO}_2$ ou $^{14}\text{CO}_2$.

Le ratio $^{12}\text{CO}_2 / ^{13}\text{CO}_2$ est le seul mesurable dans le sang. Il existe donc un test nommé $^{13}\text{CO}_2$ UBBT (pour Urea Breath and Blood Test), qui est utilisable chez l'animal également, même si la récolte du CO_2 expiré est délicate.

En pratique l'urée est administrée aux animaux par sonde intra-gastrique, puis les échantillons respiratoires exhalés sont collectés grâce à un masque à induction anesthésique ou une sonde d'intubation si l'animal nécessite d'être endormi, connectés à un ballon réservoir d'un litre. Ensuite, l'échantillon est prélevé avec une seringue par une valve d'expulsion et immédiatement placé dans des tubes (48).

Certains auteurs ont cherché à obtenir la dose d'urée marquée à faire ingérer la plus efficace, ainsi que les temps où les prélèvements doivent être effectués après l'ingestion de l'urée pour avoir un résultat fiable (4). Il ressort de ces études que la dose d'urée ingérée permettant d'avoir des résultats nettement discriminants entre les sujets sains et les infectés est de 4mg/kg. Le pic de concentration en $^{13}\text{CO}_2$ expiré survient à 60 minutes, donc les prélèvements devront être effectués à 0, 20, 40, et 60 minutes après ingestion.

Il est recommandé de faire ingérer l'urée avec un repas sensé ralentir la vidange gastrique (par exemple composé de peptones et d'huile de maïs) afin de diminuer le risque de faux négatifs liés à une vidange trop rapide (4).

L'obtention de faux positifs est possible, comme pour les autres tests reposant sur la détection de l'uréase, si d'autres bactéries possédant cette enzyme sont présentes. Les faux négatifs sont généralement rencontrés lors d'utilisation concomitante d'inhibiteurs de pompe à protons ou d'antagonistes des récepteurs H_2 , car ils diminuent l'activité de l'enzyme (30, 48). Il est recommandé d'attendre 2 à 5 jours au moins après la fin d'un traitement pour réaliser ce test.

Les résultats chez l'animal sont favorables à cette méthode : Neiger (29), dans une étude comparative des différents tests de dépistage des hélicobactéries chez le chat, a montré que les

chats reconnus positifs par au moins 2 des tests utilisés, étaient tous positifs par l'Urea Breath Test. Une seconde étude menée par Neiger (28) a comparé le test à l'uréase préalablement cité et l'Urea Breath Test sur une population de chats. Ces tests donnèrent respectivement 78% et 85% de sujets positifs, d'où une sensibilité plus importante du test à l'urée exhalée dans cette étude. Mais son intérêt réside principalement dans une détection quantitativement plus fine lorsque l'infection est légère et donc inégalement répartie.

Chez l'homme, ce test est considéré comme l'un des meilleurs pour surveiller l'éradication et la réponse au traitement contre *Helicobacter pylori*. Sa valeur prédictive négative est de 97% quand il est réalisé 6 semaines après la fin d'un traitement d'au moins 14j (4). Ceci est d'un grand intérêt puisqu'il renseigne de façon relativement précise sur la réussite d'un traitement entre 4 et 8 semaines en général après l'arrêt de celui-ci, donc bien avant la sérologie (cf. ci-dessous) (20).

2.3.3. Mise en culture des Hélicobactéries :

| Milieux de culture utilisables | Incubation | Temps de lecture | Références |
|--|--|------------------|------------|
| Fresh BHI blood agar | Microaérobie 5% d'O ₂ 10% de CO ₂ 85% de N ₂ 37°C 90% humidité | 4 jours | 15 |
| Mueller Hinton agar + Nutritient agar + sang ou sérum cheval ou boeuf | | | 15 |
| Trypticase soy agar + 5% sang mouton | | | 44 |
| Brucella PRAS agar + sang cheval ou bœuf + suppl. antibiotique de Skirrow | | | 8, 19 |
| Milieu de transport Médium (Portagerm Pylori Biomérieux) | | | 16 |

Les prélèvements gastriques doivent être effectués par endoscopie sur animaux vivants, ou lors d'autopsie sur animaux morts depuis moins d'une heure (8). Mais des mises en culture de selles (14), de salive, d'eau ou d'aliment (24, 34), peuvent aussi être réalisées.

Les colonies d'hélicobactéries sont de petite taille (<1mm de diamètre), claires, en dômes ou en fine « pelouse » translucide (8).

Les hélicobactéries de façon générale se cultivent mal; de plus certaines espèces n'ont encore jamais pu être cultivées. C'est le cas d'*Helicobacter heilmannii*, morphologiquement très proche d'*Helicobacter bizzozeronii*, mais non cultivable (2). Parmi les hélicobactéries du chien et du chat, *Helicobacter felis* est le plus facile à cultiver, et pousse de façon relativement abondante entre 4 et 7 jours. Il faut par contre entre 4 et 12 jours pour obtenir la première colonie d'*Helicobacter bizzozeronii* (19). Le comptage des colonies d'*Helicobacter felis* est difficile car elles forment souvent un film qui s'étale (24). Parfois, sur d'anciennes cultures d'*Helicobacter felis* ou d'*Helicobacter bizzozeronii*, mais aussi sur des cultures récentes d'*Helicobacter salomonis*, on peut apercevoir des formes coccoïdes comme chez les campylobactéries (15, 19).

Les cultures sont aussi utilisées après infection expérimentale d'animaux, afin de prouver la réceptivité des animaux aux différentes espèces d'*Helicobacter*, notamment à *Helicobacter pylori*; elles servent de plus à étudier dans ces conditions la répartition géographique de l'infection dans l'estomac mais également dans les autres portions du tractus digestif.

C'est ainsi qu'on sait par exemple qu'une infection expérimentale de Beagles gnotobiotiques par *Helicobacter pylori* permet de retrouver la bactérie chez tous les chiens inoculés après quelques semaines, que tout le tube digestif est atteint sauf l'iléon et le rectum, que l'estomac est le plus intensément touché et en particulier le fundus gastrique. Dans cette même étude, il n'a pas été possible de cultiver des hélicobactéries ni à partir d'échantillons de l'environnement, ni de selles des chiens, ni de l'aliment (34). D'autres chercheurs cependant ont obtenu des cultures positives à partir d'écouvillons rectaux de chiens inoculés dans les mêmes conditions, mais jamais à partir d'échantillons oro-pharyngés (37).

A l'inverse, l'infection expérimentale de Beagles gnotobiotiques par *Helicobacter felis* a montré que seul l'estomac était colonisé, à l'exception de 2 cas où les cultures duodénales étaient positives, mais jamais le reste du tractus digestif ni les fèces (24).

En pratique, les cultures ne sont pas envisageables en laboratoire clinique courant. De plus leur sensibilité diagnostique est faible (15.4 à 51%) (48). Aussi, la mise en culture n'est en général réalisée que sur des prélèvements où d'autres tests ont préalablement donné des résultats positifs, dans le but d'identifier l'espèce ou la souche selon ses caractéristiques culturales, ou par microscopie électronique, ou bien d'en déterminer la sensibilité antibiotique (20). Cette méthode ne s'avère réellement utile que pour la recherche.

2.3.4. Les colorations spécifiques des coupes histologiques :

Les hélicobactéries peuvent être mises en évidence sur des lames histologiques au moyen de différentes colorations : la plus utilisée est la coloration de Warthin-Starry. C'est une coloration argentique permettant de visualiser les bactéries spiralées en brun foncé à noir, tranchant nettement avec les tissus apparaissant jaune foncé. Certains auteurs utilisent des colorations plus classiques comme le Bleu de Toluidine (10), le Gram (23, 29, 32), le Giemsa (18), l'hémalum éosine (16, 49), le Diff Quick (44).

Les colorations de Giemsa, Gram, et Diff Quick, seraient équivalentes en sensibilité ; le Warthin-Starry restant plus efficace quand la densité est faible (48). L'hémalum éosine est la moins utilisée. Pourtant, Lecoindre ou Happonen (16, 23) affirment trouver rétrospectivement par hémalum éosine des scores de précision similaire à ceux établis par Warthin-Starry dans leurs études. De même pour Neiger (28) qui confronte Gram et Warthin-Starry.

Il n'est pas possible de faire une différenciation d'espèce par ces méthodes car l'appréciation de la taille et de la morphologie en microscopie traditionnelle est subjective.

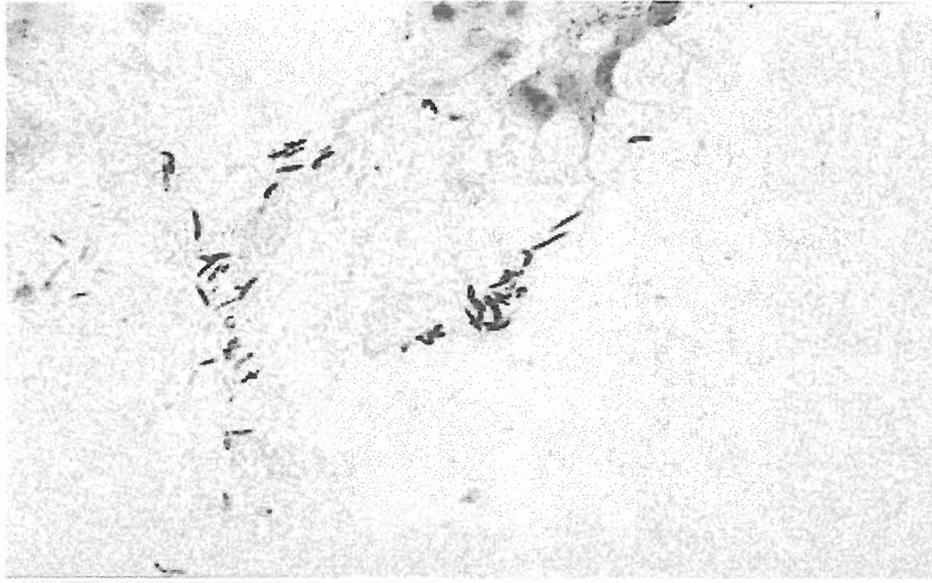
Cette technique permet en revanche d'effectuer une estimation semi-quantitative de la densité de l'infection : pour cela, un score est établi, tenant compte de la répartition et de la localisation des bactéries sur la coupe histologique étudiée. Celle-ci doit par ailleurs être de bonne qualité, c'est à dire suffisamment profonde et respectant l'architecture initiale des tissus, afin de permettre ce classement. Plusieurs classifications sont proposées dans la littérature en ce qui concerne le chien et le chat, de précision variable.

EX1 : (44, 49)

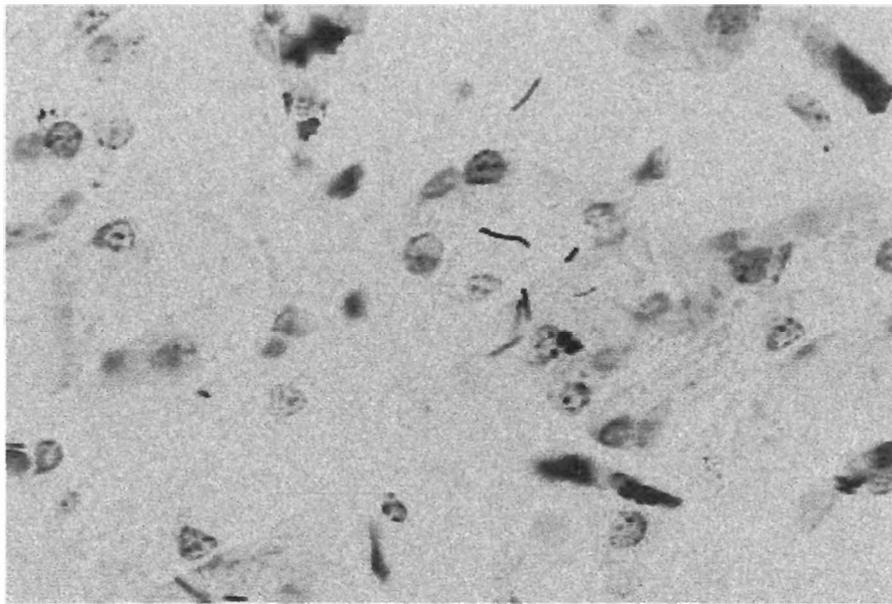
| Score | Nombre d'organismes spiralés par champ, au Gx400 | | | |
|-------|--|----------|--------|-----|
| | 0 | < ou = 1 | 1 à 10 | >10 |
| | 0 | 1 | 2 | 3 |

EX2 : (23, 32)

| Score | Nombre d'organismes spiralés par champ, au Gx1000 | | | |
|-------|---|-------|--------|--------|
| | 0 | < 5 | 5 à 20 | >20 |
| | 0 | léger | modéré | sévère |



Helicobactéries dans le mucus de surface, coloration de Warthin-Starry.



Helicobactéries dans l'épithélium gastrique, coloration de Warthin-Starry.

Cette méthode permet de renseigner sur la localisation préférentielle des hélicobactéries dans l'estomac, et le tractus digestif en général, en fonction de la sévérité de l'infection. Il a ainsi été montré que toutes les zones de l'estomac peuvent être colonisées (34); quant aux structures anatomiques concernées, c'est en premier lieu le mucus de surface qui héberge les hélicobactéries, puis les cryptes gastriques, la lumière des glandes, les canalicules intracellulaires des cellules pariétales, et parfois même on trouve des hélicobactéries intracellulaires dans les cellules épithéliales glandulaires (24, 34). Ces derniers résultats sont contestés par Hermanns (18) qui n'en met jamais en évidence en position intracellulaire, ni dans le tissu conjonctif.

On trouve des hélicobactéries isolées lors d'infection légère, plutôt dans le mucus de surface, puis le plus souvent en petits groupes quand l'infection est modérée, parfois à la suite les uns des autres dans la lumière des glandes (18).

De façon grossière, il semblerait que le nombre d'hélicobactéries lors d'infection marquée, augmente du cardia au fundus, reste stable dans le corps, puis diminue vers l'antrum, jusqu'à disparaître dans le canal pylorique (24, 44). De plus, on constate que lorsque des hélicobactéries sont présentes dans l'antrum, le fundus est toujours également infecté (10). Lors d'infection légère ou modérée, leur site privilégié serait plutôt le corps de l'estomac (23).

2.3.5. L'identification morphologique en microscopie électronique :

La microscopie électronique permet dans un premier temps de confirmer la localisation des hélicobactéries gastriques : elles peuvent être dans ou juste sous le mucus de surface, dans les cryptes des glandes, ou avoir une localisation intra-cellulaire et se loger dans les canalicules intra-cellulaires dilatés, comme cela était supposé en microscopie traditionnelle (16, 22, 24). Mais son intérêt principal est de permettre une différenciation selon les espèces, basée sur des critères de taille et de morphologie. Ainsi peut-on reconnaître les principales espèces en appréciant leur nombre de spirales, leurs dimensions, leur nombre de flagelles, la présence de fibrilles périplasmiques...(Fig 6).

Exemples : (52)

| Caractéristiques structurales | <i>Helicobacter felis</i> | <i>Helicobacter bizzozeronii</i> |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Longueur en micromètres | < à 8 | 4 à 10 |
| Diamètre en micromètres | 0.6 à 0.8 | 0.3 à 1 |
| Nombre de spirales | Faible | Elevé (3 à 8 minimum) |
| Flagelles aux extrémités | Multiples | Multiples |
| Fibrilles périplasmiques | En spirales | Aucune, surface lisse |

Rq : *Helicobacter felis* semble pouvoir perdre les fibrilles périplasmiques qui le caractérisent, ce qui le rend alors presque indistinguable d'*Helicobacter bizzozeronii* (48).

Techniquement, les biopsies doivent être fixées dans une solution contenant 2.5% de glutaraldéhyde cacodylate à 0.1molaire, et tamponné à pH=7.2, puis dans 1% d'osmium tétroxyde déshydraté, et placées dans de l'epon araldite. Ensuite sont réalisées des sections semi-fines de 0.5 micromètres colorées au bleu azur, et des sections fines d'environ 80 nanomètres colorées à l'acétate d'uranyl (44). La microscopie électronique n'est pas un examen utilisable en routine.

2.3.6. Les sérologies :

Les sérologies sont très utilisées en médecine humaine pour les études de prévalence, en faisant des dépistages dans la population. La détermination du titre en anticorps (IgG) dirigés contre *Helicobacter pylori* chez l'homme est très sensible et très spécifique (48). L'inconvénient de cette méthode est qu'elle ne renseigne ni sur le degré d'infection, ni sur les lésions histologiques, ni sur les espèces d'hélicobactéries en cause. De plus, elle est inutilisable dans le suivi thérapeutique et la détermination de l'éradication de l'infection puisque le titre en anticorps chez l'Homme ne diminue qu'au moins 6 mois après guérison (20).

