



ANNEE 2006 THESE : 2006 – TOU 3 – 4037

QUANTIFICATION PAR PCR EN TEMPS REEL ET IDENTIFICATION GENETIQUE DES SOUCHES D'HELICOBACTERIES GASTRIQUES DANS UN GROUPE DE CHIENS ATTEINTS DE TROUBLES DIGESTIFS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2006
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par
Jérémie COILLARD
Né, le 30 juillet 1978 à MARTIGUES (Bouches-du-Rhône)

Directeur de thèse : **Monsieur le Docteur Olivier DOSSIN**

JURY

PRESIDENT :
M. Jean-Pierre VINEL

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Olivier DOSSIN
Mlle Catherine Trumel

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE:
Mme Corine BOUCRAUT-BARALON

Directrice scientifique de SCANELIS

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	A. MILON
Directeurs honoraires	M.	G. VAN HAVERBEKE
	M.	J. FERNEY
	M.	P. DESNOYERS
Professeurs honoraires	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	D. GRIESS
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	J. CHANTAL
	M.	J.-F. GUELFY
	M.	M. EECKHOUTTE

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*
M. **MARTINEAU Guy-Pierre**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
M. **DUCOS de LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie - Toxicologie*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

INGÉNIEUR DE RECHERCHES

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

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

MAÎTRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

Mlle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
M. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*
Mlle LE MINOR Odile, *Epidémiologie*
M. NOUVEL Laurent-Xavier, *Pathologie de la reproduction*
M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VOLMER RE Romain, *Infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*

Remerciements

A notre président de thèse,

M. le Professeur Jean-Pierre Vinel,

Faculté de Médecine de Toulouse - Hôpital Purpan,
Hépatogastro-entérologie.

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

Hommages respectueux.

A notre jury de thèse,

M. le Docteur Olivier DOSSIN, maître de conférences,

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Médecine interne et Gastro-entérologie des Carnivores Domestiques.

Pour m'avoir toujours soutenu, pour son enthousiasme constant et sa gentillesse,

Pour le temps qu'il a consacré à rendre ce travail de qualité.

Mme le Docteur Cathy TRUMEL, maître de conférences,

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Médecine interne et Cancérologie des Carnivores Domestiques.

Pour avoir accepté de faire parti de ce jury de thèse et pour cette année de formation en biologie médicale qui restera une année inoubliable.

Mme le Docteur Corine BOUCRAUT-BARALON,

Directrice scientifique de SCANELIS

Pour sa grande patience, ses conseils, sa disponibilité et sa gentillesse.

Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Amitiés sincères.

A Julie

Dont le sourire m'attendrit tous les jours.

A ma mère et ma sœur

Pour la traversée ensemble des épreuves de la vie.

A Greg

Pour sa joie de vivre, son tire-bouchon et parce que ce monde est petit.

A la famille Landart

Pour la gentillesse avec laquelle vous m'avez accueilli, et pour les liens qui se tissent entre nous davantage chaque jour.

A toute l'équipe de Scanelis

Mélanie, Sophie, Jean-luc, Catherine, Laetitia, Florence et Sabrina

Merci à tous pour votre aide quotidienne dans la réalisation de ce travail

Ces 6 mois passés avec vous seront inoubliables.

Et d'une façon générale,

A mes amis, aux membres de ma famille, à la famille Froeliger et proches.

A mon grand-père et ma grand-mère.

Quantification par PCR en temps réel et identification
génétique des souches d'hélicobactéries gastriques dans
un groupe de chiens atteints de troubles digestifs

Sommaire

Introduction

Première partie : Etude bibliographique

- I. Identification des hélicobactéries gastrique du chien**
- II. Hypothèses concernant la pathogénie des hélicobactéries chez le chien**
- III. Pathologie comparée et risque zoonotique**

Seconde partie : Matériel et méthodes

- I. Les prélèvements**
- II. Quantification par PCR en temps réel**
- III. Méthodes de discrimination des souches**

Troisième partie : Analyse, interprétation et discussion des résultats

- I. Discussion concernant la quantification des hélicobactéries**
- II. Standardisation par rapport à un marqueur cellulaire**
- III. Relation entre quantification et lésions histologiques**
- IV. Identification des différentes hélicobactéries**
- V. Relations entre souches bactériennes et lésions histologiques**
- VI. Approches particulières**

Discussion et perspectives

Annexes

Bibliographie

Tables des matières

Introduction

Depuis l'isolement, chez l'homme, d'*Helicobacter pylori* en 1983 par Warren et Marshal, et l'implication de cette bactérie comme l'agent causal de gastrites et d'ulcères pyloriques, puis récemment comme cofacteur du développement d'adénocarcinome gastrique ou de lymphome gastrique, des organismes spiralés similaires ont été retrouvés chez des espèces animales variées.

Chez le chien et le chat de telles bactéries sont décrites depuis plus d'un siècle. Cependant leur présence avait été ignorée ; elles étaient considérées comme commensales. Depuis la découverte des conséquences d'une infection gastrique à *H. pylori*, un regain d'intérêt concerne à nouveau ces organismes gastriques.

Les techniques de biologie moléculaire, déjà utilisées depuis plusieurs années en médecine humaine, ouvrent de nouvelles possibilités pour le diagnostic vétérinaire des maladies infectieuses, parasitaires ainsi que des anomalies génétiques. Il est notamment possible de détecter des quantités infimes de micro-organismes (virus, bactéries, parasites) dans un prélèvement et donc d'établir un diagnostic précis.

Le but de cette étude réalisée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, en collaboration avec le laboratoire SCANELIS est de quantifier et différencier les différentes souches d'hélicobactéries présentes dans l'estomac de chiens atteints de gastrite chronique puis de corrélérer ces observations aux résultats de l'analyse histologique des tissus biopsiés.

Cette étude est la suite du travail de thèse vétérinaire de Marie DUBESSET-DUMAS portant sur l'intérêt des techniques de dépistage par PCR des hélicobactéries gastriques chez le chien et le chat.

Première partie :

Etude bibliographique

Le genre *Helicobacter* a été créé en 1989 pour classer *Helicobacter pylori* et *Helicobacter mustelae*. L'individualisation du genre *Helicobacter* a été établie sur la base de caractères génétiques (notamment les séquences ADN codant pour l'ARNr 16S) et phénotypiques (morphologie, structure, composition en acides gras, nature des ménaquinones, caractères culturels et activités enzymatiques). Ce genre constitue, avec les genres *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Dehalospirillum*, *Sulfurimonas*, *Sulfurospirillum*, *Thiovulum* et *Wolinella*, la classe des "Epsilonproteobacteria" [11].

Actuellement, le nombre de bactéries appartenant au genre *Helicobacter* est évalué à une trentaine d'espèces et 4 espèces « Candidatus » (1^{er} semestre 2005, source : www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy). D'autres *Helicobacter* restent sans nom et n'ont pas encore été proprement décrites selon les règles internationales de nomenclature.

I. Identification des hélicobactéries gastrique du chien

Peu d'hélicobactéries issues de l'estomac de chien peuvent être cultivées selon les techniques de routine, cette caractéristique est la principale cause de la difficulté de leur étude [1, 10, 14, 38]. Ces bactéries spiralées non cultivables sont les plus fréquemment isolées dans l'estomac des chiens et représentent une variété importante d'organismes [5].

1.1. Espèces décrites

Helicobacter felis, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* et « *H. heilmannii* » sont les 4 hélicobactéries les plus fréquemment isolées de la muqueuse gastrique du chien. *Helicobacter bilis* et « *Flexipira rappini* » ont également été décrites.

1.1.1. "*Helicobacter heilmannii*"

Dès 1987, des bactéries spiralées différentes d'*H. pylori*, ont été mises en évidence dans la muqueuse gastrique de l'homme et le nom « *Helicobacter heilmannii* » fut proposé [40]. Par la suite, de nombreux travaux ont décrits ces bactéries dans la muqueuse gastrique de nombreuses espèces animales [11], « *H. heilmannii* » est l'hélicobactérie gastrique la plus largement distribuée dans le monde animal [8].

Cependant l'identification précise de « *H. heilmannii* » est complexe et il s'avère que sous ce nom sont regroupés différents types d'hélicobactéries très proches [44]. Les séquences d'ARNr 16S d'« *H. heilmannii* » type 1 seraient très similaires à celles d'hélicobactéries gastriques des porcs alors que « *H. heilmannii* » type 2 serait plus étroitement liée à *H. bizzozeronii*, *H. felis* et *H. salomonis* [3].

Depuis les travaux d'O'ROURKE, en 2004, voici un état des lieux concernant les différents types d'« *H. heilmannii* » isolés:

- « *H. heilmannii* » type 1 correspond à « *Candidatus Helicobacter suis* ». Elle est fréquemment isolée chez l'homme et le porc mais très rarement chez les carnivores domestiques [46].

- « *H. heilmannii* » type 2, autrefois désignée sous la nomenclature « *Gastrospirillum hominis* », correspond à « *Candidatus Helicobacter heilmannii* » [29]. Elle est fréquemment isolée chez le chien et le chat [33].

La dénomination « heilmannii », largement utilisée, est donc susceptible d'évoluer prochainement.

1.1.2. *H. felis*

En 1988, LEE et coll. isolent la première souche d'*Helicobacter* provenant d'une muqueuse gastrique d'un chat adulte. Elle sera baptisée quelques temps plus tard *Helicobacter felis* par PASTER, LEE et al. et publiée [23, 30]. Par la suite, elle sera régulièrement isolée chez le chien également [3, 31, 46].

1.1.3. *H. bizzozeronii*

Cette espèce a été décrite en 1996 par HÄNNINEN. La nomenclature de *Helicobacter bizzozeronii* a été proposée pour 10 souches isolées de l'estomac de chiens et différant des souches typiques de *H. felis*, *H. pylori*, *H. mustelae* et *Campylobacter jejuni* par l'analyse d'essais d'hybridation d'ADN [13]. La fréquence de l'isolement d'*H. bizzozeronii* chez le chien conduit certains auteurs à penser que le chien pourrait être l'hôte naturel de cette espèce [3, 15, 31, 46]. Cette espèce a récemment été isolée chez l'homme [20].

1.1.4. *H. salomonis*

La nomenclature de *Helicobacter salomonis*, publiée en 1997, repose sur l'examen de huit souches isolées à partir de la muqueuse gastrique de chiens. Cette espèce diffère, entre autres, de *Helicobacter felis* et de *Helicobacter bizzozeronii* par sa morphologie [18]. Chez le chien, elle reste peu fréquemment isolée [46].

1.1.5. Autres hélicobactéries

Helicobacter bilis est une espèce décrite en 1995 et dont la nomenclature a été publiée en 1997. Elle est observée chez de nombreuses espèces dont le chien et l'homme. Son habitat normal semble être l'intestin, bien qu'elle ait également déjà été isolée dans l'estomac [10].

« *Flexispira rappini* », malgré son nom, appartient au genre *Helicobacter* [10, 13, 19] et est en voie de classification. Elle se compose de divers taxons qui pourraient être autant de souches d'*Helicobacter* et qui commencent peu à peu à être identifiés [7].

D'autres « *Helicobacter-like organisms* » ont récemment été découvertes dans des muqueuses gastriques de chiens [46] et nécessitent plus d'investigations.

Enfin, dans la plupart des études récentes, la recherche d'*H. pylori* chez le chien est devenue systématique. Cependant, à ce jour, seule l'étude de BUSCOLITZ et al. relate la présence d'*H. pylori* dans la muqueuse gastrique d'un chien [4].

1.2. Méthodes de différenciation et de quantification

1.2.1. Techniques directes : la différenciation des espèces selon l'ultrastructure

1.2.1.1. Examens de routine et caractères biochimiques

L'une des principales caractéristiques des hélicobactéries est de ne pas être cultivables par des techniques de routine. L'utilisation de techniques plus sophistiquées est rendue ardue par la difficulté d'obtention de cultures abondantes [1, 10, 14, 38]. De plus, les caractères biochimiques ne permettent pas de différencier *H. bizzozeronii*, *H. felis* et *H. salomonis* [11].

1.2.1.2. Microscope optique et électronique

Afin de pouvoir correctement interpréter les observations au microscope, plusieurs auteurs ont proposé une classification des hélicobactéries basée sur le nombre de flagelles, la présence de fibrilles périplasmiques ainsi que sur la taille des tours de ces bactéries spiralées [13, 17, 31]. STOFFEL observe au microscope électronique, des caractères relatifs à l'ultrastructure de *H. felis* permettant de différencier *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* et « *H. heilmannii* ». Il considère alors cette technique comme la méthode de choix de l'étude de l'ultrastructure des *Helicobacter* collectées dans leur habitat naturel [41].

Cependant la mise en culture de ces bactéries leur fait perdre leurs caractéristiques ultrastructurales. C'est le cas d'*H. felis* qui perd les fibrilles périplasmiques la caractérisant ce qui la rend indifférenciable des autres hélicobactéries [10, 24, 41].

1.2.2. Techniques indirectes : les techniques génétiques

La PCR (Polymerase Chain Reaction) s'est vite imposée comme un technique de choix dans l'étude des hélicobactéries chez le chien [10, 38]. L'amplification du gène ARNr 16S suivi de l'analyse des séquences obtenues est la méthode généralement utilisée pour l'étude de la phylogénie des bactéries. Toutefois, les hélicobactéries sont phylogénétiquement extrêmement proches entre elles et l'étude des séquences du gène ARNr 16S révèle une similarité entre souches de plus de 99%. De ce fait, l'analyse de la séquence de ce gène n'est pas suffisante pour la détermination de l'espèce [18] : cela permet de savoir qu'il s'agit bien d'hélicobactéries mais ne permet pas de différencier les espèces.

Actuellement, les essais de différenciation des hélicobactéries portent essentiellement sur les gènes uréase A et uréase B, dont les pourcentages de similarités entre souches permettent de différencier efficacement les espèces entre elles [33, 50]. La méthode employée est la mise au point d'amorces PCR spécifiques à *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* et « *H. heilmannii* ».

La mise en évidence de co-infections se fait soit à l'aide des différentes amorces PCR uréase A et B spécifiques alors utilisées sur le même échantillon [3, 46], soit par clonage des amplicons obtenus et séquençage des produits clonés [4, 17, 33], soit encore par l'utilisation d'enzymes de restriction (méthode RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism) [4]. La plupart des études incorporent également dans leurs analyses des amorces spécifiques des uréases A, B ou C de *H. pylori*.

Enfin, d'autres marqueurs phylogénétiques des espèces d'hélicobactéries sont en cours d'étude, comme le gène codant pour la protéine HSP 60 [27], ou pour les régions intergéniques des ARNt [3, 46].

1.2.3. Quantification des hélicobactéries

1.2.3.1. Quantification directe : le microscope

PEYROL quantifie de manière semi-quantitative les hélicobactéries au microscope, à partir d'échantillons traités pour analyse histologique [31]. Il s'agit également de la seule méthode permettant de situer les hélicobactéries au sein de la muqueuse gastrique et de décrire précisément leur localisation (superficielle vs profonde, intracellulaire vs extracellulaire) [31, 38]. Les limites de cette technique sont liées au prélèvement.

1.2.3.2. Quantification indirecte

A ce jour, la seule méthode de quantification indirecte décrite reste la mesure de l'activité uréasique (Urease Mapping), il s'agit d'une mesure semi-quantitative donnant une estimation de la densité de la colonisation bactérienne [14, 17, 24, 47, 48]. D'autres méthodes, utilisées chez l'homme, telles que les tests d'anticorps, n'ont pas encore été évaluées à des fins de quantification chez l'animal. [12]. La PCR en temps réel pourrait y trouver une application [24].