En pratique, la technique la plus utilisée pour le diagnostic sérologique est l'ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) : de nombreux kits existent déjà. Lorsque le test ELISA est douteux, on a recours à l'immunoblotting. L'ELISA a permis de mettre en évidence la séroconversion de Beagles gnotobiotiques et de chiens SPF infectés expérimentalement par *Helicobacter felis* et par *Helicobacter pylori* (49).

Quatre cinquième des chiens inoculés par *Helicobacter pylori* développent une réponse spécifique par des IgG sériques 14 jours après épreuve (24, 34), et tous possèdent ces anticorps à 21 ou 30 jours (34, 48). Il semble même que la séroconversion puisse avoir lieu après une semaine d'exposition si la densité de l'infection est importante, ce qui diffère des résultats obtenus chez l'Homme où les IgG ne sont détectables qu'au bout de 3 semaines (34). Des IgA et des IgG ont aussi été détectées dans la salive du chien, avec un titre maximum obtenu 12 à 15 semaines post-infection (37).

Chez le chien, les tests ELISA permettent de faire la différence entre chiens infectés et non infectés (en utilisant des antigènes issus d'*Helicobacter felis*, *pylori* et *bizzozeroni*) avec une spécificité de 95.6% dans l'étude de Strauss-Ayali (49). Cette même étude montre qu'en combinant ELISA et immunoblotting, la sensibilité de détection est de 79.5% et la Valeur Prédictive Positive est supérieure à 97%.

La sensibilité générale du test ELISA chez le chien est diminuée par le manque de réponse humorale de certains individus pourtant infectés, mais trop légèrement (34).

Chez l'Homme, on emploie des antigènes d'*Helicobacter pylori* semi purifiés, notamment les deux sous-unités de l'uréase. Les valeurs de sensibilité et de spécificité obtenues sont très élevées. Le fait que les carnivores domestiques puissent être infectés de manière concomitante par différentes espèces d'hélicobactéries représente une véritable difficulté dans la mise au point de ces techniques (30).

Quand on compare les résultats de sérologies chez certains chiens, aux résultats des colorations de Warthin-Starry de ces mêmes chiens, on constate que les faux positifs ainsi que les faux négatifs sont nombreux; il n'est donc pas encore envisageable d'utiliser cette méthode pour les dépistages d'infection dans les populations d'animaux domestiques (39).

2.3.7. Le diagnostic par PCR ou Polymérase Chain reaction :

La technique PCR :

Cette technique a été mise au point en 1985 par K. Mullis de l'équipe de H. Erlich (Cetus Corporation). C'est en fait un clonage acellulaire, réalisé in vitro, utilisant la propriété qu'ont les DNA polymérases de ne pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce. Cette propriété est mise à profit dans la PCR pour amplifier, par réplifications successives, la séquence désirée. On choisit pour cela des amorces oligonucléotidiques synthétiques capables de s'hybrider aux bornes de la séquence ADN recherchée, et d'en réaliser la multiplication. Le nombre de copies de la séquence choisie est doublé à chaque cycle de PCR, et son augmentation est donc exponentielle : après 30 cycles, on obtient en moyenne une amplification de 10^6 .

Ainsi, si on part de 1 picogramme de cible contenu dans 1 microgramme de DNA génomique total, on récupère 1 microgramme de cible amplifiée, ce qui est plus de 100 fois supérieur au seuil de détection par simple coloration au BET (bromure d'éthidium, utilisé dans notre expérimentation).

Les principaux problèmes rencontrés sont : la contamination (car nombreux sont les aérosols contenant des produits d'amplification lors du pipetage), la forte inhibition par des facteurs présents dans les échantillons biologiques (par exemple les nombreux polysaccharides contenus dans les fèces), la faible fidélité de la Taq Polymérase qui rend le clonage difficile (pas de correction des erreurs ce qui donne un taux d'erreur de 10^{-4} équivalent à celui de transcriptase reverse, et qui oblige à avoir parfois recours à la PCR nichée utilisant des sondes internes aux fragments à amplifier pour confirmer la spécificité des produits), et la possibilité d'amplifications parasites (car seules 1% des amorces s'hybrident à leur place normale, les autres s'hybrident de manière non spécifique); mais ces amplifications parasites ne sont généralement pas détectables car non exponentielles. Leur probabilité diminue en augmentant la température d'hybridation, ce qu'on nomme « augmenter la stringence ». C'est pourquoi en médecine humaine, une PCR positive avec une histologie et une culture négatives est considérée comme un faux positif. D'où la nécessité de travailler dans des conditions optimales, de prendre certaines précautions comme travailler avec des cônes contenant des cotons protecteurs, d'irradier les amorces aux UV, d'aliquoter les composants en petits volumes dès leur réception, de distribuer les ADN en dernier lors de la réalisation des incubations.

Il est impossible d'obtenir une PCR quantitative car avec un même échantillon de départ, divisé dans des tubes différents, les bandes obtenues après amplification sont d'intensité différente. En effet, le taux d'amplification est conditionné par le rendement de chaque étape, or des différences d'inertie thermique des parois des tubes par exemple, entraînent des rendements différents. La quantification ne sera significative que si elle est comparée à un étalon co-amplifié dans le même tube et utilisant si possible les mêmes amorces. Pour cela il faudrait par exemple avoir une séquence à amplifier mutée à un endroit connu et qui serait séparée à la fin avec des enzymes de restriction.

En pratique, dans un automate spécifique, le DNA préalablement extrait de son tissu d'origine, et contenant la séquence à amplifier, est chauffé à 94°C afin de séparer les 2 brins de la double hélice, qui après refroidissement s'hybrident avec les amorces incluses au mélange initial. Ces amorces sont constituées d'oligonucléotides de 20 à 25 bases s'hybridant parfaitement avec les extrémités 3' de la portion de séquence à amplifier. La Taq polymérase (DNA thermostable issue d'une bactérie vivant dans les sources chaudes à 80-90°C : *Thermus aquaticus*) synthétise alors le brin complémentaire à partir de ces amorces. Le nombre de copies de la séquence est doublé en 6 minutes. On réalise en général 30 à 40 cycles.

La taille du segment amplifié est toujours considérablement plus faible que celle du DNA de départ, il est donc très facile de les séparer ensuite par électrophorèse.

Il existe aujourd'hui des amorces spécifiques de genre ou d'espèce pour les hélicobactéries, qui sont obtenues à partir des ARN ribosomiques 16S, ou des gènes de l'uréase ou des adhésines des bactéries.

Ex : amorces spécifiques de genre C97 et C05 avec lesquelles on obtient des bandes de 1200 pb (paires de bases), et correspondant à l'ADN de *Helicobacter pylori*, *felis*, *bizzozeronii*, *heilmannii*, *salomonis*, *fenelliae*, *bilis*, *cinaedi*, *hepaticus* et *canis*. Cette bande étant absente chez *Campylobacter jejuni* et *Proteus mirabilis* (49).

Ex : amorce spécifique d'espèce obtenue à partir du gène de l'uréase B d'*Helicobacter felis*, donnant une bande de 1150 pb, absente chez *Helicobacter pylori*, *bizzozeroni*, *heilmannii*, *fenelliae*, *bilis*, *cinaedi*, et *Campylobacter jejuni* (44).

Lorsque des produits non spécifiques sont obtenus, il est possible de les identifier par séquençage (48).

C'est le test pour lequel la sensibilité diagnostique est la meilleure, à condition que les biopsies soient nombreuses et de localisations variées. Dans l'étude sur 58 chats réalisée par Neiger (28), la PCR permet de détecter 4 chats positifs de plus qui avaient donné des résultats négatifs avec les méthodes précédemment citées, ce qui représente un gain diagnostique appréciable (51 chats positifs au total). Cependant, 4 autres chats qui avaient été reconnus positifs auparavant sur au moins 1 des autres tests, se sont avérés négatifs en PCR. Il a été supposé que la bactérie en cause chez ces chats étaient d'un autre genre ou d'une autre espèce que *Helicobacter felis*, *pylori* ou *heilmannii* testés ici.

La PCR est considérée actuellement comme un excellent moyen diagnostique d'infection et de distinction d'espèce, précision que les études morphologiques ne peuvent pas toujours donner : par exemple lorsque *Helicobacter felis*, caractérisé par ses fibrilles périplasmiques, les perd in vitro, il est alors semblable à d'*Helicobacter heilmanii* (28).

2.4. LE POUVOIR PATHOGENE DES HELICOBACTERIES :

L'épithélium gastrique est une sorte de barrière imperméable du fait des jonctions serrées entre les cellules. Il est protégé des attaques acides par le mucus, les bicarbonates et les tampons intracellulaires qu'il sécrète. La cytoprotection inclut également la production locale de prostaglandines. Le renouvellement de l'épithélium permet ensuite la restitution rapide lors de dommages mineurs. Lors de lésion de la muqueuse, c'est donc la sécrétion acide qu'il faut bloquer en premier lieu (13).

La caractéristique principale des hélicobactéries est leur adaptation à vivre dans un environnement acide (20).

Invasion : L'enzyme Uréase est présente en surface et dans le cytoplasme de la bactérie ; elle transforme l'urée de l'estomac en ammoniac et en ions bicarbonates. L'ammoniac réagit ensuite avec l'eau pour former des ions ammoniums qui augmentent le pH du mucus gastrique sécrété. Cet effet tampon leur permet, en créant un environnement plus favorable, de pénétrer plus profondément dans le mucus de surface, ce qui augmente leur temps de survie. Ainsi, la présence des hélicobactéries rompt la couche de mucus, composant majeur de la barrière muqueuse (20).

Cytotoxicité : L'ammoniac produit par les hélicobactéries contribue à la genèse des lésions en provoquant notamment la vacuolisation des cellules épithéliales, dont la fonction de sécrétion du mucus gastrique était déjà altérée par la fixation des bactéries à leur surface. D'autre part, 50 à 60% des souches d'*Helicobacter pylori* expriment in vitro une activité cytotoxique directe induisant la vacuolisation des cellules épithéliales. Il est probable que cette activité existe également in vivo. La cytotoxine en question est codée par le gène *vacA* ; elle caractérise les *Helicobacter pylori* de type I (probablement impliqués dans l'apparition des ulcères duodénaux chez l'Homme). Cette toxine active n'est exprimée que dans 50% des cas (20).

Une protéine *cagA* a été caractérisée comme étant un marqueur d'activité de toxine vacuolisante ; elle est associée au gène *vacA*. La plupart des Hommes atteints d'ulcère duodéal ont des anticorps anti-*cagA* (1, 12, 20).

Helicobacter pylori posséderait aussi un lipopolysaccharide à l'origine d'une altération du mucus de surface de l'épithélium gastrique, car il provoque un défaut de sulfation dans la

synthèse de la mucine, transformant une mucine de haut poids moléculaire en une mucine de bas poids moléculaire, ce qui modifie les propriétés du mucus final.

Ces phénomènes, ajoutés à la réaction inflammatoire profonde induite par l'action directe des bactéries sur la muqueuse, fragilisent la barrière muqueuse et augmentent les risques potentiels d'ulcères et d'érosions.

D'autres facteurs sont supposés jouer un rôle dans la pathogénicité, sans que celui-ci soit élucidé : la mobilité, les mucinases, les lipases et les hémolysines bactériennes.

Les effets constatés sur les fonctions gastriques : Les hypergastrinémies sont courantes, et entraînent une sécrétion acide importante, pouvant être 3 fois supérieure à la normale chez certains patients humains à ulcère duodéal. La sécrétion accrue de gastrine est peut-être liée à la production importante d'ions ammoniums induite par les hélicobactéries (20). Des cultures de cellules G gastriques de chiens, mises en contact avec des cultures d'*Helicobacter pylori*, à la concentration minimale de 10^7 bactéries par champ, voient la sécrétion de ces cellules G augmentée (25).

Quand les patients ont été traités, le taux de gastrine et la sécrétion acide redeviennent normaux (20).

Inflammation et ulcérogénèse : l'infection par *Helicobacter pylori* chez l'Homme semble associée à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1B, IL-6, IL-8, et TNF- α). Cette production mène ensuite à des altérations de la sécrétion de gastrine, de somatostatine et d'acide, induisant pour finir une gastrite et des ulcères (30).

Chez l'Homme, les ulcères sont en général localisés à la zone de transition entre le corps et l'antra. Des études ont montré que des ulcères gastroduodénaux apparaissent chez 2% des Hommes dont l'infection a été traitée et éradiquée, et chez 50% de ceux qui n'ont pas été traités ou chez qui l'infection persiste après traitement (20).

Dans le duodénum, les ulcères surviennent sur les zones de métaplasie gastrique : c'est l'acidité qui est à l'origine de la métaplasie gastrique du duodénum, rendant la colonisation par les hélicobactéries possible, et l'apparition d'ulcères duodénaux (41).

Infection et néoplasie : *Helicobacter pylori* est classé dans les carcinogènes de groupe 1, car associé en médecine humaine à des adénocarcinomes gastriques et à des lymphomes à cellules B.

Dans les pays où l'incidence des cancers gastriques est élevée, quasiment 100% des adultes sont infectés (Pérou, Colombie, Mexique). L'infection quadruple le risque de développer un cancer gastrique.

Le mécanisme précis de la carcinogénèse induite par *Helicobacter pylori* n'est pas clairement établi, mais impliquerait vraisemblablement l'induction par les cytokines pro-inflammatoires d'une enzyme : la Nitric Oxyde Synthétase (30). Les nitrosamines et le NO obtenus par l'action de cette enzyme, ont des propriétés mutagènes et induiraient eux-mêmes en plus l'accumulation d'une protéine P53 modifiée. Or, la surexpression de cette protéine est souvent rencontrée dans les cancers gastriques chez l'Homme (53).

Pathogénie chez les animaux : le rôle pathogène des espèces d'hélicobactéries adaptées aux animaux n'est pas toujours bien établi.

Des furets infectés par *Helicobacter mustelae* ont cependant développé des lésions de gastrite, des ulcères duodénaux ainsi que des adénocarcinomes. Pourtant, *Helicobacter mustelae* ne produit pas de cytotoxine (27) comme celle identifiée chez *Helicobacter pylori* (48).

Des singes infectés par *Helicobacter acinonyx* ont également présenté des formes sévères de gastrites et des porcs, infectés par *Helicobacter heilmanii*, des ulcères gastriques (48).

Simpson montre que des chiens gnotobiotiques infectés expérimentalement par *Helicobacter felis* ne développent, au bout de 26 semaines, aucune lésion gastrique significativement différente de celles observées dans le lot de chiens témoins non infectés (44). Dans cette étude, aucune corrélation n'a pu être faite entre le degré d'inflammation de la muqueuse gastrique et la densité de la colonisation bactérienne. Ce même auteur a étudié ensuite une population de chiens infectés naturellement par *Helicobacter felis* et par *Helicobacter bizzozeronii*, et n'a pu montrer aucune modification de la structure gastrique, ni perturbation de la fonction de sécrétion gastrique (45).

Ainsi, l'absence d'inflammation, de modification de la sécrétion d'acide et de gastrine, associées à l'infection, tend à montrer que les hélicobactéries infectant naturellement le chien ne sont pas pathogènes pour cette espèce.

Globalement, peu de résultats sont actuellement à disposition concernant la pathogénie des infections naturelles par les hélicobactéries chez les animaux.

2.5. LES LÉSIONS ASSOCIÉES À L'INFECTION :

2.5.1. Lésions macroscopiques :

Chez le chien et le chat, aussi bien à l'endoscopie que lors d'examen nécropsique, rares sont les lésions macroscopiques rapportées lors d'infection naturelle par les hélicobactéries. Les ulcères stomacaux sont, dans ces espèces, des lésions habituellement beaucoup moins fréquentes que chez l'Homme. Des érosions et quelques ulcères sont cependant parfois notés (18), et une perforation gastrique a même été rencontrée sur un chien (46). On constate parfois des signes de reflux duodéno-gastrique (18).

Mais de façon générale, une infection pourtant massive et durable ne semble pas entraîner de modification visible à l'œil nu (44, 45).