1.2.4. Mesure des lésions gastriques

1.2.4.1. Méthode de mesure directe : la microscopie

L'histologie des lésions gastriques est décrite selon des règles précises et standardisées. Les systèmes utilisés pour grader les gastrites reposent principalement sur la classification proposée par HAPPONEN [15] ainsi que le Sydney system [32].

1.2.4.2. Méthode de mesure indirecte : les marqueurs de souffrance cellulaire

Il s'agit de la recherche de marqueurs chimiques (IL-1 β , IL-8, TNF- α , ARNm...) qui sont exprimés en grande quantité chez les humains infectés par *H. pylori*. Cependant, aucune anomalie de régulation de ces marqueurs n'a été détectée chez des chiens souffrant de gastrite sévère [17] et selon l'étude de WIINBERG, il n'y a pas de corrélation entre une hausse de l'expression des cytokines et l'infection gastrique par *Helicobacter spp.* chez le chien [47].

II. Hypothèses concernant la pathogénie des hélicobactéries chez le chien

Les *Helicobacter spp.* produisent une uréase qui, en dégradant l'urée, produit de l'ammoniac et des ions bicarbonate. Dans l'estomac, cette réaction crée un environnement propice au développement de ces bactéries, mais l'ammoniac est directement toxique pour les cellules épithéliales gastriques.

En 1999, dans une étude menée sur 25 chiens, CATTOLI indiquait qu'il existait probablement une corrélation entre une pathologie gastrique et une infection à hélicobactéries. Cependant, la présence quasi-universelle de ces bactéries chez des chiens sains et malades rend difficile toute évaluation [5]. A présent, la plupart des auteurs s'accordent à dire qu'il n'existe pas de simple relation « infection = maladie » [39].

Actuellement, les différentes études portent soit sur des populations de chiens naturellement infectés soit sur des chiens de type « Pathogen Free » infectés expérimentalement, à savoir avec *H. felis* [24] ou *H. pylori* [34, 35] dans le cadre de l'étude du pouvoir pathogène de cette bactérie chez l'homme.

2.1. Etudes concernant la prévalence des hélicobactéries

La plupart des études s'accordent sur le fait que la prévalence des hélicobactéries chez les chiens est très importante. Les chiffres varient selon les méthodes de mise en évidence (microscopie, test uréase, PCR) [9].

Voici un aperçu des répartitions observées au travers de différentes études :

- 61 à 82% des chiens présentant des signes de gastrite [17, 48],
- 67 à 86% des chiens sains [10, 17, 48],
- 100% des chiens de laboratoire, des chiens de berger ou de collectivité [22, 38, 39].

2.2. Etudes concernant la quantité des hélicobactéries

HWANG met en évidence, par mesure de l'activité uréase, que la densité d'hélicobactéries est plus importante chez les chiens malades que chez les chiens sains [16]. Néanmoins, il n'établit aucune corrélation entre la sévérité des lésions des muqueuses des animaux infectés et des non infectés. Avec la même méthode, YAMASAKI n'avait obtenu aucune différence entre la densité bactérienne relevée chez les chiens sains et les chiens malades [48].

La plupart des auteurs avancent l'hypothèse que la quantité de bactéries n'influe pas sur la sévérité des lésions [10, 38, 39] et qu'il existerait une sensibilité individuelle des animaux ou bien que certaines souches seulement induiraient des lésions de gastrite [10]. Seul LECOINDRE établit en 1995, étude statistique à l'appui, une corrélation positive entre la charge bactérienne et la sévérité de la gastrite [21].

2.3. Etudes concernant la localisation des hélicobactéries au sein des différentes régions gastriques

Chez l'homme, la localisation préférentielle d'*H. pylori* est la région transitionnelle antro-pylorique. Chez le chien, cela semble être principalement la muqueuse du fundus, mais la bactérie pourrait également se développer dans le reste du tube digestif [34].

Dans son étude sur 5 chiens gnotobiotiques infectés, LEE [24] observe une colonisation en 24 heures de l'ensemble de l'aire gastrique, corps et fundus en premiers ainsi qu'une densité histologique grandissante du cardia au fundus. Enfin, plus on se rapproche du canal pylorique, plus les organismes se font rares. La mesure de l'activité uréasique d'échantillons prélevés en différents endroits de la muqueuse gastrique révèle que la charge bactérienne serait plus élevée dans le fundus que dans le corps, l'antra présentant la charge la plus faible. Cette graduation est observée chez les chiens malades tout comme chez les chiens sains. La combinaison des méthodes de PCR, d'histologie et de mesure d'activité uréasique confirme cette observation [17, 38]. Il est à noter que les bactéries gastriques, contrairement aux hélicobactéries intestinales, sont sensibles à la bile et aux sels biliaires [13].

A l'histologie, lors d'infection bénigne ou modérée, on constate une prédilection des hélicobactéries pour le fundus et le corps de l'estomac. Toutefois, lors d'infection sévère, la répartition des bactéries reste généralement plus diffuse [24, 31]. SIMPSON observe que la muqueuse de l'antra pylorique serait plus inflammée, en dépit d'une densité de colonisation

bactérienne moins importante que celle du corps et du fundus [38]. Enfin, pour PEYROL et LECOINDRE, les hélicobactéries ne sont rencontrées dans l'antre que lors d'infection sévère s'accompagnant alors également d'une densité bactérienne générale élevée. [21].

2.4. Etudes concernant la localisation des hélicobactéries au sein de la muqueuse gastrique

En 2000, VAJNER étudie la localisation précise des hélicobactéries au sein de la muqueuse gastrique de 275 chiens et observe la répartition suivante:

- Surface des cellules : 72%,
- Glandes : 19.3%,
- Cellules: 6.5%.

Ces proportions, comme la majorité des observations, s'accordent à montrer que les organismes sont plus fréquemment observés dans le mucus superficiel, mais aussi dans les glandes gastriques ainsi qu'occasionnellement dans le cytoplasme des cellules pariétales [5, 38].

Selon VAJNER, l'aggravation des lésions gastriques dépend de la profondeur de la localisation des microbes à l'intérieur du mucus gastrique [45]. Ceci rejoint les observations de CATTOLI quand il visualise, d'une part, des *Helicobacter bizzozeronii*-like en localisation intracellulaire chez 100 % des chiens présentant des signes de maladie gastro-intestinale et, d'autre part, des *Helicobacter felis*-like localisées à la surface des cellules, chez des chiens en bonne santé. A l'opposé, la présence d'*Helicobacter spp.* en intracellulaire s'accompagne des signes de dégénérescence pour PEYROL concernant *H. felis* ce qui n'est pas le cas pour *H. bizzozeronii*.

Selon l'étude bibliographique de DO-REGO SEYAWI, chez le porc « *H. heilmannii* » semble se limiter aux cryptes, à la surface de la muqueuse (dans ou sous la couche de mucus) et à la lumière des glandes gastriques, au niveau de la zone d'abouchement [8]. LECOINDRE observe cette même répartition chez le chien [21]. Enfin, « *H. heilmannii* » montre une certaine affinité pour les cellules pariétales ce qui s'accompagne également de signes de dégénérescence [8].

2.5. Etudes concernant l'espèce

2.5.1. « *H. heilmannii* »

HWANG et al. ont recherché, par PCR uréase B, les différentes bactéries présentes dans leurs cohortes de chiens sains (31) et malades (11) et observent :

- Animaux sains : « *H. heilmannii* » : 74.2%,
H. felis : 6.5 %,
Non identifiée : 19.4%.
- Animaux malades : « *H. heilmannii* » : 81.2%,
H. felis : 0 %,
Non identifiée : 18.1%.

Il n'a pas été mis en évidence de corrélation nette entre le développement de lésion et la présence d'une souche précise [17].

2.5.2. *H. felis*

En 1992, LEE et al. utilisent 5 chiots gnotobiotiques et leur inoculent une culture pure de *H. felis*, puis, 31 jours après, ils observent les modifications histologiques des différentes zones de l'estomac de ces chiens. L'analyse des résultats conduit à émettre l'hypothèse qu'*H. felis* a un effet anti-sécrétoire éventuellement responsable de gastrite folliculaire, en tout cas d'une réponse inflammatoire au minimum[24].

Pour LECOINDRE et PEYROL, elle serait capable d'engendrer chez certains animaux des altérations épithéliales, des gastrites et plus rarement des ulcères, mais la signification de ces observations reste toutefois controversée [22]. La pénétration intracellulaire de ce germe provoque un effet cytopathogène qui entraîne une souffrance cellulaire pouvant conduire à de la nécrose. Le stade de gastrite chez le chien est aggravé en présence d'une co-infection *H. felis* - *H. bizzozeronii* [31].

SIMPSON, en 1999, reconduit l'expérience de LEE et effectue un suivi sur 6 mois de 5 chiens infectés. Son étude ne met pas en évidence de corrélation entre le nombre d'organismes observés et le degré de l'inflammation des tissus gastriques, aussi conclut-il qu'*H. felis* pourrait ne pas être pathogène pour le chien. Toutefois, il suggère également qu'un délai d'observation de l'infection plus long devrait être réalisé [38].

2.5.3. *H. bizzozeronii*

Dans l'étude de PEYROL menée sur 12 chiens, la présence d'*H. bizzozeronii* associée à une tolérance de la muqueuse gastrique ainsi qu'à l'absence de souffrance des cellules épithéliales lors d'infection faible à modérée, conduit à émettre l'hypothèse que le chien serait l'hôte naturel. *H. bizzozeronii* est observée à l'intérieur des cellules pariétales lors d'infection sévère mais n'induirait pas d'effet cytopathogène. [30]. Cependant cela reste controversé [5, 45]. Enfin, selon SIMPSON, la colonisation gastrique par *H. bizzozeronii* n'est associée à aucune perturbation de l'axe sécrétoire gastrique [38].

2.5.4. *H. salomonis*

A ce jour, la pathogénicité éventuelle d'*H. salomonis* chez le chien n'a fait l'objet d'aucune étude.

La multiplicité des souches présentes chez le chien complique l'étude de la pathogénicité de ces bactéries, d'autant plus que des co-infections sont fréquemment observées [15, 31, 46, 47].

III. Pathologie comparée et risque zoonotique

3.1. *H. pylori*

H. pylori est extrêmement répandue dans la population humaine et est associée à une baisse des sécrétions acides associée à une gastrite antrale, à des ulcères peptiques ainsi qu'à des néoplasies gastriques. Cependant la pathologie n'est pas systématique et semble influencée par des facteurs individuels des hôtes. Différentes souches ont récemment été identifiées et *H. pylori* est désormais considérée comme une population de bactéries génétiquement très proches mais différant par leur génotypes et leur virulence [12]. L'inflammation gastrique chronique peut évoluer vers une gastrite atrophique et une métaplasie intestinale, qui sont des conditions précancéreuses.

H. pylori semble plus pathogène que toutes les autres hélicobactéries chez le chien également. L'infection expérimentale de 5 chiens gnotobiotiques avec *H. pylori* démontre que

suite à l'infection, ces chiens développent rapidement une gastrite chronique similaire à la gastrite associée à *H. pylori* chez l'homme [34, 35].

A ce jour, chez le chien, une seule publication annonce la découverte d'*H. pylori* ou du moins d'une souche très proche chez le chien [4].

3.2. « *H. heilmannii* »

Chez l'homme, ces *Helicobacter* non *pylori* ont été identifiées comme la cause possible d'ulcération gastrique ou duodénale, et ont été associées à la présence de lymphomes gastriques et de carcinome [1, 2, 3, 6, 37, 49]. L'infection de l'estomac humain s'accompagne souvent d'une gastrite chronique active qui est généralement moins sévère que dans le cas d'une infection à *H. pylori*. Chez le porc et la souris, la présence de gastrites chroniques est très largement décrite et corrélée significativement avec l'infection à « *H. heilmannii* » [6]. L'hypothèse d'une zoonose a alors été formulée [40] jusqu'à ce que récemment PRIESTNALL [33] et O'ROURKE [29] découvrent que les souches d'« *H. heilmannii* » isolées dans la muqueuse gastrique de chiens et de chats sont d'un type différent de celui trouvé chez l'homme et le porc, ce qui suggère que le potentiel zoonotique d'« *H. heilmannii* » serait minime.

3.3. Autres hélicobactéries

En 1999, ANDERSEN décrit la première souche de « *H. heilmannii* » isolée de la muqueuse gastrique d'un homme [1]. Cependant, cette souche fut par la suite identifiée comme *H. bizzozeronii*, suggérant alors la possibilité d'un risque zoonotique du fait que cette espèce est fréquemment isolée de la muqueuse gastrique de chien [20]. Cette hypothèse est soutenue par l'étude de VAN DEN BULK mettant en évidence la présence de *H. felis* et *H. bizzozeronii* dans la muqueuse gastrique d'hommes, de chiens et de chats. Par contre, *H. salomonis* est fréquemment identifiée chez l'homme, ce qui est en contraste avec ses rares identifications chez les carnivores domestiques, suggérant alors une autre source d'infection [46].

3.4. Thérapies et voies d'avenir dans le traitement de l'hélicobactériose gastrique

Le rôle de la thérapie antimicrobienne des chiens atteints d'infection à *Helicobacter* et présentant une gastrite n'est pas clair [39]. Il existe de nombreux protocoles de traitement mais la résistance aux antibiotiques est un problème émergent en médecine humaine et vétérinaire. Le développement de modèles animaux doit aider à élucider les mécanismes pathogéniques de ces bactéries et à aider au développement de stratégies pour le traitement des maladies gastriques [28]. Actuellement les études portent sur la mise au point d'un vaccin contre *H. pylori*. Le Beagle a été choisi comme modèle expérimental [34, 35, 36].

Conclusion

Les résultats et analyses des différentes études récentes convergent vers plusieurs conclusions. D'une part, la prévalence des hélicobactéries est élevée autant chez les chiens malades que chez les chiens en bonne santé ; il n'y a donc pas de simple relation du type « infection = maladie ». D'autre part, la dégénérescence des cellules gastriques semble liée à l'infection, mais la possibilité de co-infection et la multiplicité des souches compliquent les recherches. Enfin, il existe un contraste entre la faible réaction du tissu gastrique largement colonisé par « *H. heilmannii* », *H. felis* et *H. bizzozeronii* chez le chien et les lésions provoquées chez l'homme par *H. pylori*. Le rôle des *Helicobacter spp.* dans la pathogenèse de maladies gastriques chez le chien est inconnu et peu d'articles considèrent un pouvoir zoonotique potentiel.

Objectifs

Les objectifs de notre étude sont d'une part de quantifier par PCR en temps réel les hélicobactéries au sein de chaque région gastrique (antre, corps et fundus) de chiens présentant des signes cliniques de gastrite chronique et de chiens en bonne santé, et d'autre part d'identifier génétiquement les différentes souches présentes.

Ce travail cherchera dans un second temps à établir une corrélation entre la densité bactérienne et les lésions histologiques observées, et également à observer la prévalence des différentes souches d'hélicobactéries en fonction de l'état de santé des animaux.

Seconde partie :

Matériel et méthodes

I. Les prélèvements

1.1. Animaux participant à l'étude

Trente six chiens ont été retenus. La majorité de ces animaux a été préalablement présentée en consultation de Gastro-entérologie entre les mois d'octobre 1998 et de juin 1999, pour des troubles digestifs variés, principalement diarrhée (aiguë ou chronique) et vomissements.

Tableau 1 : Motif des consultations (nombre de chiens = 30) ; la plupart des chiens présentent une association de symptômes.

Vomissements	16
Diarrhée	21
Amaigrissement	10
Douleur abdominale	13

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

L'effectif se composait de 26 mâles et 10 femelles. L'âge moyen observé était de 4,5 ans (de 6 mois à 13 ans). 22 races de chiens étaient représentées, avec le plus souvent des Boxers (6/36) et des Beagles (4/36).