2.5.2. Lésions histologiques :

L'appréciation des lésions histologiques pouvant être reliées à la présence des hélicobactéries est une tâche difficile, du fait du manque de standardisation des critères définissant les modifications histologiques (30, 42). Pour exemple, la « German Society of Pathologie » (1989) propose de ne considérer comme normale qu'une muqueuse gastrique où aucun lymphocyte, ni plasmocyte, ni granulocyte ne serait détecté. Par contre, selon le « Sydney System » (33), une distribution uniforme d'un petit nombre de ces mêmes cellules pourrait être considérée comme physiologique (18).

Cas des infections expérimentales par *Helicobacter pylori* chez les animaux :

Radin (34) affirme que tous les Beagles gnotobiotiques infectés de façon expérimentale par *Helicobacter pylori* développent une gastrite au bout de 30 jours. Les travaux de Rossi (37), qui inocule aussi massivement des chiens avec une souche d'*Helicobacter pylori*, montrent l'apparition d'une gastrite aiguë antrale en 1 semaine, puis une gastrite chronique folliculaire après 8 semaines. Cette gastrite chronique folliculaire est caractérisée par la présence dans la lamina propria d'infiltrats focaux ou diffus de type lymphoplasmocytaire, associés souvent à des follicules lymphoïdes et à quelques polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. Enfin une atrophie gastrique fonctionnelle apparaît après 24 semaines.

Une autre étude menée sur des gerbilles inoculées avec une souche ulcérogène d'*Helicobacter pylori* montre l'apparition d'une gastrite chronique active dès 6 semaines dans cette espèce,

débutant dans l'antra puis s'étendant vers le fundus (53). Après 26 semaines apparaissent des ulcères à la jonction antra/corps, ainsi qu'une métaplasie intestinale proche de ces ulcères.

Cas des infections naturelles par les hélicobactéries chez les animaux :

Lecoindre démontre qu'il existe une corrélation positive entre le grade de la gastrite et la densité de l'infection chez les chiens qu'il étudie (23). La majorité des études réalisées chez les animaux ne permettent cependant pas d'être affirmatif à ce sujet : les équipes de Hermanns (18) ou de Eaton (8) par exemple, ne parviennent pas à corréler la densité de l'infection à la présence de lymphocytes et de plasmocytes chez le chien. Une étude de Papasouliotis (31) effectuée sur 54 chats, tous infectés naturellement, ne rapporte aucune lésion histologique, sur aucun chat. Les études de Neiger (28), ou de Simpson (45) ne concluent pas non plus à la corrélation infection/lésions.

La présence des hélicobactéries semble plus communément associée à une inflammation de la muqueuse gastrique de bas grade, comprenant un œdème de la lamina propria, et une légère augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes intra-épithéliaux (l'implication des polynucléaires neutrophiles semble jouer un rôle mineur chez le chien, alors que ce rôle est important chez l'Homme) (10, 44).

La seule conclusion commune à la majorité des études pourrait être que les animaux ayant les scores de gastrite les plus importants ont des degrés d'infection élevés, mais la réciproque n'est pas vraie.

Les types de lésions :

La dégénérescence glandulaire a été constatée comme étant plus fréquente dans le fundus de chiens et de chats infectés par des hélicobactéries que chez les non-infectés, mais la fibrose gastrique et les infiltrats lymphoplasmocytaires (classiques chez l'Homme), sont similaires (18, 54).

L'espèce infectante pourrait jouer un rôle important : certains auteurs (22) ont remarqué que lorsque *Helicobacter felis* est en contact étroit avec l'épithélium de surface ou en position intra-cellulaire, une dégradation irréversible de l'épithélium survient.

A l'opposé, la présence d'*Helicobacter heilmanii* ou d'*Helicobacter bizzozeroni*, même en quantité massive, ne se traduit jamais par une invasion de la lumière glandulaire ni par des dommages épithéliaux (22, 32). Peyrol (32) constate que les gastrites les plus sévères tiennent souvent à l'association d'*Helicobacter felis* et d'*Helicobacter bizzozeroni*.

Les follicules lymphoïdes sont répartis de manière diffuse dans la muqueuse gastrique, avec cependant un site privilégié qui serait la jonction antre pylorique/corps (22, 24, 34) ; leur taille et leur nombre tendant plutôt à diminuer vers l'antre. Les plus grands ont une taille correspondant à environ 12 glandes gastriques (24). Ils sont présent chez la plupart des chiens infectés alors que les chiens témoins n'en ont pas, ou peu (22, 24, 36, 44).

Chez le chat, Hermanns (18) parvient à corrélér positivement leur nombre à l'intensité de l'infection. La facilité de détection de ces follicules dépend évidemment de la profondeur de la biopsie et s'avère de ce fait plus aléatoire lorsque les biopsies sont réalisées par endoscopie.

Chez l'Homme, les nodules lymphoïdes sont supposés précéder le développement des lymphomes de bas grade à cellules B et des carcinomes gastriques (22). Chez les gerbilles, 62 semaines après inoculation de souches d'*Helicobacter pylori*, 37% d'entre elles développent un adénocarcinome dans la région pylorique (53).

Un chat de 8 mois infecté par *Helicobacter heilmanii* a également développé un lymphome gastrique (28). Ce cas semble relativement anecdotique. Les cas de carcinomes chez le chien rencontrés par Lecoindre (23) n'étaient pas associés à la présence d'hélicobactéries.

La prévalence élevée de l'infection par les hélicobactéries chez le chien confrontée à la faible occurrence des cancers gastriques dans cette espèce, laisse supposer qu'ils ne sont pas liés.

Le seul cas de maladie ulcéreuse chronique notée par Lecoindre (23) parmi les 83 chiens étudiés était un chien très fortement contaminé. Smith (46) a décrit lui aussi le cas d'un chien atteint d'un ulcère gastrique perforant. Ces pathologies restent très anecdotiques.

2.6. TRAITEMENT :

Le manque actuel de connaissances quant à la pathogénicité des hélicobactéries chez l'animal pose aux vétérinaires le dilemme de traiter ou non des animaux présentés pour vomissements chroniques ou gastrite. La monothérapie est inefficace ; il est nécessaire de combiner au moins un antibiotique tel que l'Amoxicilline, une Tétracycline, ou la Clarithromycine (macrolide proche de l'Erythromycine), à des antiacides comme l'Oméprazole ou la Famotidine. Le Bismuth est également recommandé car ses sels s'accumulent sur les parois cellulaires des hélicobactéries et entraînent leur lyse. Chez l'Homme, le protocole associant Bismuth, Métronidazole et Amoxicilline ou Tétracycline permettait d'obtenir un taux d'éradication de 90% (20), mais ce pourcentage a tendance à diminuer car des résistances au Métronidazole apparaissent.

Les traitements sont obligatoirement journaliers, longs (au minimum 14j), et entraînant des effets secondaires tels que nausées, douleurs abdominales, diarrhée, ce qui les rend lourds.

Le protocole associant uniquement l'Oméprazole à l'Amoxicilline présente moins d'effets secondaires mais son efficacité est variable (46 à 80%).

L'utilisation de la Clarithromycine semble très efficace mais elle est très coûteuse et des résistances ont déjà été décrites. Des études ont montré qu'en France et en Belgique, 10 à 15% des souches d'*Helicobacter pylori* sont primitivement résistantes à la Clarithromycine, d'où la nécessité de tester la souche avant de débiter le traitement étant donné le coût de la molécule. La résistance des hélicobactéries à cet antibiotique serait due à la mutation du gène de l'ARN ribosomal 23S nommé A2143G ou A2144G. Ces mutations sont détectables par analyse des fragments de restriction polymorphes car elles induisent des nouveaux sites de restriction pour les enzymes BbsI et BasI. Des techniques de PCR permettant la co-détection de la bactérie et sa sensibilité aux antibiotiques sont actuellement très recherchées (40).

L'Amoxicilline est meilleur marché et ne présente pour le moment que peu de résistances.

Les traitements effectués à l'heure actuelle chez les carnivores domestiques sont directement inspirés de protocoles avérés efficaces chez l'Homme : l'association Métronidazole + Amoxicilline + Famotidine ou Oméprazole semble convenir (20). Le traitement aléatoire des chiens et des chats présentés pour gastrite à l'équipe de Strauss-Ayali (48), a montré une amélioration des signes cliniques pour 90% d'entre eux. Simpson, lui, a montré qu'un traitement à base d'Amoxicilline, de Métronidazole et de Famotidine n'entraîne pas d'éradication complète des hélicobactéries gastriques chez le chien (45).

Les informations concernant l'efficacité des traitements chez le chien sont rares.

Les protocoles habituellement proposés sont : (48)

| | Dose en mg/kg, VO | Nbre de prises/j | Durée en jours |
|---------------|-------------------|------------------|----------------|
| Amoxicilline | 20 | 2 | 14 |
| Métronidazole | 20 | 2 | 14 |
| Famotidine | 0.5 | 2 | 14 |
| Oméprazole | 0.7 | 1 | 14 |

L'utilisation des sels de Bismuth chez le chien n'est pas bien documentée.

Le contrôle de l'éradication est nécessaire car les réinfections sont fréquentes, mais difficile à faire accepter par les propriétaires lorsqu'on a recours à l'endoscopie qui exige l'anesthésie de l'animal. C'est pourquoi la mise au point de méthodes diagnostiques moins invasives est largement souhaitable en médecine vétérinaire.

La vaccination chez la souris est prometteuse (48), mais les recherches n'en sont qu'au début.

2.7. LE MODE DE CONTAMINATION : REPERCUSSIONS SUR LA SANTE PUBLIQUE :

L'infection semble être transmise d'un animal à l'autre par contact, puisque les expériences mettant en rapport des chiens gnotobiotiques et des chiens inoculés avec des hélicobactéries (*Helicobacter felis* et *Helicobacter pylori*), montrent qu'au bout d'une semaine les premiers sont également positifs (34). La transmission de la mère au chiot d'*Helicobacter salomonis* pendant la lactation a également été montrée dans cette même étude. La transmission est supposée orale-orale ou fécale-orale. La présence d'une légère œsophagite chez ces chiens laisse à penser que les sites de colonisation en amont de l'estomac pourraient jouer un rôle important dans cette transmission (34). Enfin, *Helicobacter salomonis* semblerait pouvoir être transmis de la mère daim à ses petits par la lactation (14).

C'est avant tout la découverte que des chats pouvaient être infectés naturellement par *Helicobacter pylori* (7, 30) qui a posé la question du risque potentiel de zoonose.

Une étude menée chez des bergers de Sardaigne (7) a montré récemment qu'un contact direct entre les bergers et leurs moutons, serait à l'origine de leur contamination par *Helicobacter pylori*. Jusqu'à présent, *Helicobacter pylori* n'a jamais été isolé chez le chien infecté naturellement.

Les espèces qui prédominent chez l'Homme et chez les carnivores domestiques ne sont en général pas les mêmes ; par exemple, *Helicobacter heilmanii* dont la prévalence chez le chien est importante, reste anecdotique chez l'Homme (0.1 à 0.3% des hélicobactérioses humaines). Une souche identique d'*Helicobacter heilmanii* a malgré tout été isolée chez un propriétaire et un de ses chats (48).

Helicobacter pylori a pu être isolé à partir de selles, de salive (21) ou de plaque dentaire (47) chez l'Homme. Les possibilités de contamination du milieu extérieur sont donc nombreuses. Les taux d'infection dans les pays sous-développés sont très élevés du fait de la transmission orale-orale mais aussi fécale-orale pouvant exister lorsque les conditions d'hygiène sont mauvaises (30, 34, 48).

EXPERIMENTATION :

3.1. BUT :

L'objectif de l'étude expérimentale réalisée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse cette année là, était de mettre au point un protocole de PCR, facilement reproductible par la suite, permettant le dépistage des hélicobactéries dans des biopsies gastriques de chiens ou de chats. Afin de montrer les avantages de cette technique dans un but diagnostic, elle fut confrontée aux autres méthodes de dépistage utilisées jusqu'alors : le test Uréase et la coloration de Warthin-Starry.

3.2. MATERIEL ET METHODE DE L'EXPERIMENTATION :

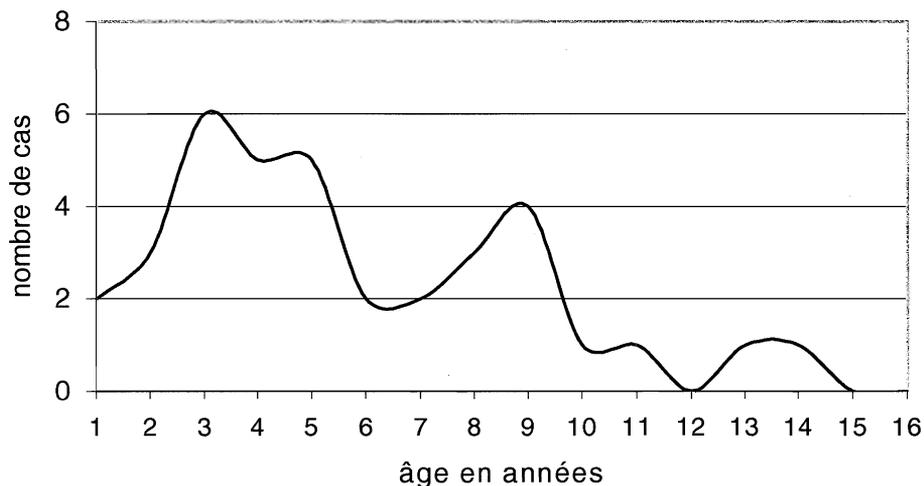
3.2.1. Individus :

Quarante et un individus ont été retenus pour cette expérimentation : trente-six chiens et quatre chats. La majorité de ces animaux avaient été préalablement présentés à la consultation de gastro-entérologie entre les mois d'Octobre 1998 et de Juin 1999 , pour des troubles digestifs variés.

Six chiens donneurs de sang du service de médecine, cliniquement sains, ont aussi été étudiés afin d'avoir un aperçu de la prévalence de l'infestation par les hélicobactéries dans une population saine.

Chez les chiens, on dénombrait vingt-six mâles et dix femelles, tandis que chez les chats, on comptait un mâle et trois femelles.

L'âge moyen observé dans la population de chats était de 8 ans (de 5 à 10 ans), contre une moyenne de 4,5 ans (de 6 mois à 13 ans) chez les chiens.



Répartition des âges des chiens étudiés

Les 4 chats étudiés étaient de race Européenne.

22 races de chiens étaient représentées, avec le plus souvent des Boxers (6/36), et des Beagles (4/36).

Tab.1. Races des chiens étudiés :

| RACES | Nombre |
|------------------------|--------|
| Boxer | 6 |
| Beagle | 4 |
| Berger allemand | 2 |
| Bruno du Jura | 2 |
| Setter | 2 |
| Bichon | 2 |
| Colley | 2 |
| Lhasa Apso | 1 |
| Whippet | 1 |
| Yorkshire | 1 |
| Husky | 1 |
| Bouvier bernois | 1 |
| Shi-tzu | 1 |
| Caniche | 1 |
| Labrador | 1 |
| Boston terrier | 1 |
| Westie | 1 |
| Epagneul breton | 1 |
| Braque allemand | 1 |
| Rottweiler | 1 |
| Cocker spaniel | 1 |
| Croisé | 1 |

Le motif de consultation principal était la diarrhée (aiguë ou chronique), puis les vomissements.

Tab.2. Symptômes à la consultation :

| Motif de consultation | Chiens n=36 | Chats n=4 |
|-----------------------|-------------|-----------|
| Vomissements | 16 | 4 |
| Diarrhée | 21 | 0 |
| Amaigrissement | 10 | 1 |
| Douleur abdominale | 13 | 0 |

Tab.3. Motifs de consultation :

| <i>Chiens</i> | Vomissements | Diarrhée | Amaigrissement | Douleur abdominale |
|---------------|--------------|----------|----------------|--------------------|
| 1 | | oui | oui | |
| 2 | | oui | oui | |
| 3 | | | | |
| 4 | oui | | | oui |
| 5 | | | | |
| 6 | oui | oui | oui | |
| 7 | oui | | | oui |
| 8 | | oui | oui | oui |
| 9 | oui | | | oui |
| 10 | oui | | | oui |
| 11 | | oui | | oui |
| 12 | oui | oui | oui | |
| 13 | | | | |
| 14 | | | | |
| 15 | oui | oui | | |
| 16 | | | | |
| 17 | oui | | | oui |
| 18 | | | | |
| 19 | oui | oui | | |
| 20 | oui | | | oui |
| 21 | oui | oui | | |
| 22 | | | | |
| 23 | oui | oui | oui | oui |
| 24 | | oui | | |
| 25 | | oui | | oui |
| 26 | oui | oui | | |
| 27 | | oui | | |
| 28 | | oui | | |
| 29 | oui | oui | oui | |
| 30 | | oui | | oui |
| 31 | | oui | oui | oui |
| 32 | oui | | | |
| 33 | | oui | | |
| 34 | | oui | | oui |
| 35 | | oui | oui | |
| 36 | oui | | oui | |

Chats :

| | | | | |
|---|-----|--|-----|--|
| A | oui | | | |
| B | oui | | oui | |
| C | oui | | | |
| D | oui | | | |

3.2.2. Réalisation des prélèvements :

Chaque prélèvement était effectué au cours d'une endoscopie digestive, réalisée à des fins diagnostiques, ou uniquement expérimentalement en ce qui concerne les six chiens donateurs de sang.