1.2. Réalisation des prélèvements

Chaque prélèvement a été effectué au cours d'une endoscopie digestive, réalisée à des fins diagnostiques, ou uniquement expérimentalement en ce qui concerne les 6 chiens donneurs de sang du service de médecine.

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

1.3. Récolte et conservation des prélèvements

Pour les analyses PCR, neuf biopsies par endoscopie ont été effectuées : 3 dans l'antrum 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 a été nettoyée dans de l'eau oxygénée, puis dans de l'alcool à 70°. Les neuf biopsies destinées à être analysées par cette méthode ont été regroupées selon leur zone d'origine, déposées sur un film radiographique noir coupé en fine bandelette; ce film a ensuite été inséré dans un tube à prélèvement sérique. L'ensemble a enfin été conservé à -20°C jusqu'au jour de l'extraction de l'ADN.

L'extraction de l'ADN a été réalisée au moyen de l'utilisation du kit commercial : High Pure PCR Template Preparation Kit (**Roche Diagnostics**). Les 3 biopsies d'une même zone ont été regroupées afin de constituer un unique échantillon à extraire.

1.4. Analyse histologique des prélèvements

Les résultats des analyses histologiques des différents tissus sont issus des travaux réalisés par Marie DUBESSET-THOMAS et retranscrits dans sa thèse « Utilisation de la PCR pour le diagnostic de l'hélicobactériose chez les chiens atteints de troubles digestifs chroniques », réalisée en 2001 [9].

Trois à cinq biopsies ont été réalisées dans le fundus, le corps et l'antrum. Les lectures des lames ont été effectuées par deux anatomo-pathologistes différents utilisant un même matériel (Service d'Anatomo-pathologie de l'ENVT). L'analyse des lames s'est effectuée en utilisant la classification de Sydney, adaptée pour l'occasion aux spécificités des carnivores domestiques.

II. Quantification par PCR en temps réel

2.1. Quantification des hélicobactéries, utilisation du gène ARNr 16S

Le premier objectif de l'étude était d'objectiver les échantillons positifs en mettant en évidence la présence d'hélicobactéries. Le second objectif était la quantification de ces bactéries.

2.1.1. Utilisation d'une gamme étalon

Afin de quantifier les mesures en nombre de bactéries par puits de PCR, une gamme de dilution avec un nombre connu de copies d'ADN a été utilisée. Des plasmides recombinants, contenant la séquence cible (un fragment de *Helicobacter bilis*) et dosés à 10^7 , 10^4 et 10^2 copies, ont été utilisés pour construire la droite étalon.

Le coefficient de corrélation de la droite étalon avoisinait 0,9995.

2.1.2. PCR en temps réel « hélicobactéries »

La PCR a été réalisée dans un volume final de 20 μ L contenant :

- 600 nM d'amorces spécifiques du genre *Helicobacter* (Helico TQ-1F, Helico TQ-3F, Helico TQ-1R, **Scanelis**),
 - 200 nM de sonde Taqman [®] (Helico TQ, **Scanelis**),
 - du ROX, molécule nécessaire à la normalisation de la fluorescence (**Invitrogen**)
 - Kit 2X Supermix Platinum UDG (**Invitrogen**), kit commercial contenant le tampon PCR, les dNTPs, la Taq polymérase et le $MgCl_2$.
- .5 μ L d'acides nucléiques de l'échantillon à tester.

Tous les échantillons ont été testés en double point. Certains contenaient des inhibiteurs de PCR. Ceux-ci ont alors été dilués au 1/10 puis retestés selon le même protocole. Par la suite, la mesure de la quantité d'hélicobactéries détectées a été corrigée afin d'avoir une estimation de cette quantité dans l'échantillon pur.

2.2. Quantification des cellules gastriques

2.2.1. Le marqueur cellulaire, le gène PrP

Le test PCR « PrP 154 » a été développé par **Scanelis** sur le gène cellulaire ovin PrP, dans le cadre du dépistage de la sensibilité à la tremblante ovine. Le gène PrP est également présent chez le chien. Ce test a alors été utilisé afin de quantifier le nombre de cellules gastriques présentes dans les échantillons testés.

Aucune gamme étalon n'existait pour la quantification du nombre de copie par puits. Néanmoins, la valeur du Ct a permis une quantification relative, appropriée pour notre étude.

2.2.2. PCR en temps réel « marqueur cellulaire »

La PCR a été réalisée dans un volume final de 25 µL. Le mélange {amorces de PCR + sondes Taqman®} a été préparé de la manière suivante :

- 600 nM d'amorce spécifique « gène PrP » (amorce gène PrP sens et gene PrP reverse, **Scanelis**)
- 150 nM de sondes Taqman® (sonde 154-R, sonde 154-H, **Scanelis**)

Le mélange a été aliquoté par 100 réactions (750 µL), puis reconstitué, selon besoin, avec 1250 µL de 2X Mastermix qPCR plus (**Eurogentec**) pour faire 2000 µL de mix. Enfin, 20 µL de ce mix ont été utilisés avec 5 µL d'acides nucléiques de l'échantillon à tester pour le mélange réactionnel final.

Tous les échantillons ont été testés en simple point. Certains contenaient des inhibiteurs de PCR, le même protocole que celui utilisé pour la quantification des hélicobactéries a alors été mis en œuvre, pour pallier ce problème.

2.3. Appareil de PCR en temps réel

La PCR et l'analyse des résultats ont été réalisés par l'appareil ABI Prism 7900 qui est un système qui combine un thermocycleur GeneAmp® pour plaques 96 puits (ou tube PCR), un système optique de précision et un ordinateur.

Il est capable de détecter l'augmentation de fluorescence générée au cours d'un test de quantification selon le procédé Taqman®, ceci grâce à des fibres optiques situées au dessous de chaque tube et reliées à une caméra CCD qui détecte en temps réel le signal émis par les groupes fluorescents libérés au cours de la PCR. Le logiciel SDS (Sequence Detection System) trace les courbes de cinétique d'amplification et permet d'extrapoler les quantités de cibles initiales.

Pour les tests « hélicobactéries », la gamme étalon a été déposée sur chaque plaque, permettant ainsi de standardiser les mesures.

Pour les tests « marqueurs cellulaire », il a été convenu d'appliquer la même valeur pour le seuil de positivité (threshold = 0.038) pour la détermination des CT (Cycle Threshold, cf. lexique).

2.4. Statistiques

Afin de comparer les quantités de bactéries mesurées d'une région gastrique à l'autre, un test de comparaison de pourcentage d'écart par rapport à la moyenne a été réalisé.

III. Méthodes de discrimination des souches

3.1. PCR classique Uréase

3.1.1. Préparation du mélange réactionnel

Contrairement à la séquence d'ADN codant pour l'ARNr 16S, très conservée d'une souche à l'autre, la séquence du gène Uréase B des hélicobactéries présente une importante hétérogénéité. C'est la raison pour laquelle il a été choisi de travailler à partir de l'étude de ce gène pour différencier les souches plus facilement.

L'objectif de la PCR classique de ce gène était d'amplifier un fragment du génome des hélicobactéries présentes dans chaque échantillon afin d'avoir du matériel pour les étapes ultérieures d'identification d'espèce.

La sonde Uréase a été dessinée pour la détection du genre « Helicobacter », en diagnostic de routine (**Scanelis**).

La PCR a été réalisée dans un volume final de 50 µL contenant :

- 600 nM d'amorce spécifique « uréase d'hélicobactérie » (amorce « gène uréase » sens et anti-sens, **Scanelis**),
- 200 µM de dNTPs (**Eppendorf**)
- 2 mM de MgCl₂ (**Invitrogen**)
- Tampon PCR 10X (**Invitrogen**)
- Taq DNA polymérase Platinum® (**Invitrogen**)
- 5 µL de l'échantillon à tester.

3.1.2. Thermocycleur et électrophorèse sur gel

Les différents mélanges réactionnels ont été placés dans un thermocycleur Master Gradient (**Eppendorf**). Les conditions des différentes étapes de la PCR « gène uréase » étaient programmées afin que la réaction soit optimale.

Les produits de PCR obtenus ont ensuite été déposés sur un gel d'électrophorèse à 1.5 % d'agarose. La migration a été réalisée à 92 volts pendant 20 minutes. Pour chaque série étaient également déposés un témoin négatif et un témoin positif de la PCR ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire.

La révélation a ensuite été réalisée grâce à un transilluminateur à UV. Les bandes obtenues étaient de 500 paires de bases environ.

En raison de la présence d'inhibiteurs de PCR, certains échantillons ont dû être utilisés à des dilutions au 1/5 et au 1/10 afin que la PCR donne un résultat positif.

3.2. Méthode de discrimination par digestion enzymatique

3.2.1. Principe, la technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

En analysant les séquences ADN du gène Uréase des souches de *H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. salomonis* et « *H. heilmannii* » déposées dans la GenBank Database (**source internet NCBI**) à l'aide du logiciel Vector NTI (**Invitrogen**), il a été possible de sélectionner des enzymes de restriction permettant de différencier ces souches entre elles en fonction de la longueur des fragments de restriction.

Les enzymes Dra I, Apa I et Pst I (**Roche**) ont été sélectionnées.

3.2.2. Méthode

Le mélange réactionnel a été préparé selon le protocole décrit par le fournisseur (**Roche**). Ensuite, le mélange a été mis à incuber pendant 1 heure à la température optimale d'action de l'enzyme. Le produit de cette réaction a ensuite été placé sur gel, pour électrophorèse et observation de la taille des fragments obtenus.

Chaque enzyme a été testée de manière indépendante. Chaque échantillon pour lequel la quantité d'amplicons formés était suffisante a été testé avec les 3 enzymes, soit 30 échantillons du corps, 30 échantillons du fundus, et 26 échantillons de l'antre.

3.3. Clonage

3.3.1. Principe

Afin d'identifier précisément les hélicobactéries présentes dans un échantillon multi-infecté, la technique du clonage a été utilisée.

Au moyen de la PCR Uréase, chaque souche d'hélicobactérie présente par échantillon a conduit à la formation de produits de PCR distincts. Ces fragments ont été insérés dans un plasmide ouvert. Ce plasmide recombinant a ensuite transformé une bactérie compétente, qui, une fois déposée sur un milieu de culture adéquat, a donné une colonie de bactéries présentant toutes le même couple {plasmide + séquence Uréase}. Chaque colonie a ensuite développé sa propre copie de gène Uréase.

Après criblage des clones recombinants d'intérêt, c'est-à-dire ceux contenant le fragment de gène Uréase, ceux-ci sont traités par digestion enzymatique (technique RFLP, cf supra) afin d'isoler les différents clones puis les fragments de gène uréase sont séquencés.

Le screening de tous les clones issus d'un même échantillon a ainsi permis de dresser la liste des hélicobactéries présentes.

3.3.2. Méthode

3.3.2.1. Ligation dans le plasmide pGEM®-T Easy

Les produits de la PCR « uréase » ont été mis en présence de plasmides ouverts. Une enzyme, la ligase, permettait d'insérer une copie d'ADN au niveau de l'ouverture du plasmide et de liquer les extrémités plasmide du plasmide avec ceux de l'insert.

Le protocole utilisé a été adapté de celui fourni avec le kit commercial pGEM®-T Easy Vector System (**Promega**).

Mélange réactionnel pour un échantillon :

- Tampon de réaction 10X : 5 µL
- Plasmide pGEM®-T Easy (dilué ¼) : 1 µL
- T4 (ligase): 1 µL
- Eau : 6 µL
- Echantillon de PCR uréase : 1 µL

Enfin, le milieu réactionnel a été mis à incuber à 16°C pendant 12 heures.

3.3.2.2. Transformation des bactéries

C'est l'étape durant laquelle le couple {plasmide + insert} est incorporé dans une bactérie compétente.

3 µL de la préparation de ligation ont été placés avec 25 µL de bactéries compétentes (*Escherichia coli*, JM109 Competent Cells, **Promega**). Un choc thermique a été imposé aux bactéries afin de faciliter l'entrée des plasmides.

Les bactéries ont ensuite été déposées sur un milieu de culture spécifique LB Agar + Ampicilline 50 pg/ml + X-gal (100 pg/ml) + IPTG (133 pg/ml). L'incubation a duré 24 heures, à 37°C.

3.3.2.3. Sélection des colonies

La particularité du plasmide est de permettre à la bactérie de résister à l'ampicilline, ce qui constituait un premier moyen de sélection des colonies.

De plus, si la ligation du plasmide et de l'insert était correcte, la bactérie ne dégradait pas un substrat (X-gal) présent dans le milieu de culture, en un produit affichant une couleur bleue. Une couleur blanche de la colonie indiquait donc que celle-ci contenait un insert. C'était un second moyen de sélection des colonies sur le milieu de culture.

3.3.3. Méthode de vérification de l'insertion : la PCR M13-M13 Rev (**Promega**)

Cette PCR a permis de vérifier, dans une colonie sélectionnée, que la taille de l'insert correspondait à celle du produit de PCR « uréase ». En effet, il est arrivé qu'un produit non spécifique tel qu'un amas de dimères d'amorces se soit ligué au plasmide.

Les amorces utilisées se fixaient sur le plasmide, en marge de l'insert. Le résultat de la PCR était donc la copie d'un fragment contenant l'insert « uréase » ainsi qu'un fragment de plasmide à chacun de ses pôles. L'électrophorèse sur gel a révélé des copies d'une taille de 750 paires de bases (500 pb pour l'insert et 250 pb de plasmide repartis de part et d'autre de l'insert). La PCR a été réalisée au moyen d'un thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 (**Applied Biosystems**).

Pour chaque échantillon, les produits de PCR obtenus ont été testés avec les 3 enzymes de restriction à disposition, en vue d'avoir une estimation de la nature des souches présentes. Cette méthode constituait un premier criblage permettant de savoir quelles colonies présentaient différents inserts.

Une fois les colonies à inserts « uréase » différents correctement identifiées, leur produit de PCR était préparé pour le séquençage. Le séquençage représente la méthode de choix de discrimination des souches.

3.3.4. PCR classique « ARNr 16S »

L'objectif de cette PCR a été de donner des copies du brin d'ADN codant pour l'ARNr 16S de quelques souches particulières afin d'une part de vérifier qu'il s'agissait bien

d'hélicobactéries, et d'autre part, de pouvoir observer le degré de similitude de ces différentes souches.

Les amorces ont été dessinées au laboratoire Scanelis et la PCR optimisée pour le dépistage des hélicobactéries chez la souris de laboratoire. Le même protocole a été utilisé.

La PCR a été réalisée dans un volume final de 50 µL contenant :

- 600 nM d'amorce spécifique « ARN 16S Helicobacter » (amorce Hel 1 et Hel 2, **Scanelis**)
- 200 µM de dNTPs (**Eppendorf**)
- 1.5 mM de MgCl₂ (**Invitrogen**)
- du Tampon PCR 10 X (**Invitrogen**)
- Platinum® Taq DNA polymérase (**Invitrogen**)
- 5 µL d'acide nucléique de l'échantillon à tester.

Le thermocycleur utilisé était le GeneAmp® PCR System 9700 (**Applied Biosystems**) programmé de manière spécifique pour cette PCR. L'électrophorèse et la révélation ont ensuite été effectuées selon le protocole habituel.

3.4. Analyse des séquences des brins « Uréase » et « ARNr 16S »

3.4.1. Procédé

Le séquençage était assuré par **Millegen** (Labège, 31, France).

Ont été envoyés au séquençage :

- le produit de PCR « uréase » de chaque échantillon ne présentant pas de co-infection avec différentes souches d'hélicobactéries.
- les produits des PCR « M13-M13 Reverse » des colonies issues des échantillons « multi-infectés ».
- les produits de la PCR gène « ARNr 16S » des quelques souches particulières (cf. supra).