Toutes les endoscopies étaient faites sur des animaux ayant subi un jeûne de douze heures au minimum. Ces derniers étaient ensuite placés sous anesthésie générale selon les protocoles suivants : -soit en anesthésie fixe : Médétomidine (Domitornd) 50 µg/kg, intra-veineux + Kétamine (Imalgènend) 8 mg/kg, intra-veineux + réveil facilité par Atipamézole (Antisédatnd) 100 µg/kg, intra-musculaire.

-soit en anesthésie gazeuse : prémédication avec Acépromazine (Vétranquilnd) 0,01 ml/kg intra-veineux deux heures avant l'induction au Thiopental sodique (Nesdonalnd) 15 mg/kg intra-veineux, intubation, relais gazeux à l'Isoflurane.

L'endoscope utilisé était de marque Olympus, modèle GIFQ 140, accompagné d'une colonne vidéo EVIS 140, et permettant l'emploi d'une pince à biopsie de diamètre 2 millimètres. Entre chaque endoscopie, l'endoscope ainsi que les pinces étaient nettoyés et désinfectés avec une solution désinfectante spécifique à base d'ammonium quaternaire.

3.2.3. Test uréase :

Une biopsie était effectuée à la jonction antre/corps pour le test à l'uréase (**Pronto Dry**, MIC, France).

Principe : ce test se présente sous forme d'une cupule de couleur jaune contenant de l'urée et un indicateur coloré, le rouge phénol. Dès le prélèvement effectué, la biopsie est placée dans la cupule, puis recouverte de quelques gouttes de sérum physiologique. Si l'uréase est présente, cette enzyme clive l'urée et la modification de pH est indiquée par un changement de couleur. La réaction a lieu en laissant le test incuber à température ambiante.

La réaction était considérée comme positive si la cupule devenait rose (de rose pâle à rose soutenu). Cette réaction colorée était observée une première fois 30 minutes après le dépôt de la biopsie, et une seconde fois 24 heures après.

3.2.4. Polymérase Chain Réaction (PCR) :

Récolte et conservation des prélèvements :

Dans notre étude, neuf biopsies par endoscopie étaient effectuées pour le test par PCR : 3 dans l'antra pylorique, 3 dans le corps de l'estomac, et 3 dans le fundus. Entre chaque changement de zone de l'estomac, la pince à biopsie était nettoyée dans de l'eau oxygénée, puis dans de l'alcool à 70°. Les neuf biopsies destinées à être analysées par cette méthode étaient regroupées selon leur zone d'origine, déposées sur un film radiographique noir coupé en fine bandelette ; ce film était ensuite inséré dans tube à prélèvement sérique.

L'ensemble était enfin conservé à -20°C jusqu'au jour de l'extraction d'ADN.

Extraction de l'ADN :

Pour cette étape, le kit commercialisé par Roche Diagnostics à cet effet a été utilisé (**High Pure PCR Template Preparation Kit**, for isolation of nucleic acids for PCR and Southern blotting). Ce kit permet l'extraction d'ADN à partir de 25 à 50 mg de tissu, en utilisant successivement un tampon de lyse, de la protéinase K, un tampon de liaison, de l'isopropanol, un tampon de lavage, et enfin un tampon d'élution.

Les 3 biopsies d'une même zone étaient regroupées afin de constituer un unique échantillon à extraire. Au total, 117 échantillons ont ainsi été traités.

Amplification génique :

Les primers utilisés n'étaient pas ceux préalablement décrits dans la littérature. Afin d'identifier des séquences génomiques communes aux génomes des principales espèces d'Hélicobactéries rencontrées chez les carnivores domestiques, les ADN dégénérés d'*Helicobacter felis*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter heilmannii*, *Helicobacter bizzozeroni*, ont été alignés et comparés sur ordinateur. De cette étude ont été tirées 2 séquences d'oligo-nucléotides, qui ont ensuite été synthétisées à notre demande par l'organisme **ISOPRIM**, Toulouse, France. Ces deux amorces ont été fournies dans une solution à 200 µM.

HELICO 1 : séquence 5' GCG TAG GCG GGR TWG TMA GTC AG 3'

HELICO 2 : séquence 5' ACA GCC GTG CAG CAC CTG TTT T 3'

Le mélange de réactifs nécessaire à l'amplification était composé pour 1 échantillon de :

- 1 microlitre d'amorce Helico 1
- 1 microlitre d'amorce Helico 2
- 5 microlitres de tampon PCR 10 X
- 5 microlitres de mélange de nucléotides 2mM
- 2 microlitres de MgCl₂ à 50 mM
- 1 unité de Taq polymérase Gibco à 5 U/μL
- eau qsp 30 μL de mélange

Puis 30 μL de ce mélange étaient ajoutés à 20 μL d'ADN extrait. Le tout était ensuite placé dans le thermocycleur (*Gene Amplification PCR System. 2400. Perkin Elmer.*).

L'opération nécessite 2 heures durant lesquelles ont lieu :

- Etape de dénaturation à 94°C 3 minutes
- 40 cycles d'hybridation où se succèdent des phases à 94°C 30 secondes
56°C 30 secondes
72°C 40 secondes
- Etape d'élongation à 72°C 7 minutes
- Réfrigération à 4°C dans l'appareil lui même jusqu'au retrait des tubes.

Gel d'électrophorèse :

Le gel, préparé à partir de 1,5 grammes d'agarose dans 100 ml de tampon 1X TBE (Tris Borate EDTA), était placé dans une cuve à électrophorèse. Pour la réalisation de l'électrophorèse, 10μL de la solution obtenue étaient mélangés à environ 2 μL de tampon de charge (contenant du glycérol et du Bleu de Bromophénol), sur un film de paraffine (Parafilm M., **Greenwich.**), puis déposés dans les puits préparés dans ce but.

Pour chaque série, un marqueur de poids moléculaire, un témoin négatif (eau pure + mélange de réactifs) et un témoin positif (échantillon infecté avec certitude, vérifié par séquençage) étaient déposés également.

La migration était réalisée à 72 volts pendant trente minutes.

Révélation de la migration :

Le gel d'agarose était placé sur un transilluminateur à UV.

Les bandes attendues étaient de 412 paires de bases environ, identifiées par comparaison aux différentes bandes du marqueur de poids moléculaire.

3.2.5. Coloration de Warthin-Starry:

Pour le diagnostic lésionnel histologique et le diagnostic d'infection par les hélicobactéries, au moins 4 biopsies étaient effectuées dans les différentes zones de l'estomac.

Les biopsies gastriques étaient incluses dans des blocs de paraffine, puis découpées au microtome en section de 2µm d'épaisseur. Pour le diagnostic histologique la coloration utilisée était l'hémalun-éosine, pour la recherche d'hélicobactéries, celle de Warthin-starry. La lecture de ces lames était ensuite réalisée par un anatomo-pathologiste (toujours la même personne, dans un souci de reproductibilité), afin d'établir un grading de l'infection par les hélicobactéries. (**annexe 1**)

Chaque spécialiste en histologie possède ses propres critères d'évaluation des lésions : la classification de Sydney (42), déjà utilisée chez le chien, et facilement reproductible, semblait convenir le mieux à notre étude.

Ainsi, la densité de l'infection était classée dans l'une des quatre catégories suivantes :

- * absence
- * légère : présence de quelques hélicobactéries uniques ou en petits groupes, couvrant moins d'1/3 de la surface de la muqueuse.
- * sévère : nombreux groupes d'hélicobactéries couvrant la surface de la muqueuse ainsi que les cryptes gastriques, sur plus des 2/3 de la surface examinée.
- * modérée : situation intermédiaire .

3.2.6. Histologie :

Afin de corrélérer la densité de l'infection à d'éventuelles modifications histologiques de l'estomac des individus étudiés, chaque bloc de paraffine, déjà utilisé pour la coloration spécifique, était recoupé au microtome. La lame obtenue était colorée à l'hémalun-éosine , puis lue au microscope.

Toutes les lectures étaient réalisées par deux anatomo-pathologistes différents, utilisant un même matériel, puis classées selon la classification de Sydney (33) modifiée. En effet, certains critères histologiques tels que la métaplasie intestinale de la muqueuse gastrique ne pouvaient être retenus dans notre étude, puisque n'existant pas chez les carnivores domestiques. Une adaptation a donc été faite.

Pour chaque individu, toutes les biopsies étaient observées ; une moyenne était ensuite faite de l'importance des modifications histologiques, de façon distincte pour l'antra et le corps de l'estomac.

La confrontation des biopsies obtenues sur les chiens donneurs de sang de l'ENVT (considérés comme représentatifs d'une population saine), à des lames utilisées pour les travaux pratiques d'histologie normale, destinées aux étudiants, a permis d'établir une référence de tissu sain à partir duquel le grading des lésions allait être fait.

Pour chaque zone de l'estomac, le premier critère noté était la présence ou l'absence de gastrite .

Puis celle-ci était typée : gastrite aiguë, ou chronique, ou de forme spéciale (regroupant toutes les entités particulières dont les répercussions sur l'épithélium ou l'infiltrat inflammatoire sont reconnaissables, bien que l'étiologie soit mal définie : par exemple les gastrites éosinophiliques ou lymphoplasmocytaires...).

Enfin, lors de gastrite chronique, trois types de modifications étaient évaluées :

- **L'inflammation** : toute augmentation du nombre de lymphocytes ou de plasmocytes dans la lamina propria caractérise la gastrite comme chronique. La sévérité de cet infiltrat est ensuite gradée (léger, modéré, ou sévère). La distribution de l'infiltrat, superficielle ou profonde, n'est pas prise en compte.
- **L'activité** : elle fait référence à la densité de neutrophiles dans la lamina propria, les cryptes gastriques et l'épithélium de surface. De façon arbitraire, l'activité est notée légère si moins d'1/3 de la surface et des cryptes sont concernés ; sévère si plus des 2/3 sont concernés ; modérée entre les deux .

- **L'atrophie** : elle correspond à la disparition des glandes spécialisées dans l'antre ou le corps de l'estomac. Elle est particulièrement difficile à évaluer dans l'antre car la densité des glandes diminue de façon normale vers la jonction antro-pylorique. Elle est également modifiée par l'inflammation qui a tendance à repousser les glandes.

D'autres variables non spécifiques ont été notées dans les « autres commentaires » : fibrose, érosions, œdème, hémorragies, follicules lymphoïdes... (**annexe 1, Tab. 4**)

Tab.4. Densité de l'infection et lésions histologiques :

| | <i>CHIENS</i> | | | | <i>ANTRE</i> | | | | <i>CORPS/FUNDUS</i> | | | |
|----|---------------|-------------------|----------|----------|--------------|-------------------|----------|----------|---------------------|-------------------|----------|----------|
| | HLO's WS | Inflam- mation | activité | atrophie | HLO WS's | Inflam- mation | activité | atrophie | HLO WS's | Inflam- mation | activité | atrophie |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | | | | |
| 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 8 | NR | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | | | | |
| 9 | 3 | 2 | 1 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | | | | |
| 10 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | | | | |
| 11 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 12 | 1 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 1 | 2 | | | | |
| 13 | 1 | 0 | 0 | 0 | NR | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 14 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 15 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | | | | |
| 16 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 17 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 18 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 19 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 20 | NR | FS | FS | FS | NR | FS | FS | FS | | | | |
| 21 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 22 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 23 | 0 | FS | FS | FS | 2 | FS | FS | FS | | | | |
| 24 | 2 | FS | FS | FS | NR | NR | NR | NR | | | | |
| 25 | 0 | NR | NR | NR | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 26 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | | | | |
| 27 | NR | NR | NR | NR | 1 | 1 | 0 | 0 | | | | |
| 28 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 29 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | | | | |
| 30 | NR | 1 | 0 | 1 | NR | 1 | 0 | 1 | | | | |
| 31 | 1 | FS | FS | FS | 1 | FS | FS | FS | | | | |
| 32 | 1 | 3 | 0 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | | | | |
| 33 | NR | NR | NR | NR | 3 | 1 | 1 | 0 | | | | |
| 34 | 3 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | | | | |
| 35 | 2 | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 36 | NR | NR | NR | NR | 1 | 1 | 0 | 0 | | | | |

Légende : **FS** = forme spéciale
NR = non réalisé

1 = grade léger
2 = grade modéré
3 = grade sévère

3. RESULTATS :

3.1. RESULTATS DU TEST UREASE :

Tab.5. Résultats du test uréase à 30 minutes et à 24 heures (n=25 chiens) :

| CHIENS | - | douteux | + |
|-----------------------|---|---------|----|
| Résultats à 30 min | 5 | 14 | 6 |
| Résultats à 24 heures | 3 | 2 | 20 |

Légende
- aucune réaction colorée
+ apparition d'une couleur rose foncée
douteux léger virement de couleur

A 30 minutes, **5 chiens** étaient **négatifs**, et **6** étaient franchement **positifs**

A 24 heures, **3 chiens** étaient **négatifs**, et **20** étaient définitivement **positifs**, **2** restaient douteux.

Ces résultats montrent qu'au bout de 24 heures, 2 des chiens qui paraissaient au début être négatifs ont subi un virement de couleur.

Aussi peut on dire que les résultats observés à 30 minutes se verront confirmés dans la majorité des cas.

En ce qui concerne les résultats douteux, une cupule imbibée de sérum physiologique, et laissée à température ambiante durant 24 heures, ne montre aucun virement de couleur. Le test change donc de couleur uniquement quand il est en présence d'enzymes à activité uréasique. Les échantillons douteux seraient alors à compter parmi les positifs. Bien sûr, cela ne préjuge en rien du genre des bactéries présentes.

Tab.6. Résultats du test uréase à 30 minutes et à 24 heures (n=2 chats) :

| CHATS | - | douteux | + |
|-----------------------|---|---------|---|
| Résultats à 30 min | 1 | 1 | 0 |
| Résultats à 24 heures | 1 | 0 | 1 |

A 30 minutes, **1 des chats** testés était **négatif**, l'autre n'était pas franchement positif.

A 24 heures, **1 chat** restait **négatif** et l'autre devenait **positif**.

3.2. RESULTATS DES COLORATIONS DE WARTHIN-STARRY :

***CHIENS :**

(Tab.7.)

Sur les 36 chiens prélevés au départ, seules 30 lames d'antre et 33 lames de corps ont pu être analysées. Les raisons de ces manques ont été :

- Warthin-starry non demandé en début d'année et n'ayant pu être fait par la suite par manque de matériel de biopsie restant inclus en paraffine.
- Prélèvement n'ayant pu être effectué le jour de l'endoscopie lors d'anesthésie difficile (on privilégiait alors les biopsies à visée diagnostique).

Tab.8. Densité de l'infection par les hélicobactéries chez le chien :

| | ANTRE | CORPS/FUNDUS |
|----------------|--------------|---------------------|
| Absence | 8 | 4 |
| Léger | 14 | 12 |
| Modéré | 5 | 11 |
| Sévère | 3 | 6 |
| Nombre de cas | 30 | 33 |
| TOTAL présence | 22/30 | 29/33 |

- Ainsi les hélicobactéries étaient présentes dans l'antre pylorique pour 22 des 30 chiens et présentes dans la partie corps/fundus pour 29 des 33 chiens.
- Au total, seuls 2 chiens sur les 36 n'ont pas été testés du tout par cette méthode puisque aucune lame issue de leurs biopsies n'avait pu être colorée au Warthin-starry.
- Tous les chiens dont une seule des 2 zones avait pu être testée montraient des hélicobactéries sur cette unique lame.
- Sur les 34 chiens testés sur au moins 1 des 2 zones de l'estomac, seuls 4 étaient totalement négatifs. La prévalence de l'infection chez le chien dans notre étude par cette méthode était ainsi de 30/34.