3.4.2. Analyse des séquences et recherche d'homologies (Blast)

La séquence d'ADN a été comparée avec les séquences références déposées sur internet au moyen du programme BLASTN 2.2.10 disponible sur le site de la NCBI (National

Center for Biotechnology Information, 1^{er} semestre 2005). Les séquences des brins uréase et ARNr 16S ont été comparées à celles déposées sur la GenBank Database, un score de similarité avec la séquence déposée a été adjoint à chaque comparaison.

Adresse URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

3.4.3. Alignement des séquences

Toutes les séquences « uréase » obtenues ont été vérifiées et corrigées si nécessaire grâce aux chromatogrammes et à l'aide du logiciel d'analyse de séquence Vector NTI (**Invitrogen**) puis alignées sur 395 paires de bases communes avec le logiciel d'alignement AlignX.

Les séquences d'ADN ont également été converties en séquences protéiques, elles aussi alignées à l'aide du logiciel AlignX. Les séquences « Uréase » des souches de référence, et quelques autres, déposées sur la GenBank Database, ont été identifiées et rajoutées à l'alignement de nos séquences.

Il a été fait de même pour l'alignement des séquences « ARNr 16S ».

3.4.4. Etablissement d'un arbre phylogénétique (ADN et protéines)

AlignX a dessiné le phénogramme que l'on peut obtenir à partir des alignements de séquence d'ADN et de protéine. Ce graphique reste approximatif car le logiciel n'effectue pas les analyses de bootstrap (cf lexique).

Troisième partie :

Analyse, interprétation et discussion des résultats

I. Discussion concernant la quantification des hélicobactéries

1.1. Premières observations

1.1.1. Prévalence des hélicobactéries

Le premier résultat de la PCR en temps réel des échantillons provenant des 36 chiens révèle **une positivité de 100 % des animaux**. Toutes les biopsies (antre, fundus, corps) sont positives, à l'exception d'un échantillon de corps de l'estomac, qui malgré les essais successifs est toujours resté négatif. Chez ce même animal, les échantillons provenant de l'antre et du fundus sont très faiblement positifs. Cet animal est infecté mais la quantité d'hélicobactéries présentes sur la biopsie du corps de l'estomac est soit trop faible pour être détectée par la technique utilisée, soit nulle.

Quelques échantillons possèdent la particularité d'être très faiblement positifs ce qui nécessite une interprétation des valeurs attribuées par le logiciel de calcul.

Tableau 1 : Nombre et répartition des échantillons faiblement positifs (CT > 35 cycles)

Région	Antre	Fundus	Corps
Nombre d'échantillons (CT > 35 cycles)	7/36	2/36	1/35
Échantillons concernés	11a, 17a, 20a, 22a, 27a, 29a, 35a	11f, 27f	11c

Des valeurs de CT (Cycle Threshold, cf. lexique) supérieures à 35 cycles permettent uniquement de conclure sur la faible positivité de l'échantillon. La valeur de quantification, calculée par ordinateur, s'y rapportant n'a pas de réelle signification biologique. Passé ce seuil, il y aurait moins de 40 bactéries détectées par puits de PCR (cf. tableaux 1 et 2)

1.1.2. Comparaison des résultats obtenus à partir des différents types de PCR

Dans l'étude menée par Marie DUBESSET-THOMAS, les échantillons des différentes biopsies gastriques ont été testés au moyen d'une PCR réalisée avec des amorces conçues à partir de l'étude de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S, sur une portion spécifique aux hélicobactéries.

Dans l'étude présente, plusieurs types de PCR ont été réalisés sur les échantillons :

- PCR en temps réel au moyen d'amorces ARNr 16s spécifiques des hélicobactéries et optimisées pour cette technique.

- PCR classique au moyen d'amorces conçues à partir de l'étude de la séquence du gène uréase du genre *Helicobacter*.

Il y a peu de différence entre les résultats des PCR classiques ARNr 16S et uréase, même s'il faut noter que la recherche de l'ADN bactérien par les amorces uréase est légèrement moins sensible (cf. tableaux 2 et 3).

En ce qui concerne les échantillons très faiblement infectés, **la PCR en temps réel est une technique plus sensible que la PCR classique suivie d'une électrophorèse sur gel**. Les échantillons sont franchement positifs en PCR classique dès environ 500 brins d'ADN.

Quelques échantillons se révèlent négatifs en PCR classique alors qu'en PCR en temps réel, la population bactérienne apparaît importante. La présence d'inhibiteurs de réaction dans les PCR classiques pourrait expliquer cette observation (cf. lexique).

Tableau 2 : Comparaison des résultats obtenus pour chaque échantillon à partir des différentes PCR réalisées.

Les échantillons sont classés par région gastrique et par quantité décroissante.

Les résultats « PCR ARNr 16S » sont ceux obtenus par Marie DUBESSET-THOMAS en 2001.

La PCR en temps réel donne une estimation du nombre de brins d'ADN cible contenu dans 5µl d'échantillon.

antre				fundus				corps			
Ech	PCR en temps réel	PCR uréase	PCR ARN 16s	Ech	PCR en temps réel	PCR uréase	PCR ARN 16s	Ech	PCR en temps réel	PCR uréase	PCR ARN 16s
26a	819856	+	+	36f	1556262	+	+	13c	917331	+	+
24a	484859	+	+	33f	893490	+	+	18c	833091	+	+
36a	212466	+	+	18f	564714	+	+	23c	530126	+	+
16a	199045	+	+	25f	420252	+	+	36c	459832	+	+
18a	189437	+	+	26f	309002	+	+	26c	43740	+	+
1a	166157	+	+	13f	272363	+	+	19c	420557	+	+
33a	64539	+	+	16f	255906	+	+	24c	404369	+	+
34a	64085	+	+	29f	246009	+	+	16c	378451	+	+
3a	48409	+	+	7f	239758	+	+	25c	368939	+	+
19a	34201	+	+	10f	225406	+	+	10c	354061	+	+
7a	29095	+	+	1f	218170	+	+	7c	346319	+	+
28a	26570	+	+	15f	171208	+	+	12c	270544	+	+
25a	15995	+	+	9f	168000	+	+	32c	245639	+	+
6a	9313	+	+	28f	165998	+	+	1c	216313	+	+
13a	7065	+	+	19f	153097	+	+	3c	203241	+	+
14a	4158	+	+	4f	121757	+	+	28c	200098	+	+
2a	4031	+	+ faible	12f	119752	+	+	6c	186450	+	+
15a	2888	-	+	32f	110981	+	+	34c	185630	+	+
4a	1856	+	+ faible	14f	108605	+	+	33c	177082	+	+
10a	985	+	-	24f	95769	+	+	4c	154956	+	+
23a	549	+	-	23f	92204	+	+	21c	127780	+	+
5a	546	+	+ faible	3f	89163	+	+	2c	126006	+	+
9a	452	+ faible	-	6f	77806	+	+	9c	112664	+	+
21a	404	-	+ faible	31f	69652	+	+	8c	72339	+ faible	+
32a	150	+ faible	+	35f	67330	+	+	5c	51872	+	+
8a	147	-	+	2f	50946	+	+	35c	49690	+	+
12a	123	+ faible	-	8f	43562	+ faible	+	14c	40827	+	+
30a	86	-	-	21f	19539	+	+	31c	38048	+	+
31a	80	-	-	34f	15963	+	+	15c	29284	+ faible	+
35a	38	-	-	17f	14388	+ faible	+	29c	27819	+ faible	+
29a	36	-	-	5f	13600	+	+	27c	16882	-	+
27a	19	-	-	30f	8424	+	+	30c	12955	+	+
20a	9	-	-	20f	223	-	-	17c	596	+ faible	+
11a	4,85	-	-	22f	193	-	-	20c	367	-	+ faible
17a	0,48	-	+	11f	1,39	-	-	11c	20	-	-
22a	0,29	-	-	27f	1,18	-	-	22c	0	-	-

Tableau 3 : Nombre d'échantillons positifs selon la méthode de PCR employée

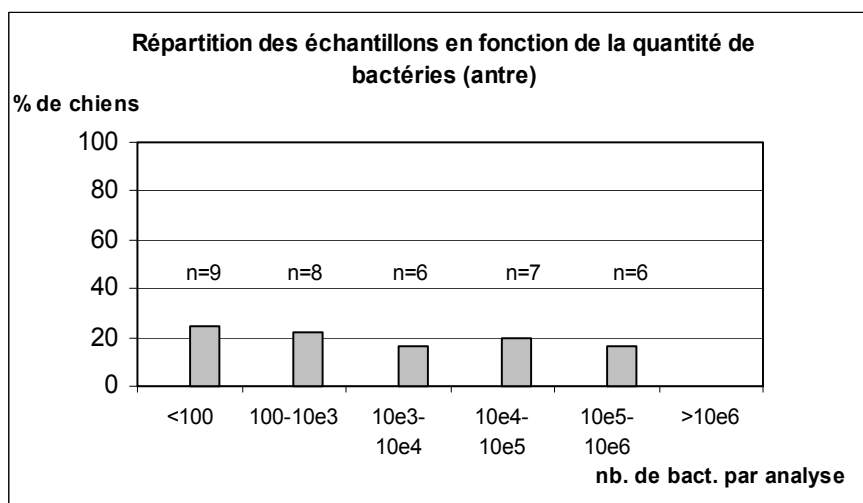
Méthode Région	PCR ARNr 16S (étude 2001)	PCR uréase	PCR en temps réel
Antre	24/36	24/36	36/36
Fundus	32/36	32/36	36/36
Corps	34/36	32/36	35/36

L'écart entre les PCR classiques et la PCR en temps réel s'explique par la différence des seuils de détection des méthodes ainsi que par le nombre élevé d'échantillons assez pauvre en matériel génétique d'hélicobactéries, en particulier ceux provenant de l'antre.

1.2. Répartition des hélicobactéries au sein des différentes régions gastriques

1.2.1. Echantillons provenant de l'antre

Graphique 1 : Répartition des échantillons de l'antre selon la quantité de bactérie mesurée

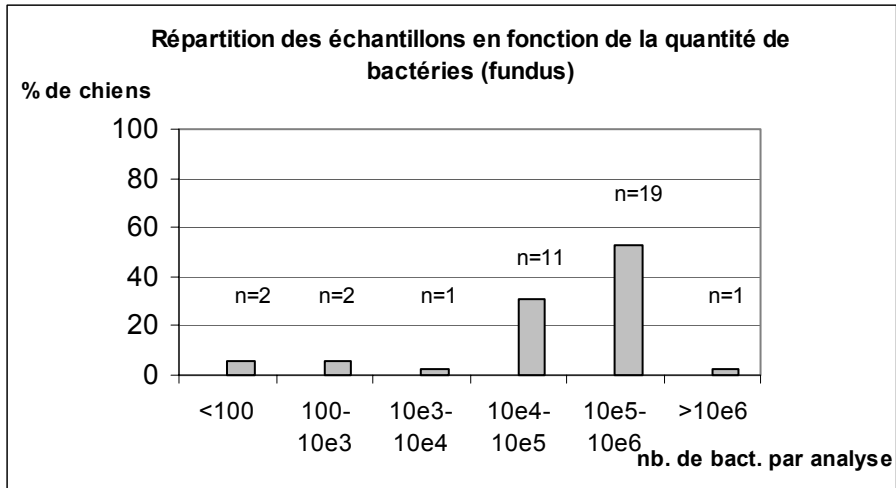


Quantité de bactéries / analyse	<math><100</math>	$100-10^3$	10^3-10^4	10^4-10^5	10^5-10^6	$>10^6$
Répartition des échantillons	25% (9/36)	22.2% (8/36)	16.7% (6/36)	19.4% (7/36)	16.7% (6/36)	0

La répartition des échantillons est très homogène. Certains prélèvements sont très infectés alors que d'autres le sont peu, mais aucune situation ne se démarque.

1.2.2. Echantillons provenant du fundus

Graphique 2 : Répartition des échantillons du fundus selon la quantité de bactérie mesurée

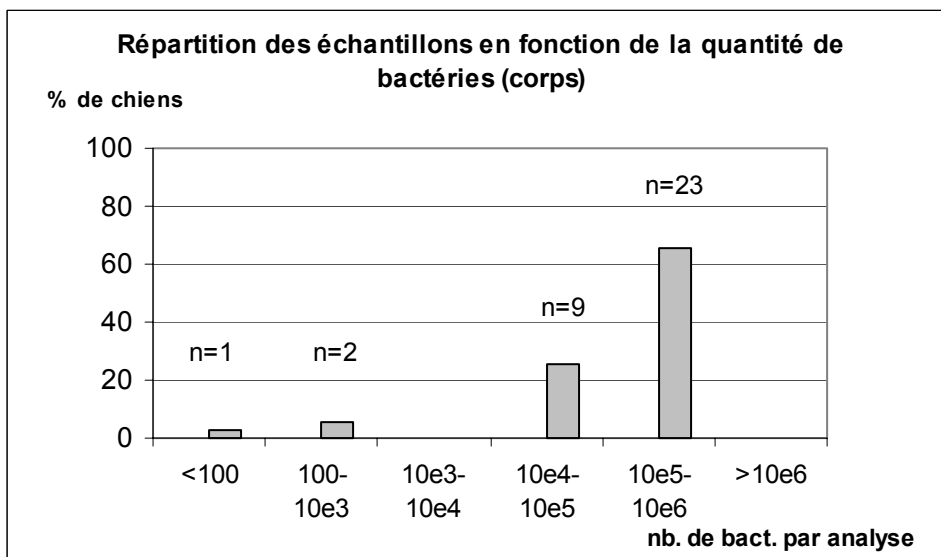


Quantité de bactéries / analyse	<100	100 -10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10e5	10e5 -10e6	>10e6
Répartition des échantillons	5.5% (2/36)	5.5% (2/36)	2.8% (1/36)	30.6% (11/36)	52.8% (19/36)	2.8% (1/36)

La majeure partie des échantillons provenant du fundus contient de très grandes quantités d'hélicobactéries.

1.2.3. Échantillons provenant du corps

Graphique 3 : Répartition des échantillons du corps selon la quantité de bactérie mesurée

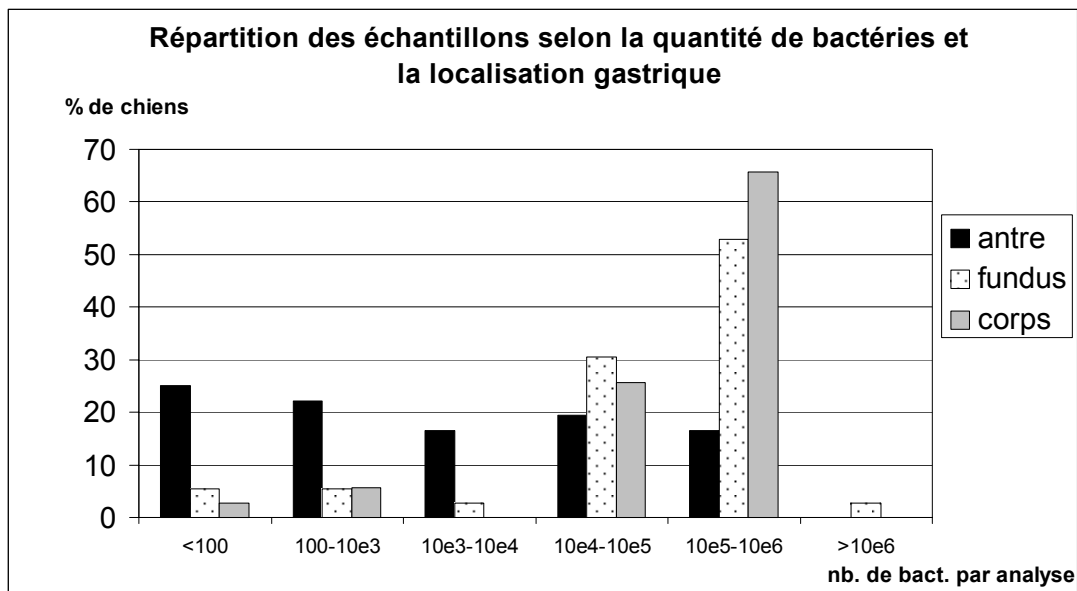


Quantité de bactéries / analyse	<100	100 -10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10e5	10e5 -10e6	>10e6
Répartition des échantillons	2.8% (1/35)	5.8% (2/35)	0	25.7% (9/35)	65.7% (23/35)	0

La répartition des quantités de bactéries entre échantillons du corps est sensiblement identique à celle du fundus. Ces échantillons contiennent également, dans leur majorité, un très grand nombre d'hélicobactéries.