Tab.7. Résultats des coloration de Warthin-Starry chez les chiens :

| CHIENS | WS antre | WS corps | Densité |
|--------|-------------|-------------|---------|
| 1 | + | + | 1 |
| 2 | + | + | 1 |
| 3 | + | + | 1 |
| 4 | + | + | 1 |
| 5 | + | + | 1 |
| 6 | + | + | 1 |
| 7 | - | + | 0 |
| 8 | NR | + | NR |
| 9 | + | + | 3 |
| 10 | - | + | 0 |
| 11 | + | + | 1 |
| 12 | + | + | 1 |
| 13 | + | NR | 1 |
| 14 | + | + | 2 |
| 15 | + | + | 1 |
| 16 | + | + | 1 |
| 17 | - | - | 0 |
| 18 | + | + | 3 |
| 19 | + | + | 2 |
| 20 | NR | NR | NR |
| 21 | - | - | 0 |
| 22 | - | - | 0 |
| 23 | - | + | 0 |
| 24 | + | NR | 2 |
| 25 | - | - | 0 |
| 26 | + | + | 1 |
| 27 | NR | + | NR |
| 28 | + | + | 2 |
| 29 | - | + | 0 |
| 30 | NR | NR | NR |
| 31 | + | + | 1 |
| 32 | + | + | 1 |
| 33 | NR | + | NR |
| 34 | + | + | 3 |
| 35 | + | + | 2 |
| 36 | NR | + | NR |
| | | | |

Légende :

+ positif
- négatif

1 = grade léger
2 = grade modéré
3 = grade sévère

Des lames à la fois d'antre et de corps/fundus étaient disponibles pour 24 des chiens positifs : sur ceux-ci, la densité de l'infection a été comparée sur les 2 zones, comme le montre le tableau ci-dessous.

Tab.9. Densité de l'infection selon les sites (A=antre, C=corps, F=fundus) :

| Densité | A > C/F | A = C/F | A < C/F |
|----------------------|-------------|--------------|--------------|
| Nombre de cas (n=28) | 1/24 | 16/24 | 11/24 |

- La densité de l'infection est donc le plus souvent identique entre l'antre et la zone corps/fundus.
- L'antre est exceptionnellement infecté de manière plus importante que le reste de l'estomac dans cette étude.

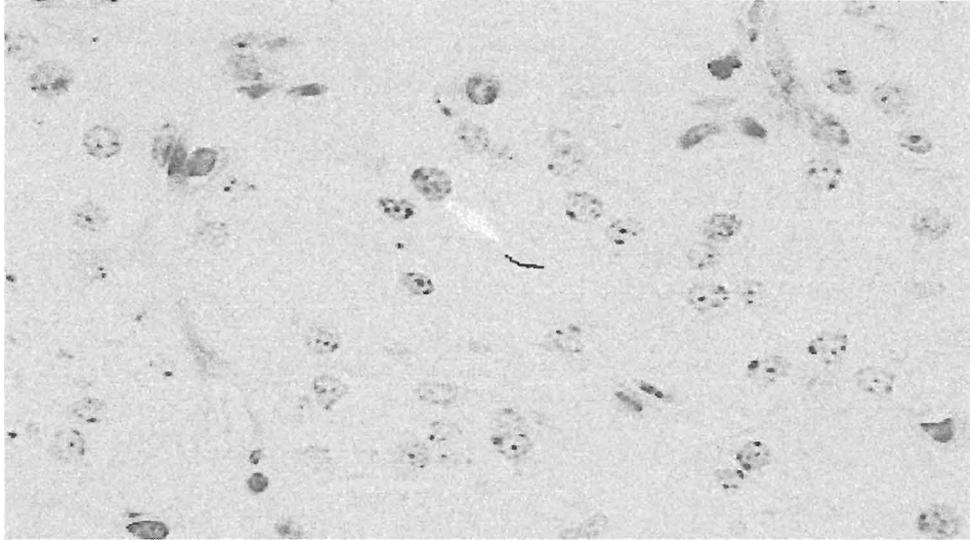
Qualité de infection par les hélicobactéries chez le chien :

- l'infection a été notée **mixte dans 14 cas sur 30 positifs.**
- elle ne comportait que des GHLO's de grande taille dans 13 cas sur 30.
- elle ne comportait que des GHLO's de petite taille dans 3 cas sur 30.

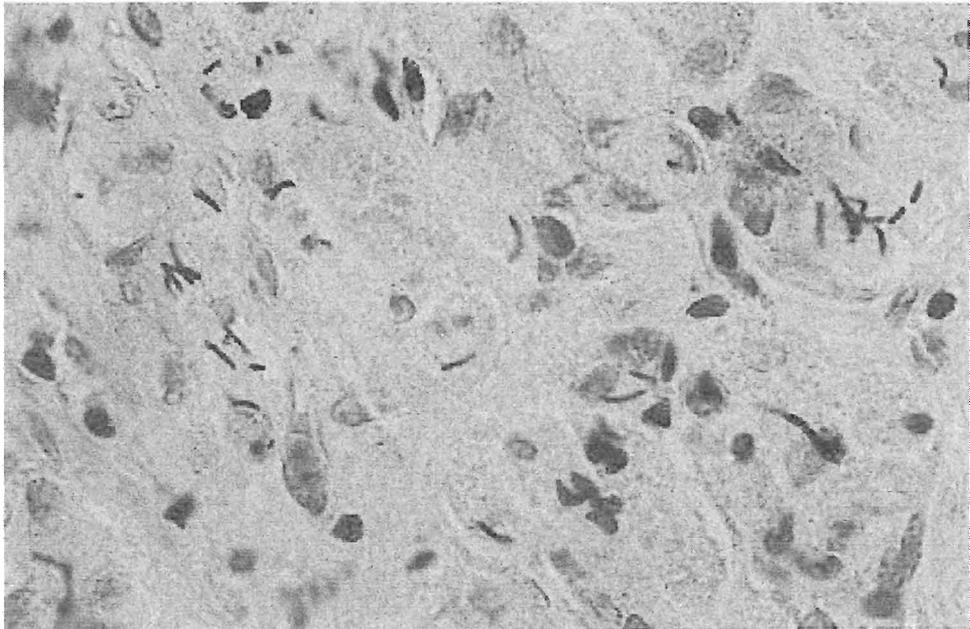
***CHATS :**

Tab.10. Résultats des coloration de Warthin-Starry chez les chats :

| CHATS | WS antre | WS corps |
|-------|----------|----------|
| A | + | + |
| B | + | + |
| C | - | - |
| D | NR | + |



Helicobacter de grande taille et isolé dans l'épithélium gastrique d'un chien, coloration de Warthin-Starry.



Hélicobactéries nombreuses et de tailles variables dans l'épithélium gastrique d'un chien, coloration de Warthin-Starry.

Tab.11. Densité de l'infection par les hélicobactéries chez le chat :

| | ANTRE | CORPS |
|----------------|--------------|--------------|
| Absence | 1 | 1 |
| Léger | 1 | 1 |
| Modéré | 0 | 1 |
| Sévère | 1 | 1 |
| Nombre de cas | 3 | 4 |
| TOTAL présence | 2/3 | 3/4 |

- Ainsi, **3** des 4 individus étudiés étaient **positifs** par le Warthin-starry.
- Un des cas ne montrait pas la même densité dans l'antre et le corps/fundus ; l'antre était plus sévèrement infecté.

Qualité de l'infection par les hélicobactéries chez le chat :

- L'infestation a été observée comme **mixte dans 2 cas sur 4.**
- Les 2 autres cas ne montraient que des HLO's de grande taille.

3.3. RESULTATS DES ANALYSES HISTOLOGIQUES :

3.3.1. Analyse des biopsies des chiens :

Tab.12. Les lésions gastriques de 36 chiens (31 lames d'antre et 36 de corps)

| Type de gastrite | Antre | Corps/Fundus |
|------------------|-------|--------------|
| Absence | 7 | 17 |
| Aiguë | 0 | 0 |
| Chronique | 18 | 15 |
| Forme spéciale | 6 | 4 |

Les formes spéciales notées dans cette étude étaient toutes des gastrites éosinophiliques, excepté un cas de calcinose gastrique sur une jeune chienne Berger allemand.

Aucun chien ne souffrait de gastrite aiguë.

3.3.2. Lésions histologiques observées :

Tab.13. Principales lésions histologiques notées chez les 36 chiens :

| GASTRITE | | CHIENS | |
|--------------|---------------------|--------|--------------|
| | | Antre | Corps/Fundus |
| INFLAMMATION | Léger | 12 | 11 |
| | Modéré | 7 | 3 |
| | Sévère | 1 | 0 |
| ATROPHIE | Léger | 8 | 2 |
| | Modéré | 3 | 2 |
| | Sévère | 2 | 1 |
| ACTIVITE | Léger | 11 | 4 |
| | Modéré | 2 | 1 |
| | Sévère | 0 | 0 |
| AUTRES | Nodules lymphoïdes | 5 | 8 |
| | Fibroplasie superf. | 1 | 2 |
| | Fibroplasie imp. | 1 | |
| | Œdème du chorion | 1 | 1 |
| | Calcinose gastrique | 1 | 1 |

Aucune gastrite d'activité sévère n'a été recensée puisqu'elle étaient toutes chroniques et non aiguës. Des nodules lymphoïdes ont été fréquemment notés dans la zone corps/fundus, alors que leur localisation est plus classiquement la zone antro-pylorique chez le chien.

Les modifications histologiques observées étaient majoritairement de grade léger.

2 animaux présentaient une gastrite chronique atrophique dont l'intensité était sévère dans l'antra pylorique, et 1 où elle était sévère dans le corps/fundus.

Un des chiens présentant une gastrite atrophique sévère dans l'antra, montrait également dans cette zone une inflammation sévère associée à une hyperplasie lymphoïde focale : la conclusion histopathologique était pour cet animal une gastro-entérite lymphoplasmocytaire d'intensité moyenne à marquée. Ce chien avait un score de densité de l'infection par les hélicobactéries (Warthin Starry) léger dans chaque zone de l'estomac.

CHATS :

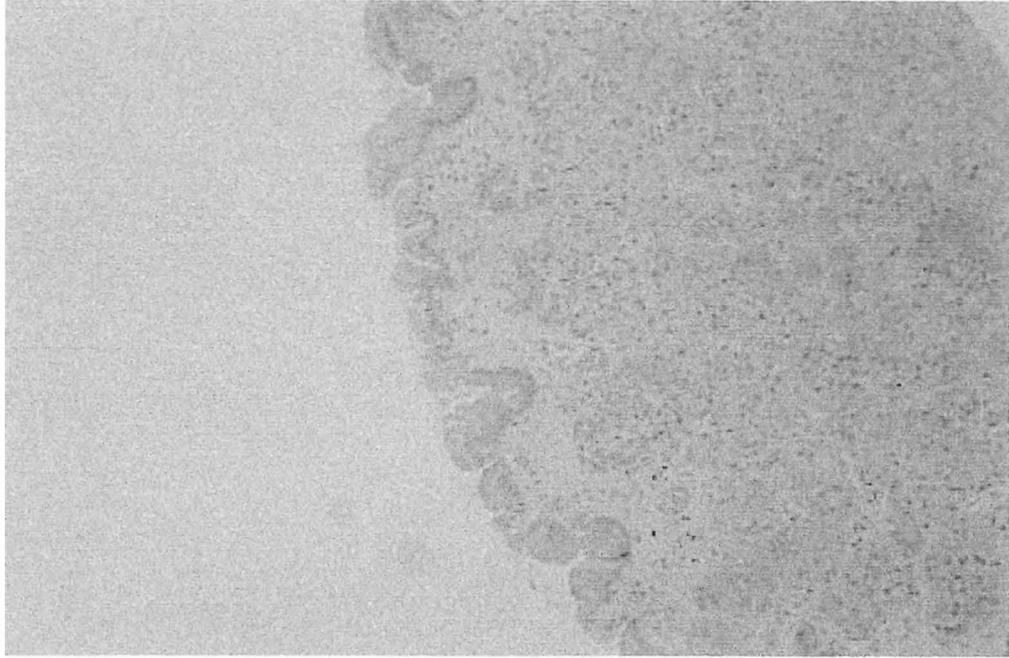
Tab.14. Les lésions gastriques de 4 chats (3 lames d'antra et 3 de corps) :

| Type de gastrite | Antra | Corps/Fundus |
|-------------------------|--------------|---------------------|
| Absence | 0 | 1 |
| Aiguë | 0 | 0 |
| Chronique | 2 | 2 |
| Forme spéciale | 1 | 1 |

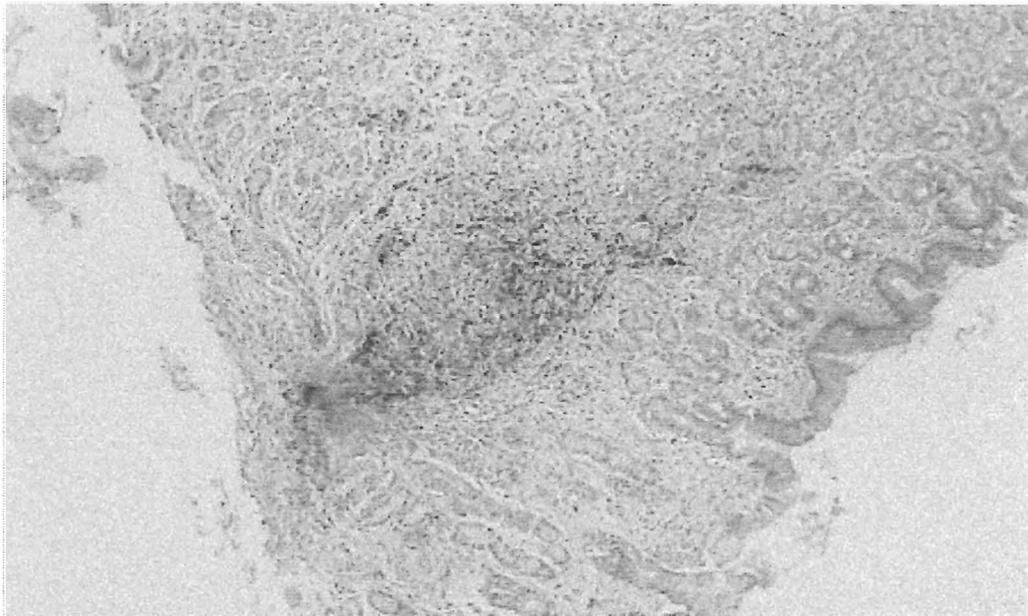
La forme spéciale était un cas de lymphome digestif chez une chatte.

Tab.15. Principales lésions histologiques notées chez les 4 chats :

| GASTRITE | | CHATS | |
|---------------------|---------------------|--------------|--------------|
| | | Antra | Corps |
| INFLAMMATION | Léger | 0 | 1 |
| | Modéré | 2 | 1 |
| | Sévère | 0 | 0 |
| ATROPHIE | Léger | 1 | |
| | Modéré | 1 | 1 |
| | Sévère | 0 | 0 |
| ACTIVITE | Léger | 0 | 1 |
| | Modéré | 1 | 0 |
| | Sévère | 0 | 0 |
| AUTRES | Nodules lymphoïdes | 2 | 0 |
| | Fibroplasie superf. | 0 | 0 |
| | Fibroplasie imp. | 0 | 0 |
| | Œdème du chorion | 0 | 0 |



Fibrose superficielle de l'épithélium gastrique fundique chez un chien.



Nodule lymphoïde dans l'antra pylorique d'un chien.

3.3. RESULTATS DE LA PCR :

Tab.16. Résultats de la PCR chez 36 chiens et 4 chats :

| CHIENS | PCR Antre | PCR Corps | PCR Fundus |
|--------|-----------|-----------|------------|
| 1 | + | + | + |
| 2 | +(faible) | + | + |
| 3 | + | + | + |
| 4 | +(faible) | + | + |
| 5 | +(faible) | + | + |
| 6 | + | + | + |
| 7 | + | + | + |
| 8 | + | + | + |
| 9 | - | + | + |
| 10 | - | + | + |
| 11 | - | - | - |
| 12 | - | + | + |
| 13 | + | + | + |
| 14 | + | + | + |
| 15 | + | + | + |
| 16 | + | + | + |
| 17 | + | + | + |
| 18 | + | + | + |
| 19 | + | + | + |
| 20 | - | +(faible) | - |
| 21 | +(faible) | + | + |
| 22 | - | - | - |
| 23 | - | + | + |
| 24 | + | + | + |
| 25 | + | + | + |
| 26 | + | + | + |
| 27 | - | + | - |
| 28 | + | + | + |
| 29 | - | + | + |
| 30 | - | + | + |
| 31 | - | + | + |
| 32 | + | + | + |
| 33 | + | + | + |
| 34 | + | + | + |
| 35 | - | + | + |
| 36 | + | + | + |

CHATS :

| | | | |
|---|----|----|----|
| A | + | + | + |
| B | + | + | + |
| C | - | - | - |
| D | NR | NR | NR |

Les prélèvements étaient positifs si leur gel d'électrophorèse faisait apparaître la bande de 412 pb attendue. Le témoin positif utilisé était une souche d'*Helicobacter mustelae*, les amorces utilisées étant spécifiques du genre *Helicobacter*. Le témoin négatif était de l'eau stérile.