1.2.4. Comparaison des quantités de bactéries selon les localisations

Ce graphique est la réunion des trois graphiques précédents.



Graphique 4 : Répartition des échantillons, en fonction de leur localisation, selon la quantité de bactéries mesurées.

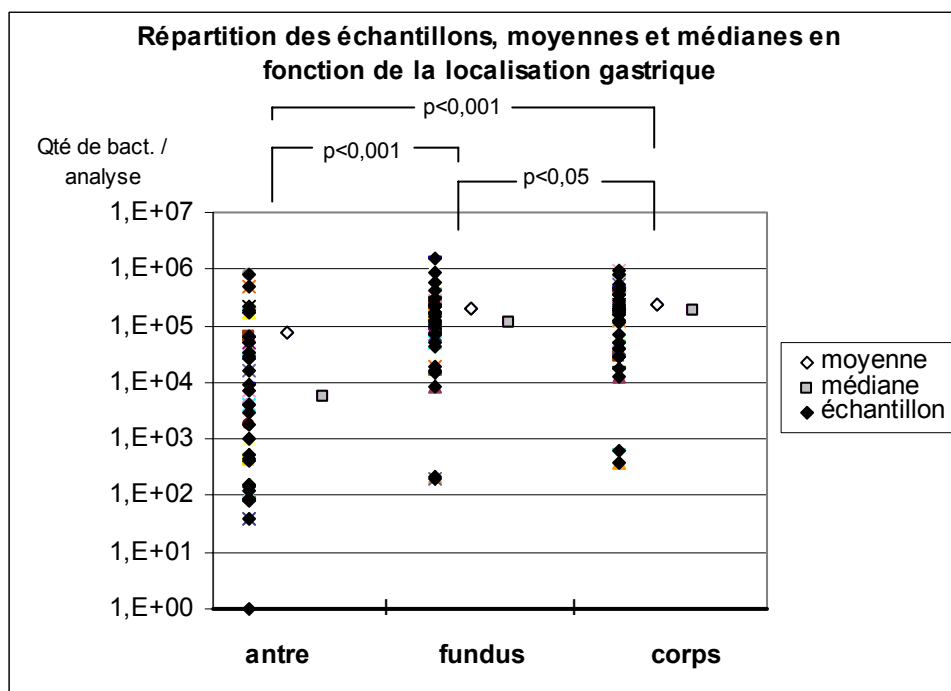
La PCR en temps réel révèle que les biopsies provenant des régions du corps et du fundus de la majorité des individus présentent de très grandes quantités d'hélicobactéries. Par contre, pour la plupart des chiens, les biopsies provenant de la région de l'antre semblent être peu infectées.

1.3. Calculs de quantité moyenne et médianes arithmétiques

1.3.1. Résultats et analyse

Les moyennes et médianes arithmétiques sont calculées à partir des séries de valeurs des échantillons de chaque localisation. Cependant, les quantités trop faibles, attribuées par le logiciel, n'ont pas été prises en compte lors du calcul de la moyenne et de la médiane.

Graphique 5 : Répartition des échantillons et calculs des moyennes et médianes par localisation gastrique.



Région	antre	fundus	corps
Nombre d'échantillons comptabilisés dans les calculs	30	34	34
Moyenne (nb de bactéries par analyse)	77020 ^a	205279 ^b	235222
Médiane (nb de bactéries par analyse)	5612	115367	186040

Test de comparaison de pourcentage d'écart par rapport à la moyenne :

a: antre vs fundus: $p < 0.001$ et antre vs corps : $p < 0.001$

b: fundus vs corps: $p < 0.05$

Lors des analyses, la médiane est toujours associée à la moyenne car la valeur de cette dernière peut devenir non représentative. En effet, la présence d'un échantillon de valeur trop élevée ou trop faible peut modifier considérablement la valeur de la moyenne.

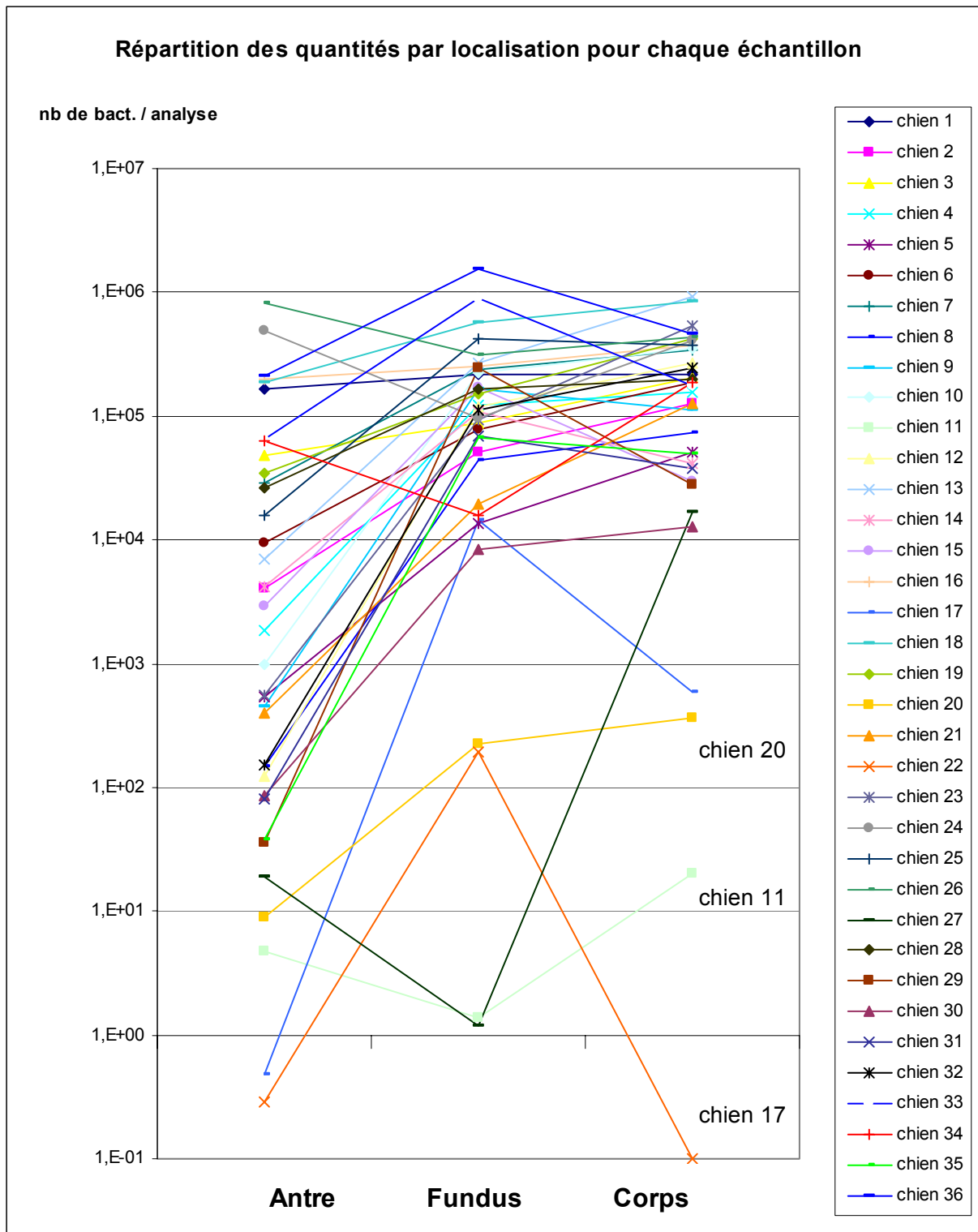
Les valeurs moyennes sont significativement différentes entre les 3 régions. La quantité de bactéries présentes dans les échantillons du corps est plus importante que dans ceux provenant du fundus. Les échantillons provenant de l'antre présentent des quantités relativement faibles d'hélicobactéries.

1.3.2. Classement des échantillons

La quantification mathématique et le tri des valeurs par ordre décroissant permettent de classer, pour chaque localisation, les différents échantillons entre eux (cf. tableau 4).

Parmi les cinq prélèvements présentant le moins d'hélicobactéries, trois chiens sont retrouvés, les chiens n° 22, 11 et 20. Ce sont les trois chiens qui semblent les moins contaminés. Par contre, il n'est pas possible de comparer les autres animaux entre eux, tant les quantités de bactéries mesurées sont élevées (cf. graphique 6)

Graphique 6 : Modélisation de la quantité de bactéries mesurée dans chaque localisation gastrique pour chaque chien



Conclusions

La PCR en temps réel est la méthode de choix de détection des hélicobactéries, elle est plus sensible que la PCR classique. Cette méthode a révélé que 100 % des chiens de notre cohorte sont infectés, soit 107 échantillons positifs sur 108.

La quantification des bactéries montre les échantillons issus du corps et du fundus ont une charge bactérienne bien supérieure à ceux de l'antre. Par ailleurs, une forte hétérogénéité de la densité infectieuse est observée entre chiens.

II. Standardisation par rapport à un gène cellulaire

2.1. Objectif

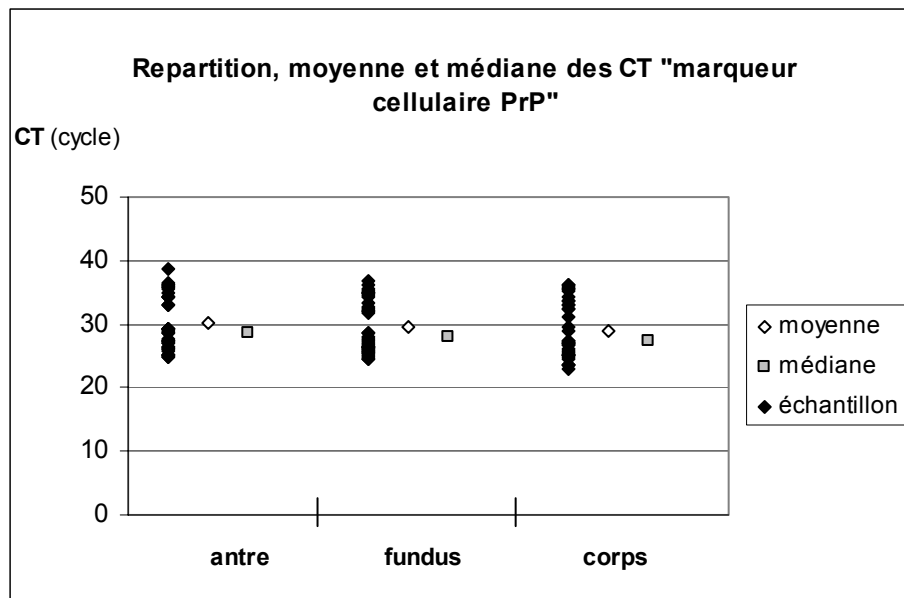
Basée sur le principe de la détection du gène cellulaire PrP présent chez le chien, la quantification de ce paramètre peut permettre d'établir un rapport entre la quantité de bactéries et la quantité de cellules gastriques présentes dans chaque échantillon.

L'objectif est de contourner le biais créé par l'imprécision relative de la quantité de matériel gastrique prélevé avec la pince à biopsie afin de pouvoir comparer les résultats de quantification d'un échantillon à l'autre.

2.2. Résultats et analyse de la quantification du marqueur cellulaire

2.2.1. Répartition des quantités d'ADN cellulaire en fonction de la zone de biopsie

Graphique 7 : Comparaison de la répartition des valeurs de CT des différents échantillons, des moyennes et des médianes suivant la localisation gastrique.



La répartition des CT semble homogène entre les différentes régions bien que pour une même localisation, une certaine hétérogénéité entre les biopsies soit observée. Il faut souligner que l'antre est une région difficile à biopsier.

Les biopsies issues des différentes zones contiennent en moyenne la même quantité de matériel cellulaire.

La quantification de ce matériel cellulaire a parfois donné de faibles réponses en PCR en temps réel qui pourraient être interprétées comme une dégradation de l'ADN des cellules gastriques. Le fait que le matériel bactérien ne soit peu ou pas dégradé, par contre, n'a pas permis d'identifier la cause de cette "dégradation sélective".

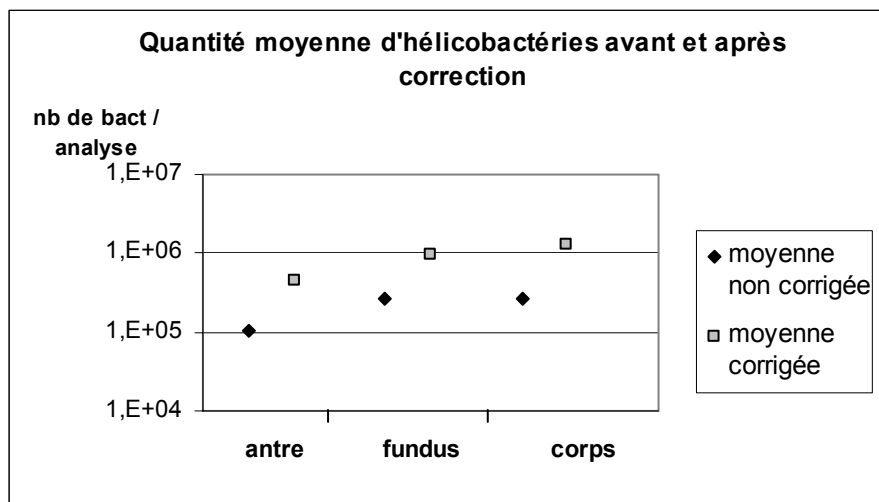
Les quantités de bactéries mesurées ont été standardisées par rapport aux échantillons.

2.2.2. Correction apportée par la quantification des cellules gastriques aux quantités de bactéries par échantillon

Le nombre de cellules gastriques des échantillons a été « standardisé » et ramené à une valeur correspondant à un CT égal à 25 cycles de PCR. La correction de la quantité d'hélicobactéries présente dans chaque échantillon est alors donnée par la formule suivante :

$$\text{Qté hélico (CT}_{PrP=25}) = \text{Qté hélico}_{\text{échantillon A}} \times 2 \times 10^{(\text{CT}_{PrP} \text{ de l'échantillon A} - 25)}$$

Graphique 8 : Comparaison des quantités moyennes de bactéries présentes dans chaque région, avant et après standardisation du nombre de cellules gastriques



Une fois la correction apportée, les valeurs des moyennes sont revues à la hausse, et ceci pour les 3 régions. Le graphique 8 montre que la correction apportée par la prise en compte du nombre de cellules gastriques est la même pour toutes les localisations.