Résultats de PCR :



De gauche à droite : Marqueur de poids moléculaire

Témoin négatif

Témoin positif

Prélèvements antre pylorique des chiens n° 13, 14, 15, 16 positifs

Prélèvements antre pylorique des chiens n° 29, 30 négatifs

Prélèvements antre pylorique des chiens n° 18, 19, 24, 25 positifs

Tab. 17. Tableau récapitulatif :

| | ANTRE | CORPS | FUNDUS |
|---------|--------------|--------------|---------------|
| Négatif | 12 | 2 | 4 |
| Positif | 24 | 34 | 32 |

Les résultats de notre étude PCR montrent que **24/36** chiens sont positifs dans l'antre pylorique, **34/36** sont positifs dans le corps de l'estomac, et **32/36** sont positifs dans la région du fundus.

Les 2 chiens négatifs dans le corps sont aussi négatifs dans l'antre et le fundus.

Ainsi, sur les trente six chiens dont les prélèvements été testés par PCR, seuls 2 étaient négatifs.

Tous les chiens positifs dans l'antre sont systématiquement positifs dans le corps et le fundus.

Sur les 34 chiens positifs dans le corps, 2 étaient négatifs dans le fundus.

Les 4 chiens négatifs dans le fundus étaient également négatifs dans l'antre pylorique. 2 de ces 4 chiens étaient positifs uniquement dans le corps, dont 1 très faiblement.

CHATS :

| | ANTRE | CORPS | FUNDUS |
|---------|--------------|--------------|---------------|
| Négatif | 1 | 1 | 1 |
| Positif | 2 | 2 | 2 |

Sur les trois individus testés, deux étaient positifs par cette technique ;chacun donnant des **résultats identiques dans les trois zones de l'estomac** étudiées. Le chat négatif en PCR avait été trouvé négatif également par les autres méthodes diagnostiques.

Tab.18. Bilan des résultats des 3 tests :

CHIENS

| CHIENS | Uréase 30 min. | Uréase 24 h | PCR Antre | PCR Corps | PCR Fundus | WS antre | WS corps |
|--------|----------------------|----------------|-----------|-----------|---------------|-------------|-------------|
| 1 | NR | NR | + | + | + | + | + |
| 2 | + | ++++ | + | + | + | + | + |
| 3 | + | ++++ | + | + | + | + | + |
| 4 | +/- | ++++ | + | + | + | + | + |
| 5 | ++++ | ++++ | + | + | + | + | + |
| 6 | NR | NR | + | + | + | + | + |
| 7 | NR | NR | + | + | + | - | + |
| 8 | NR | NR | + | + | + | NR | + |
| 9 | + | ++++ | - | + | + | + | + |
| 10 | NR | NR | - | + | + | - | + |
| 11 | - | - | - | - | - | + | + |
| 12 | - | - | - | + | + | + | + |
| 13 | + | ++++ | + | + | + | + | NR |
| 14 | ++++ | ++++ | + | + | + | + | + |
| 15 | ++++ | ++++ | + | + | + | + | + |
| 16 | + | ++++ | + | + | + | + | + |
| 17 | NR | NR | + | + | + | - | - |
| 18 | + | ++++ | + | + | + | + | + |
| 19 | NR | NR | + | + | + | + | + |
| 20 | NR | NR | - | + | - | NR | NR |
| 21 | + | ++++ | + | + | + | - | - |
| 22 | - | - | - | - | - | - | - |
| 23 | +/- | ++++ | - | + | + | - | + |
| 24 | ++++ | ++++ | + | + | + | + | NR |
| 25 | NR | NR | + | + | + | - | - |
| 26 | + | ++++ | + | + | + | + | + |
| 27 | - | + | - | + | - | NR | + |
| 28 | + | ++++ | + | + | + | + | + |
| 29 | +/- | ++++ | - | + | + | - | + |
| 30 | NR | NR | - | + | + | NR | NR |
| 31 | - | +/- | - | + | + | + | + |
| 32 | + | ++++ | + | + | + | + | + |
| 33 | ++++ | ++++ | + | + | + | NR | + |
| 34 | ++++ | ++++ | + | + | + | + | + |
| 35 | + | ++++ | - | + | + | + | + |
| 36 | NR | NR | + | + | + | NR | + |

CHATS

| | | | | | | | |
|---|----|------|----|----|----|----|---|
| A | + | ++++ | + | + | + | + | + |
| B | NR | NR | + | + | + | + | + |
| C | - | - | - | - | - | - | - |
| D | NR | NR | NR | NR | NR | NR | + |

4. DISCUSSION :

4.1. COMPARAISON DES RESULTATS DES DIFFERENTS TESTS CHEZ LE CHIEN : (Tab.18)

L'étude réalisée à l'ENVT avait pour premier objectif la mise au point d'une technique de PCR, permettant la détection de l'infection par les hélicobactéries. Afin d'en éprouver l'efficacité, nos résultats de PCR étaient comparés à ceux obtenus par d'autres méthodes déjà utilisées, qu'étaient le test uréase et le Warthin-starry.

4.1.1. Comparaison test uréase à 24 heures/PCR (corps) :

| CHIENS | PCR + | PCR - |
|----------|-------|-------|
| UREASE + | 22 | 0 |
| UREASE - | 1 | 2 |

Le test uréase est comparé aux résultats de la PCR dans le corps car les prélèvements pour l'uréase étaient réalisés dans cette zone.

- Tous les chiens qui étaient positifs en uréase à 24 heures étaient aussi positifs sur une des 3 zones en PCR.
- Les 2 chiens négatifs sur les 3 zones en PCR étaient également négatifs par le test à l'uréase.
- Sur les 3 chiens négatifs en uréase à 24 heures, 1 chien était positif par PCR dans le corps et le fundus.
- Tous les cas positifs en PCR sur les 3 zones de l'estomac étaient systématiquement positifs en uréase dès 30 minutes, avec une réaction colorée déjà maximale pour la moitié d'entre eux, ce qui est en faveur d'une infection très importante.
- Aucun chien n'est donné positif en uréase et négatif sur toutes les zones en PCR ; il n'y a donc pas eu de réaction positive du test uréase provoquée par une bactérie Uréase + autre qu'*Helicobacter*. Il n'y a donc à priori pas de faux positif par le test à l'uréase dans cette étude.

4.1.2. Comparaison test uréase à 24 H/Warthin-Starry :

La comparaison est faite avec le Warthin-Starry du corps pour les mêmes raisons que ci-dessus.

| CHIENS | WS + | WS - |
|---------------|-------------|-------------|
| UREASE + | 19 | 1 |
| UREASE - | 2 | 1 |

Le test uréase révèle 3 chiens négatifs à 24 heures, le Warthin-Starry sur la zone corps/fundus en donne 4.

1 seul chien négatif est commun à ces 2 tests : c'est le même chien donné négatif par la PCR. Concernant les 2 chiens positifs par Warthin-Starry et négatifs par le test uréase, l'un avait un score de densité de l'infection de léger, l'autre modéré. La différence tient probablement uniquement à la localisation du prélèvement.

Le test uréase apparaît comme un test assez fiable, peu coûteux donnant peu de faux négatifs, et pas de faux positif dans cette étude. Il permet d'avoir une idée de la positivité dans la première demi-heure qui suit le prélèvement mais ses résultats sont affinés quand la lecture est faite à 24 heures.

Il doit cependant avoir été réalisé dans une zone où la probabilité de présence des hélicobactéries est la plus grande.

4.1.3. Comparaison Warthin-Starry/PCR :

Tab.19. Bilan des résultats de Warthin-Starry et de PCR :

| Tests effectués | résultats | |
|-----------------|-----------|-------|
| | + | - |
| WS antre | 22/30 | 8/30 |
| PCR antre | 24/36 | 12/36 |
| WS corps/fundus | 28/32 | 4/32 |
| PCR corps | 34/36 | 2/36 |
| PCR fundus | 32/36 | 4/36 |

- Il y a donc comparativement davantage de résultats positifs dans l'antre par le Warthin-Starry ($22/30=0.73$) que par la PCR ($24/36=0.66$).
- Il y a plus de positifs dans le corps par PCR ($34/36=0.94$) que par le Warthin-Starry ($28/32=0.87$).
- Ces 2 méthodes sont par contre équivalentes en nombre de résultats positifs quand on compare la PCR effectuée dans le fundus ($23/36=0.88$) au Warthin-Starry effectué dans la zone regroupant corps et fundus.

Ces résultats peuvent en partie être expliqués par le nombre plus important de biopsies prélevées et conservées pour le Warthin-Starry car ce sont les mêmes qui étaient utilisées pour l'histologie. Le diagnostic histologique requiert un nombre minimal de biopsies pour pouvoir être représentatif (environ 5 par zone alors que seulement 3 par zone pour la PCR).

D'autre part, à l'histologie, le corps étant peu différent du fundus, les résultats du Corps au Warthin-Starry sont en réalité les résultats à la fois du Corps et du Fundus.

Se pose donc ici une des premières remarques quant à la préparation du matériel et méthode de l'expérimentation, puisque les 3 zones de l'estomac auraient dues être prélevées et conservées séparément aussi pour l'histologie et le Warthin-Starry. Ainsi la comparaison avec les résultats de la PCR aurait été plus précise.

Comparaison Warthin-starry/PCR dans l'antre :

| CHIENS | PCR + | PCR - |
|------------|-------|-------|
| WS antre + | 17 | 6 |
| WS antre - | 4 | 4 |

17 chiens sont positifs par les 2 tests dans l'antre.

Comparaison Warthin-starry/PCR dans le corps (C) et le fundus (F) :

| CHIENS | PCR C+ | PCR C- | PCR F+ | PCR F- |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| WS C/F+ | 27 | 1 | 27 | 4 |
| WS C/F - | 3 | 1 | 3 | 4 |

27 chiens sont positifs par les 2 tests dans le corps et dans le fundus.

Avec les lames de Warthin-Starry disponibles, il semble que la comparaison entre ce test et la PCR soit équivalente quelle que soit la zone entre corps et fundus choisie (PCR corps et fundus ne différant que de 2 chiens).

Parmi les 8 chiens négatifs dans l'antre au Warthin-Starry, 4 donnaient un résultat positif sur la PCR de l'antre. Parmi les 4 négatifs au Warthin-Starry dans la zone corps/fundus, 3 étaient positifs sur la PCR du corps et autant sur celle du fundus.

Il est donc probable que lors d'infection légère par les hélicobactéries, la coupe histologique puisse être faite sur une zone non ou peu infectée. La sensibilité de la détection par la méthode PCR est donc meilleure dans ces conditions que l'œil humain.

Le Warthin-Starry est donc une méthode diagnostique qui ne s'applique pas bien au dépistage de l'infection, mais couplée à la PCR, elle est riche de renseignements (densité de l'infection et localisation des hélicobactéries...). Pour l'évaluation semi-quantitative de l'infection, il est nécessaire d'avoir un prélèvement de très bonne qualité, ayant conservé le mucus de surface où les bactéries se concentrent, et effectué sur des zones où la probabilité de l'infection est la plus grande.

4.2. ANALYSE DES RESULTATS :

De ces résultats, d'autres données ont ensuite été exploitées : la question de prévalence de l'infection par les hélicobactéries dans notre population d'étude, les éventuelles répercussions cliniques de la présence de ces bactéries, la corrélation possible entre l'infection et les lésions histologiques observées.

4.2.1. Récapitulatifs des résultats :

Tab.20. Tableau récapitulatif des résultats de la population de chiens sains :

| CHIENS SAINS | Uréase 30 min. | Uréase 24 h | PCR Antre | PCR Corps | PCR Fundus | WS Antre | WS Corps | Inflam mation Antre | Inflam mation C/F |
|--------------|----------------|-------------|-----------|-----------|------------|----------|----------|---------------------|-------------------|
| 3 | + | ++++ | + | + | + | + | + | 0 | 0 |
| 5 | ++++ | ++++ | +(faible) | + | + | + | + | 0 | 0 |
| 13 | + | ++++ | + | + | + | + | NR | 0 | 0 |
| 14 | ++++ | ++++ | + | + | + | + | + | 0 | 0 |
| 16 | + | ++++ | + | + | + | + | + | 0 | 0 |
| 18 | + | ++++ | + | + | + | + | + | 0 | 0 |

Les 6 chiens sains ne présentaient aucun symptôme digestif ; leur histologie gastrique était systématiquement normale.

Tab.21 et 22. Symptômes cliniques, lésions histologiques et infection par les hélicobactéries :

Rq : Les formes spéciales ne sont pas comptabilisées dans les gastrites.

| ANTRE | WS + | WS - | PCR + | PCR - |
|-------------------------|------|------|-------|-------|
| Vomissements | 8 | 6 | 10 | 6 |
| Absence de vomissements | 8 | 2 | 14 | 6 |
| Diarrhée | 13 | 4 | 13 | 8 |
| Absence de diarrhée | 3 | 4 | 11 | 4 |
| Gastrite | 12 | 5 | 12 | 8 |
| Absence de gastrite | 2 | 1 | 8 | 0 |

| CORPS/FUNDUS | Uréase + à 24 H | Uréase - à 24H | WS + | WS - | PCR C + | PCR C - | PCR F + | PCR F - |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|------|------|------------|------------|------------|------------|
| Vomissements | 8 | 1 | 13 | 2 | 16 | 0 | 15 | 1 |
| Absence de vomissements | 14 | 2 | 10 | 2 | 18 | 2 | 17 | 3 |
| Diarrhée | 13 | 2 | 17 | 2 | 20 | 1 | 19 | 2 |
| Absence de diarrhée | 9 | 1 | 6 | 2 | 14 | 1 | 13 | 2 |
| Gastrite | 9 | 1 | 13 | 0 | 14 | 0 | 13 | 1 |
| Absence de gastrite | 10 | 2 | 8 | 4 | 16 | 2 | 16 | 2 |

De ces tableaux, plusieurs remarques sont à faire, tout en gardant la réserve nécessaire sur les conclusions pouvant être tirées d'un effectif comme le notre.

- Les résultats du tableau 22 soulignent qu'aucun chien négatif en PCR dans la zone du corps ne présente de vomissements, ni développe de gastrite dans cette zone. 1 seul chien négatif par PCR dans le fundus développe une gastrite et a des vomissements.

Dans l'antrum pylorique, 8 chiens négatifs en PCR présentent des lésions de gastrite, et 6 ont des vomissements.

Pour autant, si d'après ces tableaux, en l'absence d'infection dans le corps ou le fundus, le risque de développer une gastrite et de manifester des vomissements est très faible, le tableau 20, regroupant les résultats des chiens sains, montre bien que l'infection par les hélicobactéries n'est absolument pas synonyme de lésion de gastrite ni de vomissements chez les chiens de notre étude. En effet, tous les chiens de notre population saine sont positifs en *Helicobacter* sur les 3 zones de l'estomac, mais aucun n'a développé de gastrite.

- A la lecture des tableaux 21 et 22, il apparaît que la technique PCR révèle beaucoup plus d'animaux positifs que les autres tests, notamment que le Warthin-Starry (la différence dans la zone corps/fundus est moins importante avec les résultats du test à l'uréase), et ce surtout lorsqu'il s'agit des chiens qui ne présentent pas de vomissements, ni de diarrhée, ni de gastrite. En effet, le nombre de chiens trouvés positifs dans ces situations va du simple au double presque systématiquement entre Warthin-Starry et PCR.

Le dépistage de l'infection chez les animaux qui ne manifestent pas de signe clinique, ou qui ne développent pas de gastrite, est donc meilleur par la technique PCR, quelle que soit la zone de l'estomac étudiée.

- La diarrhée est un symptôme très fréquent dans la population étudiée. Il semblerait que quelle que soit la zone de l'estomac étudiée et quelle que soit la méthode utilisée, lorsque les chiens sont négatifs, ils présentent ou non de la diarrhée en proportion équivalente. Par contre, lorsque les chiens sont positifs, davantage ont de la diarrhée que ceux qui n'en n'ont pas.

Dans notre étude, la diarrhée est un symptôme qui accompagne fréquemment l'infection par les hélicobactéries.

Tab.23. Relation entre la présence de gastrite et les vomissements chez les chiens infectés.
(les formes spéciales ne sont pas prises en compte)

| ANTRE | Gastrite | Absence de gastrite |
|-------------------------|-----------------|----------------------------|
| Vomissements | 12 | 2 |
| Absence de vomissements | 8 | 7 |

| CORPS/FUNDUS | Gastrite | Absence de gastrite |
|-------------------------|-----------------|----------------------------|
| Vomissements | 9 | 5 |
| Absence de vomissements | 5 | 13 |

Les chiens qui vomissent ont pour la plupart une gastrite antrale, et sont assez nombreux à présenter aussi une gastrite dans la zone corps/fundus.

Lorsqu'il n'y a pas de lésion de gastrite, aussi bien dans l'antra que dans la zone corps/fundus, la majorité des chiens ne vomissent pas.

Certains chiens vomissent sans modification histologique de l'estomac : la cause de ces vomissements étant dans ces cas là une autre pathologie digestive. Précisément, les chiens concernés présentaient tous une entérite ou une entérocolite lymphoplasmocytaire d'intensité modérée à marquée.

4.2.2. Hélicobactériose et PCR :

Dans cette étude, seuls 2 chiens ont été trouvés négatifs sur les 3 zones de l'estomac par cette méthode.

Chaque fois qu'un chien était négatif dans la zone du corps, alors systématiquement l'antrum et le fundus étaient aussi négatifs.

Chaque fois qu'un chien était positif dans l'antrum, alors le corps et le fundus étaient aussi positifs.

Chaque fois qu'un chien était négatif dans le fundus, alors il était aussi négatif dans l'antrum mais pouvait être positif dans le corps (2 fois sur 4, dont 1 très faiblement).

La plupart des chiens positifs dans le corps étaient aussi positifs dans le fundus (2 chiens sur 34 étaient négatifs dans le fundus).

La technique PCR est celle qui dépiste le plus d'animaux positifs, donc la plus sensible ; cette sensibilité permet de conclure au fait que l'antrum pylorique est la zone la moins fréquemment infectée par les hélicobactéries, et que lorsqu'elle l'est, alors les autres zones de l'estomac le sont systématiquement. Le corps est la zone la plus souvent infectée, donc si le corps est négatif, les autres zones le seront également.

C'est la méthode de dépistage de choix notamment chez les animaux sans symptôme clinique et sans lésion histologique de gastrite.

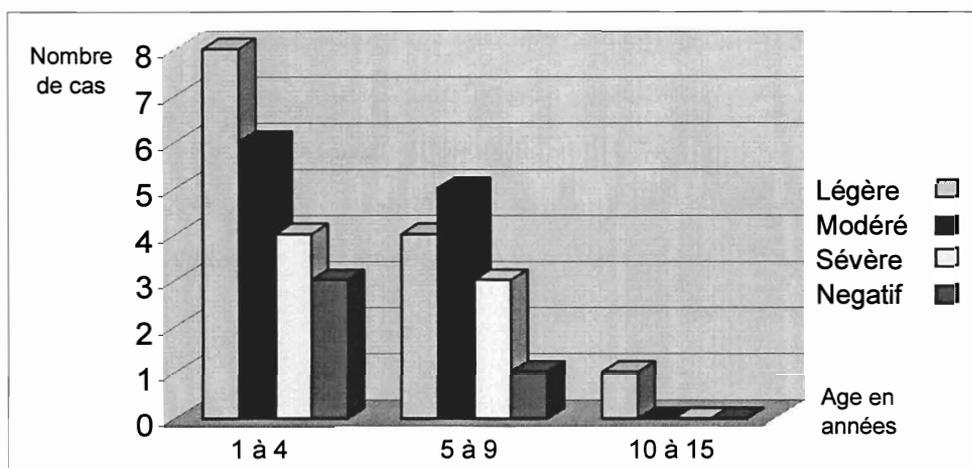
La technique PCR utilisée est une technique qui a connu un développement très rapide. Mais derrière une grande simplicité dans son principe et sa réalisation, elle requiert une organisation particulière des laboratoires, une connaissance des erreurs possibles (par exemple la contamination par les produits des amplifications précédentes), et surtout une grande expérience. Elle rend possible les recherches à partir d'échantillons de quelque nature et quelle que soit la quantité (tâche de sang, toutes sortes de sécrétions, prélèvements inclus en paraffine, cadavres...). La taille de la séquence à amplifier est un facteur limitant (\leq à 3 kb), mais elle reste la technique qui nécessite le moins de matériel parmi les 3 techniques étudiées.

Toute question d'interprétation de densité du signal obtenu ne pouvait se poser dans notre étude puisque la quantité de matériel obtenu par biopsie lors des endoscopies était dépendant de plusieurs facteurs. En effet, même en utilisant des pinces à biopsies identiques, et en

prélevant dans des endroits identiques, la quantité de matériel final était toujours très différente selon que la muqueuse est fragilisée ou non par une pathologie quelconque : la quantité d'ADN déposé au départ était très inégale, comme en témoignent les restes d'ADN plus ou moins importants, visibles après migration dans les puits de dépôt d'échantillon du gel (annexes). D'autre part, l'antré pylorique chez les carnivores domestiques est toujours une zone où la muqueuse semble moins élastique et de ce fait plus difficile à biopsier. Enfin, le système de fixation des biopsies destinées à la PCR sur des films radiologiques ne s'est pas avéré être un système optimal car beaucoup de mucus reste collé au film en séchant, or ce mucus est très riche en hélicobactéries. Ceci pourrait être amélioré en déposant les biopsies destinées à la PCR directement dans les tubes qui serviront à la digestion enzymatique.

4.2.3. Caractéristiques de l'infection par les hélicobactéries :

Tab.24. Sévérité de l'infection selon l'âge des animaux :



Sévérité de l'infection en fonction de l'âge

Cette analyse permet de savoir si les animaux domestiques ont tendance à être contaminés dès leur jeune âge ou si la sévérité de l'infection augmente avec l'âge. Elle a été faite à partir des

résultats des Warthin-Starry qui sont les seuls à donner une indication semi-quantitative de l'infection.

Les chiens âgés étaient peu représentés dans notre étude ; mais il ressort que l'infection par les hélicobactéries est déjà présente chez de nombreux jeunes chiens, principalement sous sa forme la moins sévère.

L'étude de l'âge auquel les chiens contractent l'infection est à mettre en relation avec l'infection des enfants par *Helicobacter pylori*. En effet, les enfants ne développent que très rarement de lésions gastriques. La durée du portage, réduite chez le chien du fait de son espérance de vie courte, pourrait être un facteur influençant l'apparition ou non de lésions.

Chez la personne âgée par exemple, les gastrites atrophiques sont fréquentes ; mais lorsque *Helicobacter pylori* est présent, faut-il conclure à un effet de la bactérie dans le vieillissement gastrique (38) ou à une évolution inéluctable de la muqueuse gastrique ?

La prévalence de l'infection par les hélicobactéries dans cette étude était de 30 positifs /34 chiens par la coloration de Warthin-Starry, de 22 positifs /25 par le test uréase, et de 34 positifs /36 par la PCR toutes zones confondues.

C'est une prévalence très importante, qui correspond aux valeurs de la littérature.

Les 6 chiens sains de cette expérimentation étaient des chiens âgés de 4 à 10 ans, vivant ensemble en chenil ; tous les 6 étaient positifs par tous les tests. Le Warthin-Starry a montré que chez ces chiens, la densité de l'infection était légère chez 4 d'entre eux, modérée chez 1, sévère chez le dernier, sans qu'aucune lésion de gastrite n'apparaisse.

D'autres études devront être faites en utilisant comme population saine de référence des chiens ne vivant pas en chenil, de propriétaires différents. En effet, peut-être l'absence de lésion chez nos 6 chiens est-elle liée à l'espèce d'*Helicobacter* en cause, qui est probablement la même chez ces chiens contaminés au chenil.

La prévalence des hélicobactéries chez le chien est très importante et est à comparer avec la prévalence à *Helicobacter pylori* observée dans les pays sous-développés où elle atteint 80 à 90% , et où l'infection s'acquiert tout au long de la vie des personnes. Dans les pays développés, en raisons des conditions d'hygiène différentes, la prévalence est de 30 à 50%, l'infection étant plutôt acquise en bas âge. En France, elle est inférieure à 30% sauf dans la tranche 20-30 ans où elle atteint 33% (48).

4.2.4. Les futures méthodes de dépistage :

Il existe déjà d'autres techniques non utilisées ici, qui ne peuvent pas toutes être utilisées facilement chez le chien et le chat : le test respiratoire par exemple n'est utilisable sur des animaux vigiles que si ces derniers sont très coopératifs ou habitués à être manipulés. Dans le cas où il serait réalisé sur des animaux endormis, il présente peu d'avantages par rapport au test uréase par exemple car nécessite plus de personnel, de matériel de temps, et d'argent. Une nouvelle technique par contre, tout juste mise au point en médecine humaine et prochainement commercialisée, sera d'une grande utilité en médecine vétérinaire car permettra la détection des bactéries directement dans les selles : c'est le test HPSA (26) (*Helicobacter pylori* stools antigens, Meridian Diagnostics), ne nécessitant pas de conservation particulière, réalisable dans les 48 heures suivant la récolte des selles par le propriétaire. Ceci permettra un screening efficace dans la population canine et féline. Pour le moment, ce test n'est utilisable que pour la détection d'*Helicobacter pylori* car il repose sur la recherche d'antigènes spécifiques d'espèce. Le marché vétérinaire ne suffira peut-être pas à la commercialisation de différents tests comme celui-ci adaptés aux espèces rencontrées chez les animaux.

4.3. LES MODELES ANIMAUX DE L'INFECTION PAR *HELICOBACTER* :

Les modèles animaux et Helicobacter pylori :

L'intérêt porté aux animaux est avant tout lié à la nécessité d'obtenir un modèle d'étude pour l'infection humaine par *Helicobacter pylori*.

Un modèle de souris non germ-free et euthymiques a été développé. Elles sont inoculées avec des *Helicobacter pylori* isolés de biopsies gastro-duodénales humaines fraîches. Ce modèle semble très efficace pour l'étude des vaccinations préventives et thérapeutiques, des traitements antimicrobiens, de la pathogénie de l'infection...Mais l'inconvénient de ce modèle animal est sa taille et la nécessité de les euthanasier pour étudier leur tractus digestif : d'où l'impossibilité d'étudier sur un même individu les modifications histologiques lors d'infection chronique et les effets de traitements ou de régimes immunisants. D'autres modèles ont été proposés pour l'infection par *Helicobacter pylori*, dont souvent des espèces maintenues en conditions particulières, comme par exemple des porcelets gnotobiotiques, des

chats SPF (Specific Pathogen Free), des souris athymiques ou germ-free ...Mais le maintien de ces animaux dans de telles conditions est difficile (37).

Les Beagles sont des chiens pouvant plus facilement être maintenus en conditions gnotobiotiques pendant plusieurs années, et qui de plus n'ont pas la propension à développer spontanément des ulcères (lésion très recherchée dans l'évolution de l'infection) (34), ce qui les laisse apparaître comme un modèle satisfaisant. Certains chercheurs ont en outre montré qu'ils pourraient développer une forme aiguë d'infection semblable à ce qui est rencontré chez l'Homme (37), ainsi qu'une gastrite chronique à cellules mononucléées similaire à celle de l'enfant (24).

Les helicobactéries des animaux :

Les Beagles gnotobiotiques sont également utilisés pour étudier la pathogénie des différentes espèces d'hélicobactéries rencontrées chez nos carnivores domestiques, notamment pour *Helicobacter felis* qui est suspecté entraîner des gastrites chroniques chez la souris. En étudiant cette espèce chez son hôte naturel et dans des conditions de non exposition à d'autres microbes de l'environnement, il n'y a alors pas de doute possible quant à l'origine des lésions éventuellement développées (24).

Les hélicobactéries et le risque de zoonose :

L'étude des hélicobactéries chez les carnivores domestiques est aussi attendue par les perspectives écologiques qu'elle entraîne. En effet, quelques cas de chats et de singes *Cynomolgus* (35) naturellement infectés par *Helicobacter pylori* ont été recensés ainsi que quelques infections humaines par *Helicobacter felis* ou *Helicobacter heilmanii*.

Connaître leur prévalence dans les différentes populations d'animaux domestiques permet d'envisager un risque possible pour la santé publique (19).

Les recherches menées actuellement chez l'Homme :

Chez l'Homme, *Helicobacter pylori* est aujourd'hui à l'origine de 60 à 80% des ulcères gastriques et de 90% des ulcères duodénaux. La récurrence fréquente de l'infection sur des personnes traitées amène donc à devoir préciser s'il s'agit d'une réelle récurrence par le même agent, ou s'il s'agit d'une réinfection par un autre. La technique la plus discriminante est la REA (restriction endonuclease analysis) couplée la PCR. Elle a permis de montrer la grande diversité du génome d'*Helicobacter pylori* (3).

Les taux d'éradication dans le monde avec l'association IPP (inhibiteurs des pompes à protons) + 2 antibiotiques (Amoxicilline ou Clarithromycine + Métronidazole) pendant 7 jours est supérieur à 90% sauf en France où il n'est que de 56 à 84%. Les enquêtes menées à ce sujet suggèrent que le seul facteur ayant une influence négative sur ce pourcentage serait le lieu de naissance hors de France, car l'éradication est avant tout fonction de la sensibilité des souches aux antibiotiques (6). Depuis la conférence de consensus de 1995 sur *Helicobacter pylori*, les anti-H2 ne sont plus utilisés et 90% des prescriptions sont :

IPP double dose + Amox 1g 2 fois/j +Clarit 500mg 2 fois/j pendant 7j. (11)

Des thérapies adjuvantes non antibiotiques sont de plus en plus mises en avant ; l'ingestion régulière d'ail, de légumes, de fruits aurait un effet préventif sur l'infection. D'autres substances comme le piment rouge et le thé vert ont montré avoir un effet inhibiteur sur les bactéries in vitro. Enfin, l'ingestion régulière de produits fermentés par des souches particulières de Lactobacillus diminuerait l'infection et le degré d'inflammation gastrique. D'ailleurs, dans les pays fortement consommateurs de yaourts, la prévalence de l'infection n'est pas moindre mais il y a moins de maladies associées à l'infection (5). Aucune étude de ce type n'a été réalisée chez les carnivores domestiques !

Les hélicobactéries chez l'enfant :

Posologies des traitements utilisés chez l'enfant : (11)

| Thérapie | 15 < Poids < 30 kgs | Poids > 30 kgs |
|------------------------|------------------------|------------------------|
| Oméprazole | 10 mg 2 fois/j | 20 mg 2 fois/j |
| Amoxicilline | 50 mg/kg/j en 2 prises | 50 mg/kg/j en 2 prises |
| Clarithromycine | 15 mg/kg/j en 2 prises | 15 mg/kg/j en 2 prises |

Ces posologies seraient peut-être à adapter aux animaux, d'autant plus que l'on ne rencontre pas d'ulcère chez l'enfant et que la gastrite est discrète ou absente, ce qui semble se rapprocher de ce qu'on observe chez les carnivores domestiques.

CONCLUSION :

Aujourd'hui, les hélicobactéries et leur pouvoir pathogène commencent à être mieux connus : l'implication d'*Helicobacter pylori* dans la genèse d'ulcères gastro-duodénaux ou de lymphomes par exemple, semble admise chez l'Homme. L'avancée de la recherche concernant le pouvoir pathogène des différentes espèces d'hélicobactéries permettra de préciser le risque potentiel de zoonose auquel sont soumis les propriétaires de chiens et de chats reconnus infectés.

C'est pourquoi la mise au point de tests fiables et facilement réalisables permettant la détection des hélicobactéries chez les carnivores domestiques, est un sujet d'actualité.

L'étude menée durant l'année 1999 à l'ENVT a permis la mise au point d'une technique de PCR, qui s'est avérée plus sensible que les autres tests utilisés jusqu'alors (test uréase, coloration de Warthin-starry).