Tableau 4 : Classement par ordre décroissant des échantillons en fonction de la quantité d'hélicobactéries avant et après correction.

antre		fundus		corps	
Echantillon sans correction	Echantillon après correction	Echantillon sans correction	Echantillon après correction	échantillon sans correction	échantillon avec correction
26a	36a	36f	33f	18c	19c
24a	18a	33f	36f	36c	36c
36a	24a	18f	9f	26c	18c
18a	33a	26f	10f	19c	26c
1a	19a	7f	18f	24c	7c
33a	1a	10f	26f	10c	10c
19a	7a	1f	32f	7c	24c
7a	26a	15f	19f	12c	33c
6a	6a	9f	7f	32c	1c
15a	10a	19f	15f	1c	8c
4a	4a	4f	6f	6c	6c
10a	15a	12f	31f	33c	12c
5a	21a	32f	17f	4c	21c
9a	31a	6f	12f	21c	32c
21a	5a	31f	1f	9c	27c
32a	32a	21f	21f	8c	9c
8a	9a	17f	4f	5c	30c
31a	8a	5f	5f	27c	5c
27a	27a	30f	30f	30c	4c

La correction apporte peu de modifications au classement entre échantillons initialement établi via les quantités de bactéries. Les échantillons fortement infectés restent en haut du classement, et les échantillons faiblement infectés en bas.

Conclusions

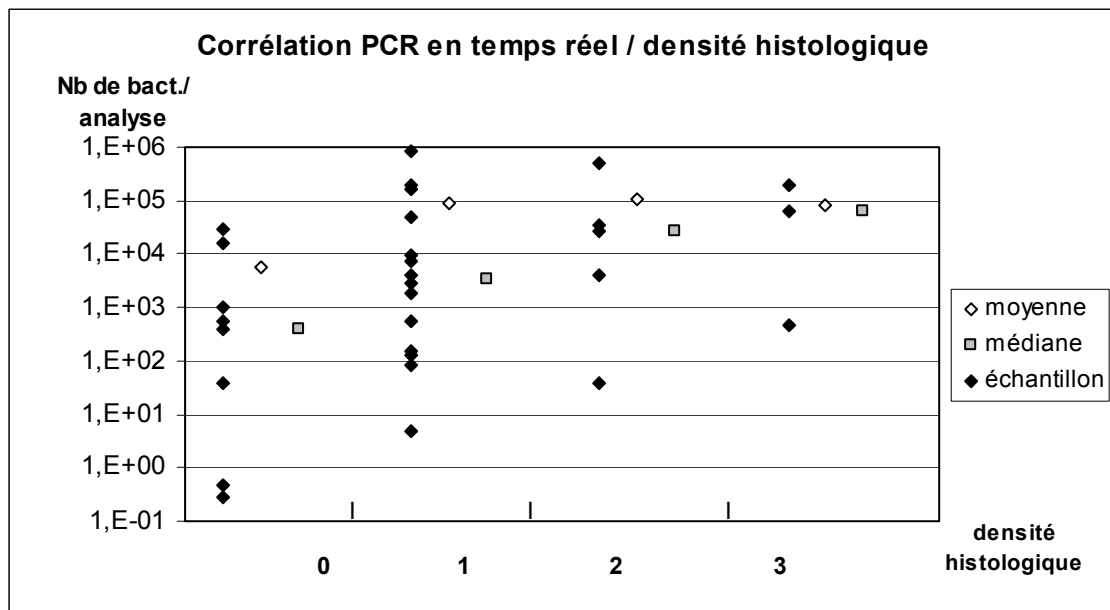
Les résultats « marqueur cellulaire gène PrP 154 » ne sont pas exploitables pour tous les échantillons. Cependant cela permet de vérifier que les biopsies contiennent en moyenne la même quantité de matériel. Ainsi les échantillons sont comparables entre eux, qu'ils soient issus de la même région gastrique ou non et cela avec ou sans correction.

III. Relation entre quantification et lésions histologiques

3.1. Corrélation quantité / densité histologique

Une densité bactérienne a été observée pour chaque échantillon de l'antre et du corps, son importance est quantifiée à l'aide d'un grading allant de 0 à 3.

3.1.1. Echantillons de l'antre

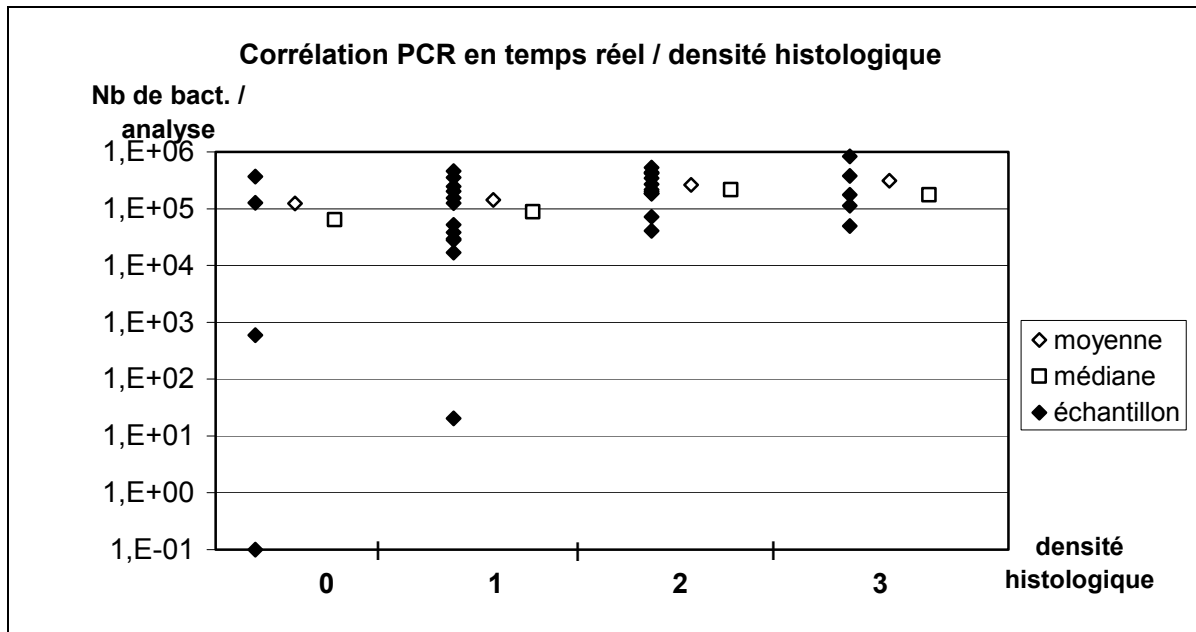


Graphique 9: Répartition, moyenne et médiane des échantillons de l'antre selon la quantité d'hélicobactéries mesurée par PCR et la densité bactérienne observée en histologie.

densité histologique	0	1	2	3
Nb. d'échantillons	8/30	14/30	5/30	3/30
Moyenne (nb. de bactéries par analyse)	5883	89966	109965	84658
Médiane (nb. de bactéries par analyse)	404	3459	26570	64085

Le nombre et la répartition des échantillons montrent l'absence d'une corrélation entre la mesure réalisée au moyen de la PCR en temps réel et le grade de densité observé par l'histologiste.

3.1.2. Echantillons du corps



Graphique 10: Répartition, moyenne et médiane des échantillons du corps selon la quantité d'hélicobactéries mesurée par PCR et la densité bactérienne observée en histologie.

densité histologique	0	1	2	3
Nb d'échantillons	4/32	12/32	11/32	5/32
Moyenne (nb de bactéries par analyse)	124329	142305	264237	310196
Médiane (nb de bactéries par analyse)	64188	88939	216313	177082

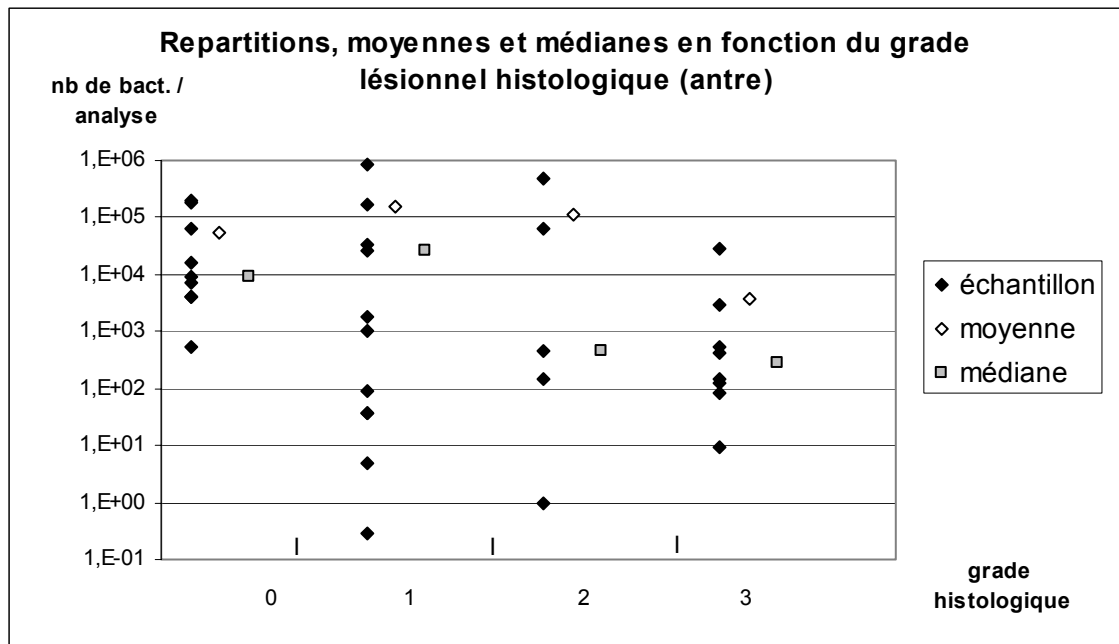
De même que pour les échantillons provenant de l'antre, le nombre et la répartition des échantillons du corps montrent l'absence de corrélation entre la mesure réalisée au moyen de la PCR en temps réel et le grade de densité observé par l'histologiste.

Cette étude souligne le fait que la quantification des hélicobactéries effectuée par PCR en temps réel ne confirme pas l'échelle de densité bactérienne établie par l'histologie des échantillons.

3.2. Corrélation entre quantité de bactéries et grade lésionnel histologique

3.2.1. Antre de l'estomac

Pour 33 animaux sur 36, la sévérité des lésions des tissus gastriques prélevés au niveau de l'antre a été classée selon un grade histologique allant de 0 à 3.



Graphique 11 : Répartition, moyenne et médiane des échantillons de l'antre selon le grade histologique attribué.

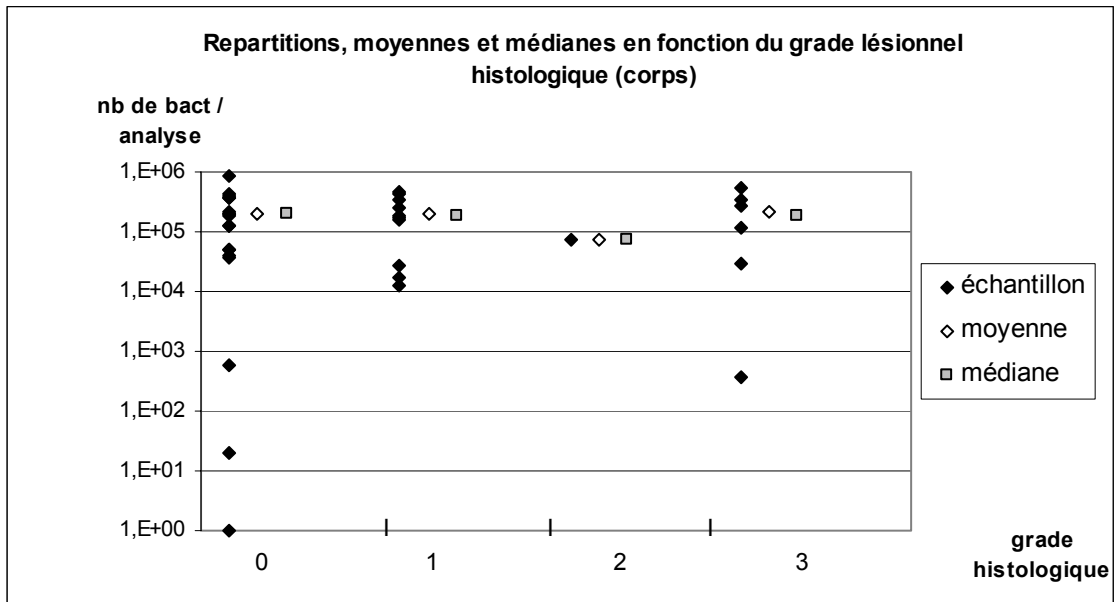
Grade lésionnel	0	1	2	3
Nombre d'échantillons	9/33	11/33	5/33	8/33
Moyenne (nombre de bact. par analyse)	54903	149959	109909	3716
Médiane (nombre de bact. par analyse)	9313	26570	452	277

Pour chaque grade histologique, une répartition très hétérogène des quantités d'hélicobactéries est observée. Beaucoup d'échantillons classés en grade 0 et 1 ont des quantités d'hélicobactéries plus importantes que ceux classés en grade 2 et 3. Certains échantillons contenant beaucoup de bactéries ont un grade lésionnel histologique de 0.

Il n'y a pas de relation entre la quantité de bactéries et la sévérité des lésions observées sur les prélèvements de l'antre.

3.2.2. Corps de l'estomac

Pour 35 animaux sur 36, la sévérité des lésions des tissus gastriques prélevés au niveau du corps a été classée selon un grade histologique allant de 0 à 3.



Graphique 12: Répartition, moyenne et médiane des échantillons du corps selon le grade histologique attribué.

Grade lésionnel	0	1	2	3
Nombre d'échantillons	18/35	10/35	1/35	6/35
Moyenne (nombre de bact. par analyse)	207110	207226	72339	214884
Médiane (nombre de bact. par analyse)	193274	181356	72339	191604

Les répartitions des quantités de bactéries sont plus homogènes que dans l'antre et, quel que soit le grade histologique de la lésion, les quantités de bactéries mesurées sont très élevées. Parmi les échantillons du corps ayant un grade histologique de 0, les quantités de bactéries mesurées sont très variables d'un échantillon à l'autre.

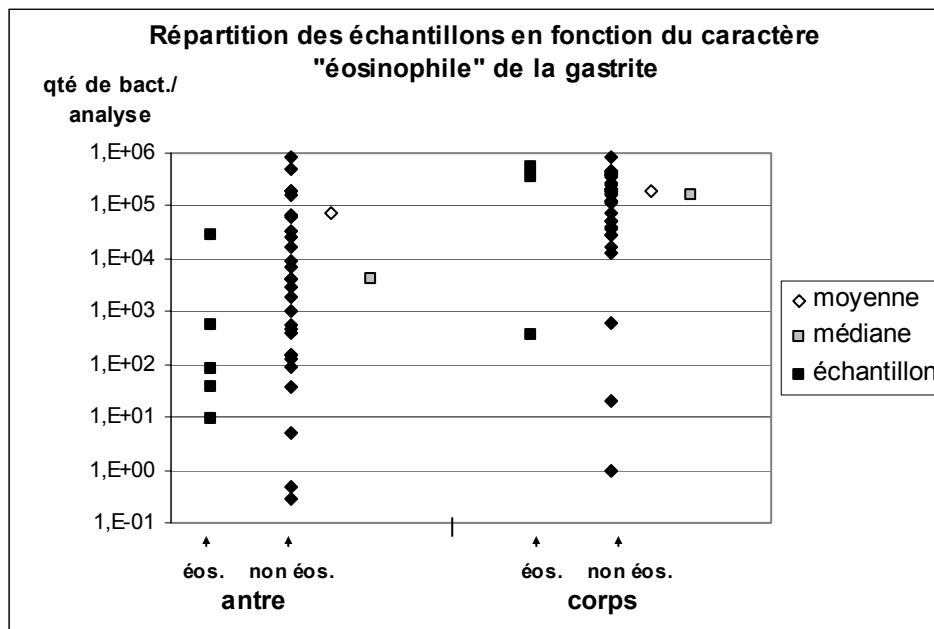
Il n'y a pas de relation entre la quantité de bactéries et la sévérité des lésions observées sur les prélèvements du corps.