La prévalence de l'infection dans notre population de chiens de propriétaires malades, ainsi que chez 6 chiens sains vivant en chenil, a confirmé encore une fois que les hélicobactéries animales sont très largement répandues. L'apparition de symptômes cliniques ou de lésions pourrait elle tenir à l'espèce responsable de l'infection, à l'intercurrence d'autres pathologies digestives, à un statut immunitaire particulier héréditaire ou acquis ?... Pour répondre à ces questions, d'autres enquêtes doivent être faites, utilisant une population de chiens de propriétaires sains et une PCR avec des sondes spécifiques d'espèces, ou encore une PCR après standardisation de la quantité de matériel de départ et évaluation du nombre final de copies.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, M. BONNES, Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
Mme DUBESSET épouse DUMAS Marie, Catherine
a été admis(e) sur concours en : 1993
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 11 juillet 1997
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Olivier DOSSIN, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
déclare que j'ai lu la thèse de :
Mme DUBESSET épouse DUMAS Marie, Catherine
intitulée :
*"Utilisation de la PCR pour le diagnostic de l'hélicobactériose chez les chiens atteints de troubles digestifs
chroniques (Octobre 1998-Juin 1999)*
et que je prends la responsabilité de l'impression.

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



Docteur Olivier DOSSIN

**Vu :
Le Directeur par intérim
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



Professeur Gilbert BONNES

**Vu :
Le Président de la thèse :**



Professeur Jean-Pierre VINEL

**Vu le : 17 mai 2001
Le Président
de l'Université Paul Sabatier**



Professeur R. BASTIDE

(Annexe 1)

**Histopathologie gastrique et
recherche d'*Helicobacter*.**

NOM :

n° lame :

CHIEN

CHAT

Cliniquement sain

Cliniquement malade

GASTRITE

Antre

Nombre de biopsies

Absence

Aiguë

Chronique

Forme spéciale

Corps

GHLO's

Absent
Léger
Modéré
Sévère

Grande taille
Petite taille

Absent
Léger
Modéré
Sévère

Grande taille
Petite taille

Gastrite chronique

Léger Modéré Sévère

Inflammation

Léger Modéré Sévère

Activité

Atrophie

Autres commentaires

BIBLIOGRAPHIE :

1. BJÖRKHOLM B., BEFRITS R., JAUP B. et al.
Rapid PCR detection of *Helicobacter pylori*-associated virulence and resistance genes directly from gastric biopsy material.
J. Clin. Microbiol., 1998, **36**, 12, 3689-3690.
2. CATTOLI G., VAN VUGT R., ZANONI RG. et al.
Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter* spp in naturally infected dogs.
Vet. Microbiol., 1999, **70**, 239-250.
3. CLAYTON CL., KLEANTHOS H., MORGAN DD. et al.
Rapid fingerprinting of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis.
J. Clin. Microbiol., 1993, **31**, 6, 1420-1425.
4. CORNETTA AM., SIMPSON KW., STRAUSS-AYALI D. et al.
Use of a ¹³C urea breath test for detection of gastric infection with *Helicobacter* spp in dogs.
Am.J.Vet.Res., 1998, **59**, 11, 1364-1369.
5. CORTHESEY-THEULAZ I., BERGONZELLI G.
Les thérapies non antibiotiques contre les infections à *Helicobacter*.
Réunion du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters 2000, Institut Pasteur, Paris, France, p4.
6. DELCHIER JC., ROUDOT-THORVAL F., GUIASU IM.
Evaluation de l'efficacité du traitement éradicateur de l'infection à *Helicobacter pylori* en France : résultats préliminaires de l'enquête du GEHF.
Réunion du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters 2000, Institut Pasteur, Paris, France, p3.
7. DORE M., BILOTTA M., VAIRA D. et al.
High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in sheperds.
Dig. Dis. Sci., 1999, **44**, 6, 1161-1164.
8. EATON K., DEWHIRST F., PASTER B. et al.
Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs : animal and public health implications.
J. Clin. Microbiol., 1996, **34**, 12, 3165-3170.
9. EUZEBY JP.
Les taxons bactériens d'intérêt vétérinaire décrits en 1997. Revue bibliographique.
Rev. Med. Vet., 1998, **149**, 1, 15-46.
10. GEYER C., COLBATZKY F., LEICHTNER J. et al.
Occurrence of spiral-shaped bacteria in gastric biopsies of dogs and cats.
Vet. Rec., 1993, **3**, 18-19.

- 11. GOTTRAND F., KALACH N., SPYCKERELLE C. et al.**
Intérêt de l'Omeprazole associé à l'Amoxicilline et à la Clarithromycine pour l'éradication de *Helicobacter pylori* chez des enfants présentant une gastrite.
Réunion du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters 2000, Institut Pasteur, Paris, France, p8.
- 12. GUNN MC., STEPHENS JC., STEWART JD. Et al.**
Detection and typing of the virulence determinants *cagA* and *vacA* of *Helicobacter pylori* directly from biopsy DNA : are *in vitro* strains representative of *in vivo* strains ?
Eur. J. Gastroenterol.Hepatol., 1998, **10**, 683-687.
- 13. HALL M.**
Drug-induced gastric mucosal injury.
Brit. Small Anim. Vet. Assoc., 1997, p78.
- 14. HÄNNINEN M., HAPPONEN I., JALAVA K.**
Transmission of canine gastric *Helicobacter salomonis* infection from dam to offspring and between puppies.
Vet. Microbiol., 1998, **62**, 47-58.
- 15. HÄNNINEN M., HAPPONEN I., SAARI S. et al.**
Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric Helicobacter specie.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1996, **46**, 1, 160-166.
- 16. HAPPONEN I., SAARI S., CASTREN L. et al.**
Comparison of diagnostic methods for detecting gastric *Helicobacter*-like organisms in dogs and cats.
J. Comp. Pathol., 1996, **115**, 117-127.
- 17. HAPPONEN I., LINDEN J., SAARI S. et al.**
Detection and effects of helicobacters in healthy dogs and dogs with signs of gastritis.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 1998, **213**, 12, 1767-1774.
- 18. HERMANNNS W., KREGEL K., BREUER W. et al.**
Helicobacter-like organisms : histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats.
J. Comp. Pathol., 1995, **112**, 307-318.
- 19. JALAVA K., ON S., VANDAMME P. et al.**
Isolation and identification of *Helicobacter spp* from canine and feline gastric mucosa.
Appl. Environm. Microbiol., 1998, **64**, 10, 3998-4006.
- 20. JENKINS C., BASSET J.**
Helicobacter infection.
Compend. Contin. Educ. Pract. Vet., 1997, **19**, 3, 267-279.

- 21.** JIANG C., LI C., HA T. et al.
Identification of *Helicobacter pylori* in saliva by a nested-PCR assay derived from a newly cloned DNA probe.
Dig. Dis. Sci., 1998, **43**, 6, 1211-1218.
- 22.** LECOINDRE P., CHEVALLIER M., PEYROL S. et al.
Pathogenic role of gastric *Helicobacter spp* in domestic carnivores.
Vet. Res., 1997, **28**, 207-215.
- 23.** LECOINDRE P., CHEVALLIER M., PEYROL S. et al.
Contribution à l'étude des hélicobactéries de l'estomac du chien et de leur rôle pathogène.
Rev. Med. Vet., 1995, **146**, 10, 671-680.
- 24.** LEE A., KRAKOWA S., FOX J. et al.
Role of *Helicobacter felis* in chronic canine gastritis.
Vet. Pathol., 1992, **29**, 6, 487-494.
- 25.** LEHMANN F., SCHILLER N., COVER T. et al.
Helicobacter pylori stimulates gastrin release from canine antral cells in primary culture.
AJP. Gastrointest. Liver Physiol., 1998, **274**, 6, 992-996.
- 26.** MONTEIRO L., VAIRA D., MALFERTHEINER P. et al.
Evaluation du test antigénique de *H. pylori* dans les selles (HpSA) après traitement d'éradication.
Réunion du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters 2000, Institut Pasteur, Paris, France, p10.
- 27.** MORGAN DR., FOX JG., LEUNK RD.
Comparison of isolates of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae*.
J. Clin. Microbiol., 1991, **29**, 395-397.
- 28.** NEIGER R., DIETERICH C., BURNENS A. et al.
Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats.
J. Clin. Microbiol., 1998, **36**, 3, 634-637.
- 29.** NEIGER R., DIETERICH C., BURNENS A. et al.
Diagnosis and prevalence of *Helicobacter sp* in cats.
Brit. Small Anim. Vet. Assoc., 1997, p294.
- 30.** NEIGER R., SIMPSON K.
Helicobacter infection in dogs and cats: facts and fiction.
J. Vet. Intern. Med., 2000, **14**, 125-133.
- 31.** PAPASOULIOTIS K., GRUFFYDD-JONES TJ., WERRETT G. et al.
Occurrence of Gastric *Helicobacter-like Organisms* in cats.
Vet. Rec., 1997, **140**, 369-370.
- 32.** PEYROL S., LECOINDRE P., BERGER I. et al.
Differential pathogenic effect of two *Helicobacter-like* organisms in dog gastric mucosa.
J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 1998, **30**, 3, 425-433.

33. PRICE AB.

The Sydney system : histological division.
J. Gastroenterol. Hepatol., 1991, **6**, 209-222.

34. RADIN J., EATON K., KRAKOWKA S. et al.

Helicobacter pylori gastric infection in gnotobiotic beagle dogs.
Infect. Immun., 1990, **58**, 8, 2606-2612.

35. REINDEL JF., FITZGERALD AL., BREIDER MA. Et al.

An epizootic of lymphoplasmacytic gastritis attributed to *Helicobacter pylori* infection in Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*).
Vet. Pathol., 1999, **36**, 1-13.

36. ROSSI G., FORTUNA D., PANCOTTO L. et al.

Immunohistochemical study of lymphocyte populations infiltrating the gastric mucosa of beagles dogs experimentally infected with *Helicobacter pylori*.
Infect. Immun., 2000, **68**, 8, 4769-4772.

37. ROSSI G., ROSSI M., VITALI C. et al.

A conventional beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*.
Infect. Immun., 1999, **67**, 6, 3112-3120.

38. SALLES-MONTODON N., MONTEIRO L., GRAS N. et al.

Difficultés du diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori* chez la personne âgée. Résultats préliminaires d'une étude rétrospective.
Réunion du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters 2000, Institut Pasteur, Paris, France, p16.

39. SEIDEL KE., STOLTE M., LEHN N. et al.

Antibodies against *Helicobacter felis* in sera of cats and dogs.
J. Vet. Med., 1999, **46**, 181-188.

40. SEVIN E., LAMARQUE D., DELCHIER JC. Et al.

Co-detection of *Helicobacter pylori* and of its resistance to clarithromycin by PCR.
FEMS Microbiol. Letters, 1998, **165**, 369-372.

41. SIMPSON K., BURROWS C.

Gastrite, ulcères et *Helicobacter* chez l'être humain, le chien et le chat.
Waltham Focus., 1997, **7**, 3, 1-6.

42. SIMPSON K., NEIGER R., DENOVO R. et al.

The relationship of *Helicobacter spp.* Infection to gastric disease in dogs and cats.
J. Vet. Intern. Med., 2000, **14**, 223-227.

43. SIMPSON K., STRAUSS-AYALI D., CHANG YF.

Naturally acquired *Helicobacter pylori* infection in cats: strain analysis, serum gastrin, acid secretion, ¹³C-urea blood and breath test, and tissue distribution.
Proceedings of the Helicobacter pylori: basics mechanisms to clinical cure conference, San Diego, USA, 1998, p 21.

44. SIMPSON K., STRAUSS-AYALI D., MAC DONOUGH PL. et al.
Helicobacter felis infection in dogs : effect on gastric structure and fonction.
Vet. Pathol., 1999, **36**, 237-248.
45. SIMPSON K., STRAUSS-AYALI D., MAC DONOUGH PL. et al.
 Gastric function in dogs with naturally acquired gastric *Helicobacter* spp. Infection.
J. Vet. Med., 1999, **13**, 507-515.
46. SMITH K.
Helicobacter sp. infection in a dog in association with gastric perforation.
Aust. Vet. Pract., 1996, **26**, 3, 140-145.
47. SONG Q., HALLER B., SCHMID RM. et al.
Helicobacter pylori in dental plaque. A comparison of different PCR Primer sets.
Dig. Dis. Sci., 1999, **44**, 3, 479-484.
48. STRAUSS-AYALI D., SIMPSON K.
 Gastric *Helicobacter* infection in dogs.
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract., 1999, **29**, 2, 397-414.
49. STRAUSS-AYALI D., SIMPSON K., SCHEIN A. et al.
 Serological discrimination of dogs infected with gastric *Helicobacter spp* and uninfected dogs.
J. Clin. Microbiol., 1999, **37**, 5, 1280-1287.
50. THOMAS A., MAINIL J.
 Les hélicobactéries chez les animaux : mythe ou réalité ? I. Synthèse des connaissances.
Ann. Med. Vet., 1998, **142**, 233-246.
51. THOMAS A., HENROTEAUX M., HARDY N. et al.
 Les hélicobactéries chez les animaux : mythe ou réalité ? II. Etudes bactériologique et clinique préliminaires chez les carnivores domestiques.
Ann. Med. Vet., 1999, **143**, 31-39.
52. UTRIAINEN M., JALAVA K., SUKURA A. et al.
 Morphological diversity of cultured canine *Helicobacter spp.*
Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 1997, **20**, 4, 285-297.
53. WATANABE T., TADA M., NAGAI H. et al.
Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils.
Gastroenterol., 1998, **115**, 642-648.
54. YAMASAKI K., SUEMATSU H., TAKAHASHI T.
 Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 1998, **212**, 4, 529-533.
55. ZENNER L.
 Pathology, diagnosis and epidemiology of the rodent *Helicobacter* infection.
Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 1999, **22**, 41-61

NOM : DUBESSET-DUMAS

PRENOM : MARIE

TITRE : UTILISATION DE LA PCR POUR LE DIAGNOSTIC DE L'HELICOBACTERIOSE CHEZ LES CHIENS ATTEINTS DE TROUBLES DIGESTIFS CHRONIQUES (OCTOBRE 1998-JUIN 1999)

RESUME : Les hélicobactéries ont été découvertes à la fin du XIX^e siècle par Bottcher. Ce sont des bactéries principalement digestives, isolées chez l'Homme et chez de nombreuses espèces animales. L'implication d'*Helicobacter pylori* dans la genèse de gastropathies chez l'Homme, a motivé le développement de modèles de recherches animaux.

Le but du travail expérimental effectué par l'auteur est de contribuer à la mise au point d'une technique de PCR permettant le dépistage des bactéries du genre *Helicobacter* sur les biopsies gastriques de chiens.

Des biopsies gastriques ont été réalisées par endoscopie sur 36 chiens (30 animaux malades et 6 animaux sains), dans l'antré pylorique, le corps et le fundus. Elles ont été soumises à plusieurs tests diagnostiques : test rapide à l'uréase, coloration de Warthin-Starry, et PCR. Les lésions histologiques ont également été étudiées.

Par la technique PCR, seuls 2 chiens se sont avérés négatifs. 34 chiens, y compris les 6 chiens cliniquement sains, étaient positifs sur au moins une des zones biopsiées.

La prévalence de l'infection dans cette étude est très élevée chez le chien, la zone corps/fundus étant la plus intensément colonisée. Aucune corrélation n'a pu être faite entre l'inflammation de la muqueuse gastrique et l'infection par les hélicobactéries.

Dans des études ultérieures, l'adaptation de la technique PCR permettra d'identifier les espèces d'hélicobactéries présentes ainsi que de les quantifier.

MOTS-CLES : CHIEN, ESTOMAC, HELICOBACTER, PCR

ENGLISH TITLE : USE OF PCR FOR THE DIAGNOSIS OF HELICOBACTER INFECTION IN DOGS WITH CHRONIC DIGESTIVE DISEASES (OCTOBER 1998-JUNE 1999)

ABSTRACT : The role of *Helicobacter pylori* in human gastric disease has led to the use of various animal models.

The aim of the author's work is to perfect a reliable PCR technique to screen *Helicobacter* spp. in gastric biopsy samples of dogs.

Gastric biopsy samples were collected by endoscopy from 36 dogs (30 dogs with digestive diseases, and 6 healthy dogs), including pyloric antrum, body and fundus. The samples were tested by rapid urease test, Warthin-Starry stain, PCR and histology. Only 2 dogs were negative by PCR test, 34 dogs (including the 6 healthy dogs) were infected in one or more biopsy site.

Helicobacter spp. prevalence in this study is high, particularly in the body/fundus site. There is no correlation of infection with inflammation of the gastric mucosa.

Further studies should be conducted to assess the role of various *Helicobacter* species and to quantify the degree of *Helicobacter* infection of biopsy samples.

KEY WORDS : DOG, STOMACH, HELICOBACTER, PCR