La comparaison de l'aspect lésionnel et de la quantité de bactéries présentes dans l'antre et le corps n'est pas en faveur d'une relation entre quantité d'hélicobactéries et sévérité de la gastrite.

3.3. Répartition des échantillons en fonction du caractère éosinophile des lésions

Les lésions caractéristiques de gastrites chroniques éosinophiles, gastrites chroniques spécifiques, sont l'infiltration massive de la muqueuse par des granulocytes éosinophiles souvent associée à un infiltrat inflammatoire composé de lymphocytes et de plasmocytes, une atrophie glandulaire ainsi qu'une fibrose interstitielle.

Trop peu d'échantillons présentent cette particularité (5 concernant l'antra et 3 concernant le corps) pour en déduire une relation entre la quantité de bactéries et le caractère éosinophile des lésions (cf. graphique 13).



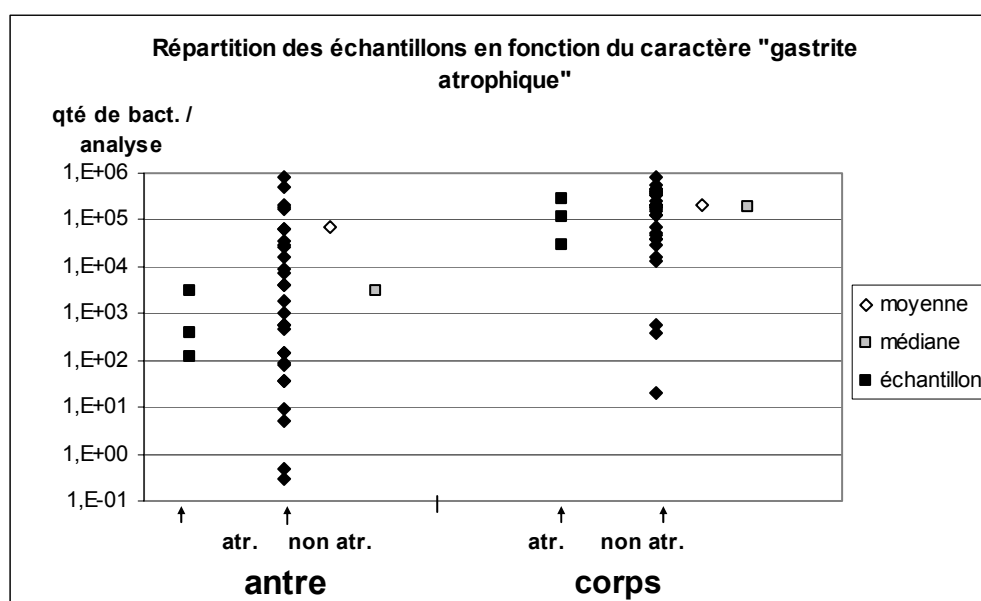
Graphique 13 : Comparaison de la répartition des échantillons « éosinophiles » avec la répartition des échantillons « non éosinophiles » accompagnée de leur moyenne et de leur médiane. Les échantillons ont été séparés suivant leur localisation gastrique.

Région	antra		corps	
	« non éosinophiles »	« éosinophiles »	« non éosinophiles »	« éosinophiles »
Nb d'échantillons	28/33	5/33	32/35	3/35
Moyenne (nombre de bact. / analyse)	74892	5953	193857	292270
Médiane (nombre de bact. / analyse)	4094	549	166019	346319

3.4. Répartition des échantillons en fonction du caractère « atrophie de la muqueuse »

C'est un grade sévère de gastrite chronique non spécifique caractérisée par une fibrose interstitielle marquée du chorion, une réduction importante du volume glandulaire et une réduction de taille des glandes sans différenciation des cellules épithéliales.

Il y a trop peu d'échantillons à caractère « gastrite atrophique » (3 concernant l'antre et 3 concernant le corps) pour en déduire une relation entre la quantité de bactéries et le caractère atrophique des lésions (cf. graphique 14).



Graphique 14 : Comparaison de la répartition des échantillons « gastrite atrophique » avec la répartition des échantillons « gastrite non atrophique » accompagnée de leur moyenne et de leur médiane. Les échantillons ont été séparés suivant leur localisation gastrique.

Région	antre		corps	
	« non atrophiques »	« atrophiques »	« non atrophiques »	« atrophiques »
Nombre d'échantillons	30/33	3/33	32/35	3/35
Moyenne (nombre de bact. / analyse)	70778	341	215089	412492
Médiane (nombre de bact. / analyse)	2943	404	185630	112664

Conclusions

Aucune relation n'est clairement établie entre la quantité et la sévérité ou la nature des lésions gastriques. Il est impossible de fixer de valeur en terme de quantité de bactéries pour définir une limite entre infection mineure et majeure ou une valeur seuil à partir de laquelle une gastrite se développe.

Il faut dès lors envisager d'autres hypothèses tel un effet souche, avec isolement d'une ou plusieurs souches pathogènes, ou encore un effet sensibilité individuelle des animaux aux hélicobactéries gastriques.

IV. Identification des différentes hélicobactéries

4.1. Premières observations

La plupart des 36 chiens de l'étude sont co-infectés avec plusieurs souches distinctes d'hélicobactéries.

« *H. heilmannii* » et *H. bizzozeronii* sont fréquemment isolées. La présence d'*H. salomonis* a été confirmée chez un chien uniquement tandis qu'aucune souche de *H. felis* n'a été isolée. A l'opposé, d'autres souches, qui ont été retrouvées en grand nombre, forment un groupe relativement homogène, provisoirement baptisé Néo.

Un échantillon présente la particularité d'une mono-infection par *H. pylori* ou tout au moins par une souche très proche.

4.2. Digestion enzymatique et co-infections

L'objectif de cette méthode était d'objectiver les échantillons infectés par de multiples souches d'hélicobactéries et de les différencier entre elles au moyen de l'utilisation d'enzymes de restrictions appropriées.

Dans le tableau suivant sont données les tailles théoriques en paires de base (pb) des fragments d'ADN obtenus après digestion et électrophorèse des produits de PCR uréase réalisés.

Tableau 5 : longueur des brins (en paires de base) obtenus par digestion du gène uréase en fonction de la souche et de l'enzyme

Souche \ Enzyme		Dra I	Apa I	Pst I
« <i>H. heilmannii</i> »	HU2, BC1	400 + 100	500	250 + 250
	HU1	280 + 120 + 100	500	500
	C3E	500	500	500
<i>H. felis</i>		400 + 100	500	430 + 70
<i>H. bizzozeronii</i>		400 + 100	450 + 50	430 + 70
<i>H. salomonis</i>		400 + 100	450 + 50	500
<i>H. pylori</i>		400 + 100	500	500

La diversité des souches « *H. heilmannii* » s'observe également par le biais de cette technique. Les souches HU2 et BC1 possèdent un site de restriction pour Dra I et Pst I, la souche HU1 possède deux sites de restrictions pour Dra I mais aucun pour les autres enzymes et la souche C3E ne possède aucun site de restriction pour ces 3 enzymes.

La méthode de la digestion enzymatique présente l'avantage de fournir la liste des échantillons multi-infectés mais ne permet de différencier précisément des souches bactériennes présentes dans ces échantillons (cf. supra). Le séquençage reste la technique de choix pour la différenciation des souches.

Ces deux techniques sont néanmoins complémentaires, car si la digestion permet de repérer une multi-infection dans un échantillon, il n'est pas évident que les différentes souches présentes soient isolées par le clonage. Ainsi, la comparaison des résultats obtenus par digestion et par séquençage permet de dresser un bilan global du « profil bactérien » présent dans chaque échantillon (cf. photo 1 et tableau 7).

Observer des fragments de différentes tailles sur le gel d'électrophorèse s'avère parfois difficile en raison des faibles quantités d'ADN et de la finesse de certaines bandes. Cela n'a donc pas été pris en compte lors des études de corrélations entre les souches clairement isolées par séquençage et le grade lésionnel des échantillons.

Photo 1 :

Visualisation des épreuves de digestion enzymatique de quelques échantillons d'une part par l'enzyme Apa I, d'autre part par l'enzyme Pst I.

M représente le marqueur de taille des fragments d'ADN (en paire de bases).

9c et 14c :

- fragments de 500 pb = non digérés
 - fragments de 400 pb = digérés
- (le fragment de 100 pb n'est pas visible) :

Le fait d'avoir plusieurs fragments de tailles différentes est fortement en faveur de la présence d'une multi-infection.

Apa I + et -; Dra I +; Pst + et - :
Compatible avec une infection à *H. bizzozeronii* et « *H. heilmannii* ».*

Le séquençage permettra d'isoler ces 2 souches.

29c, 31c et 35c:

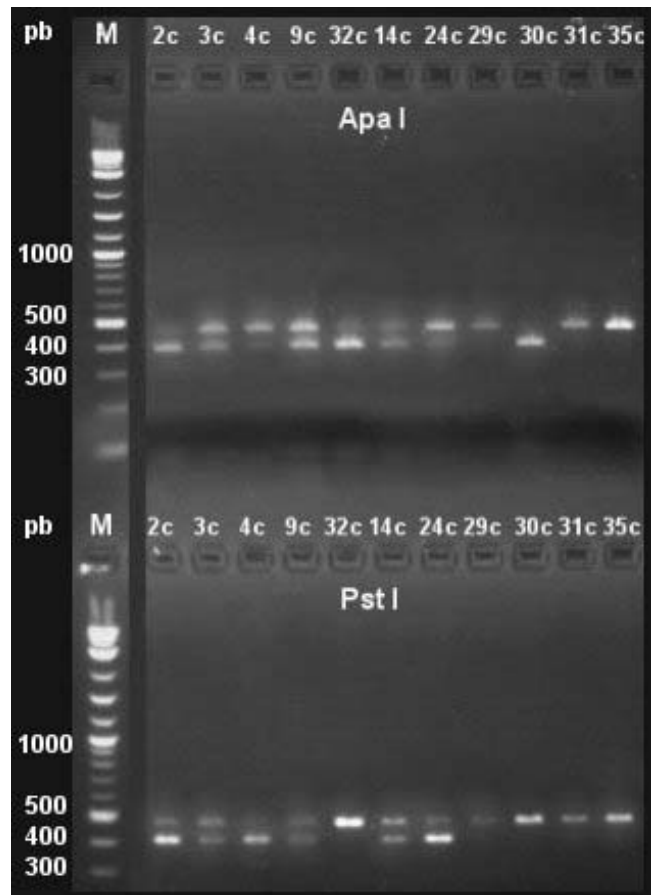
Apa I -; Dra I +; Pst I - :
En faveur d'une mono-infection à « *H. heilmannii* ».*

Ce résultat sera confirmé par le séquençage.

30c :

Apa I +; Dra I +; Pst I - :
Cela correspondrait à une mono-infection à *H. salomonis*

Le séquençage indiquera une mono-infection à *H. pylori*.



Les échantillons de l'antre, du corps et du fundus analysés par séquençage et digestion enzymatique ont permis d'identifier le «profil» en hélicobactéries de 31 chiens (cf. tableau 7).

* Le séquençage a permis de se rendre compte que toutes les séquences présentant des profils *H. pylori* se sont révélés être des « *H. heilmannii* » non prévues par le tableau 5.

4.3. Résultats des « blasts » et comparaison avec les résultats de la digestion enzymatique

Comparer des séquences d'ADN de la portion de gène uréase obtenues avec les séquences des souches références déposées sur la Databank internet (source : Website NCBI) a permis de préciser la nature des hélicobactéries présentes dans les échantillons en y adjoignant un score de similitude avec les souches déposées.

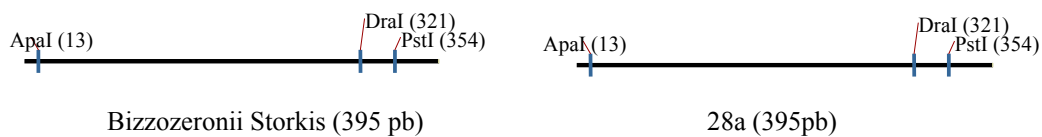
- *H. bizzozeronii* : scores proches de 98%
- *H. salomonis* : score proche de 97%
- *H. pylori* : score proche de 98%
- « *H. heilmannii* » : scores situés entre 88% et 92% au mieux. Cette observation souligne la grande hétérogénéité de l'espèce « heilmannii ».

Les échantillons de Néo se rapprochent de *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* et « *H. heilmannii* » avec des valeurs approchant 83%, indiquant par ce fait la non appartenance à ces espèces.

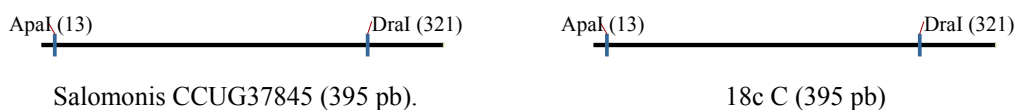
Par rapport aux « prévisions » faites lors de la digestion enzymatique quant à l'identification des souches, il faut noter certaines observations :

- Les souches *H. bizzozeronii* ont été correctement identifiées dès le séquençage. Les sites de restrictions spécifiques sont conservés pour chaque souche identifiée.

Exemple : la souche 28 a

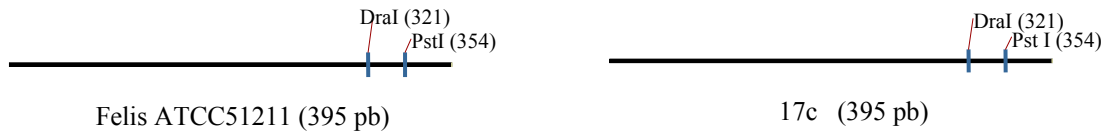


- La souche *H. salomonis* identifiée dispose des mêmes sites de restriction que la souche de référence.



- Les sites de restriction des souches Néo sont identiques à ceux de *H. felis*. Seul le séquençage permet alors de différencier ces deux souches.

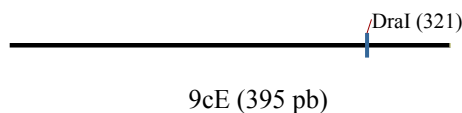
Exemple : la souche Néo 17c



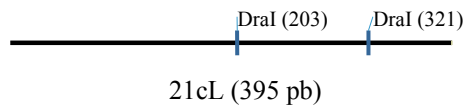
Les souches *H. felis* identifiées lors de la digestion enzymatique se sont toutes révélées être des souches Néo lors du séquençage.

- les souches reconnues comme «*H. heilmannii*» lors du séquençage ont 2 profils de digestions différents :

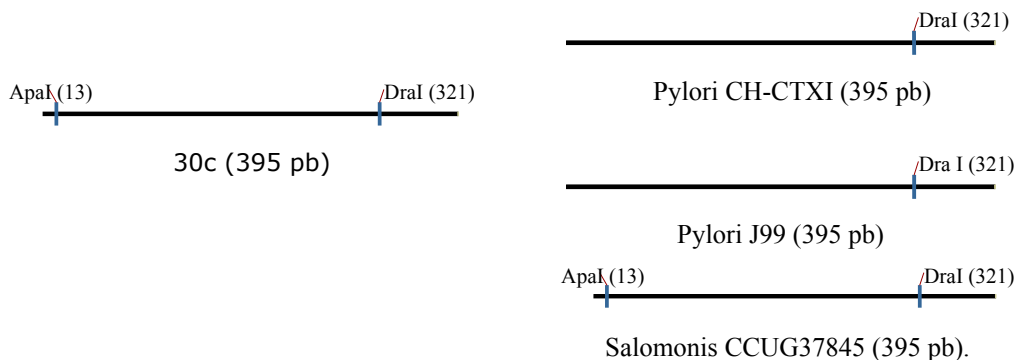
→ 1^{er} profil (le plus souvent identifié, et qui correspond également au profil de restriction des souches *H. pylori* choisis comme référence) :



→ 2nd profil (évoquant le profil de «*H. heilmannii*» HU1) :



- la souche *H. pylori* isolée dispose de deux sites de restriction alors que les souches de références utilisées n'en disposent que d'un seul, d'où la confusion avec *H. salomonis* lors de la digestion.



4.4. Arbre phylogénétique des séquences analysées

L'arbre est construit à la manière d'un phénogramme, c'est-à-dire que les différentes branches sont construites grâce aux degrés de similitude de chaque séquence d'ADN avec les autres.

La construction d'un arbre phylogénétique à partir des protéines codées par les séquences d'ADN permet de rapprocher certaines souches. En effet, en se basant sur le fait que des codons différents peuvent correspondre au même acide aminé, certaines séquences légèrement différentes peuvent coder des protéines très similaires.

La grande similarité des séquences protéiques indique que la plupart des différences au niveau des séquences d'ADN sont des mutations silencieuses.

Les séquences protéiques sont assez différentes selon les souches, et permettent ainsi de créer un arbre phylogénétique cohérent.

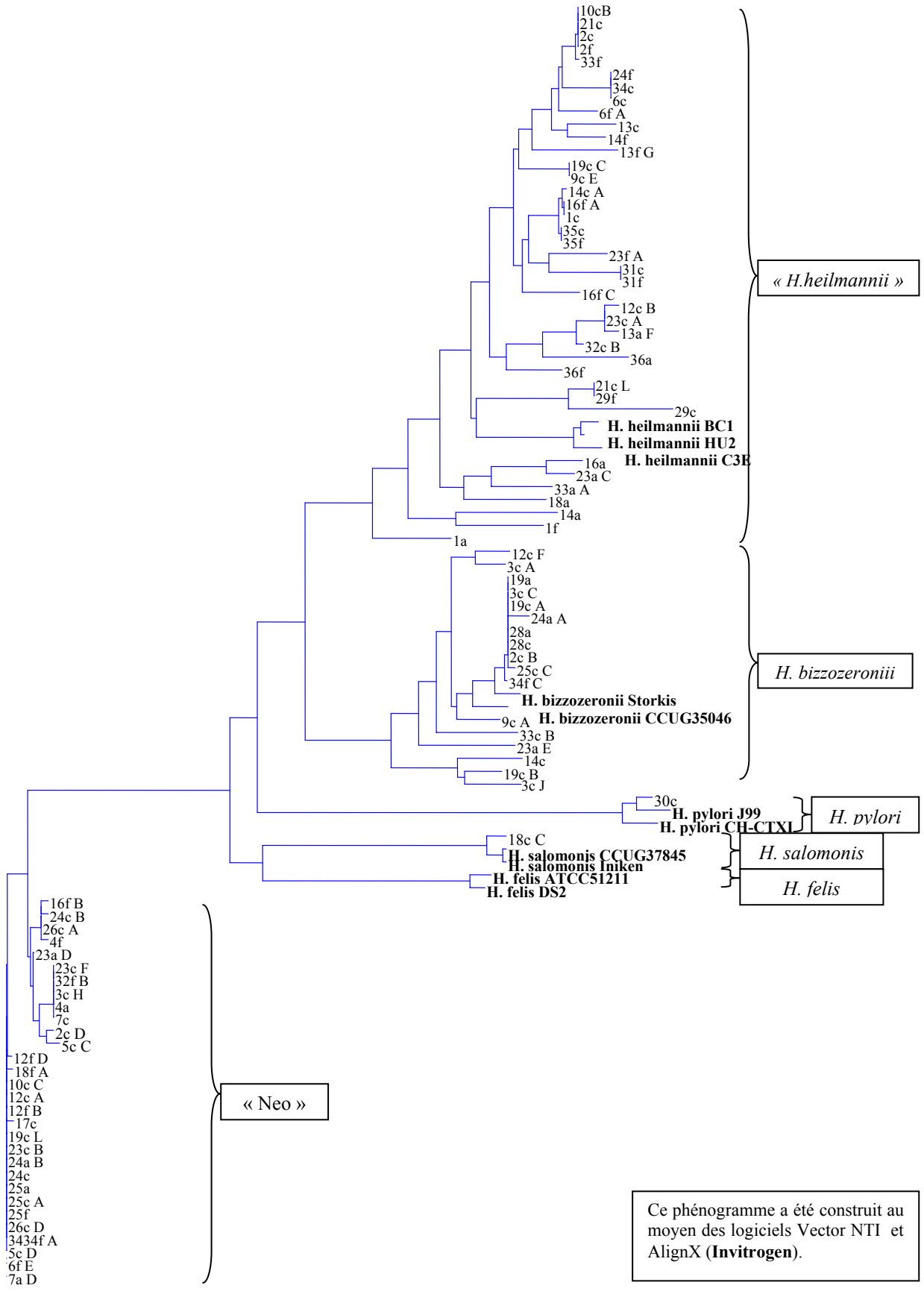
A ces deux arbres sont adjointes les séquences des souches références déposées sur la Databank internet.

Figure 1 : Phénogramme simplifié réalisé à partir de l'alignement des séquences ADN sur 395 paires de bases

30c est le nom donné à la séquence d'ADN provenant de l'échantillon 30c, échantillon pur.

18c C provient de 18c, qui est un échantillon multi-infecté. Il a fallu en isoler les différentes souches, ensuite rebaptisées 18c A, 18c B, 18c C...

Phénogramme réalisé à partir de l'alignement des séquences d'ADN



Ce phénogramme a été construit au moyen des logiciels Vector NTI et AlignX (Invitrogen).

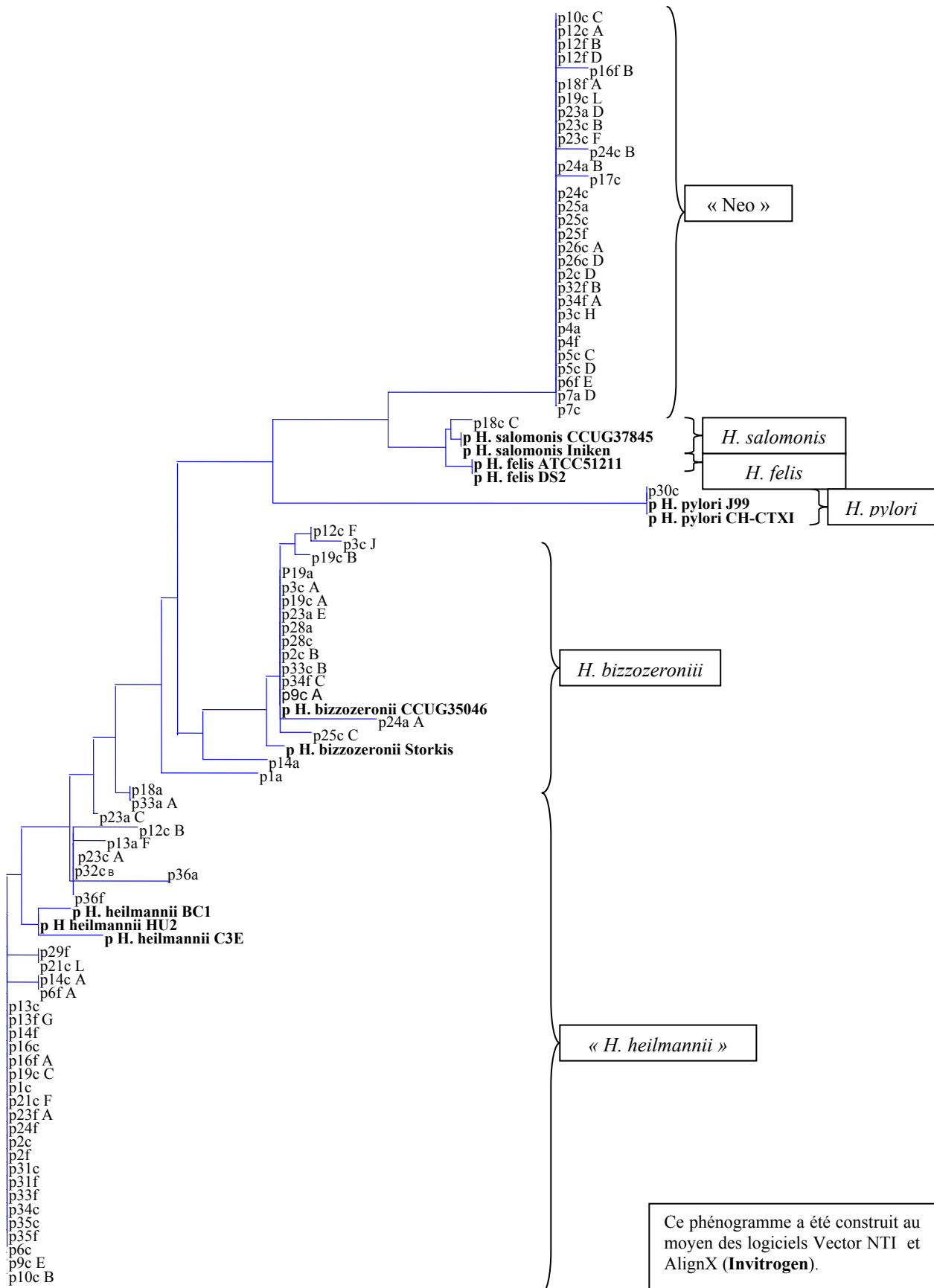
Figure 2: Phénogramme simplifié réalisé à partir de l'alignement des séquences protéiques sur 130 acides aminés

Le principe des noms donnés aux échantillons est le même que pour la figure 1.

p 30c est le nom donné à la séquence d'acides nucléiques provenant de l'échantillon 30c, échantillon pur.

p 18c C provient de 18c, qui est un échantillon multi-infecté. Il a fallu en isoler les différentes souches, ensuite rebaptisées p 18c A, p 18c B, p 18c C...

Phénoqramme réalisé à partir de l'alignement des séquences protéiques



Ce phénoqramme a été construit au moyen des logiciels Vector NTI et AlignX (Invitrogen).

Les branches représentant les différentes espèces se distinguent nettement, ce qui confirme le rôle discriminant du gène uréase pour différencier les diverses espèces d'hélicobactéries gastriques.

Sont distinguées les branches suivantes :

- *H. bizzozeronii*
- « *H. heilmannii* » : de visu, la grande hétérogénéité de ce groupe est nette
- *H. salomonis*
- *H. pylori*
- *H. felis* : aucun échantillon de l'étude ne se trouve sur cette branche
- Néo : cette branche est formée par un groupe singulier et très homogène, éloigné de toute référence modèle. La souche Néo est isolée 28 fois et est présente chez 73.3 % des chiens.

4.5. Fréquence d'isolement des différentes souches

Tableau 6 : fréquence d'isolement des différentes souches isolées

Souche	« <i>H. heilmannii</i> »	Néo	<i>H. bizzozeronii</i>	<i>H. salomonis</i>	<i>H. pylori</i>
Nombre de chiens infectés	26/30	22/30	13/30	1/30	1/30
% de chiens infectés	86.6 %	73.3%	43.3%	0.3%	0.3%

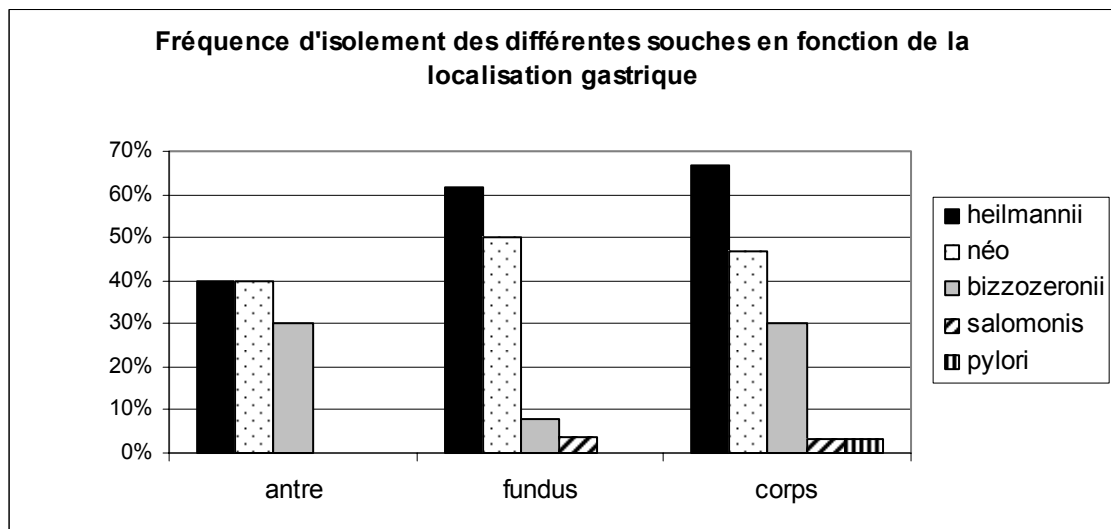
« *H. heilmannii* » est la souche la plus représentée. « *H. heilmannii* », Néo et *H. bizzozeronii* sont les trois souches les plus fréquemment isolées.

4.6. Répartition des souches d'hélicobactéries en fonction de la localisation

Comme cela a été précisé auparavant, certains échantillons sont très faiblement infectés et ne répondent pas à la PCR uréase classique. Donc, sur ces éléments, il est impossible de continuer les manipulations de clonage visant à discriminer les différentes souches d'hélicobactéries amplifiées par la PCR.

Ainsi, de bons résultats ont été obtenus sur 20 échantillons provenant de l'antre, 26 du fundus et 30 du corps.

Graphique 15 : Taux d'isolement des différentes souches selon la provenance de l'échantillon.



Région	Souche				
	« <i>H. heilmannii</i> »	Néo	<i>H. bizzozeronii</i>	<i>H. salomonis</i>	<i>H. pylori</i>
Antre	8 / 20	8/20	6/20	0	0
Fundus	16/26	13/26	2/26	1/26	0
Corps	20/26	14/26	9/26	1/26	1/26

De l'analyse de ce tableau ressort que :

- « *H. heilmannii* » et Néo sont les 2 souches les plus fréquemment isolées dans les 3 localisations.

- *H. bizzozeronii* est très peu isolée à partir des échantillons du fundus.

- *H. salomonis* a été isolée une fois dans le corps (18f C) et une fois dans le fundus (18f B) chez le même animal. L'échantillon provenant de l'antre de ce chien ne contient, lui, qu'une souche « *H. heilmannii* ».

- *H. pylori* a été isolé de la biopsie de la muqueuse gastrique du corps d'un animal. Cet échantillon était mono-infecté. L'analyse des séquences provenant du fundus de ce chien indique la probable co-existence d'une souche *H. bizzozeronii* avec une souche « *H. heilmannii* » et la biopsie de l'antre contenait trop peu de matériel bactérien pour pouvoir effectuer l'analyse par PCR classique et séquençage.

Tableau 7 : Bilan des résultats obtenus par séquençage et digestion enzymatique.

Les résultats obtenus par la digestion enzymatique ne sont rajoutés que lorsqu'ils apportent une information complémentaire au séquençage (signalé par le signe +).

antre	séquence	digestion	corps	séquence	digestion	fundus	séquence	digestion	Bilan
1a	H		1c	H		1f	H		H
2a	B	+ N	2c	H, B, N		2f	H		B, H, N
3a		B, N	3c	B, N	+ H	3f		N	B, H, N
4a	N		4c	B		4f	N		B, N
5a		N	5c	N		5f		B, N	B, N
6a	B		6c	H		6f	H		B, H
7a		N, H	7c	N		7f		N, H	H, N
8a			8c			8f			
9a			9c	B, H		9f		B, H	B, H
10a	H		10c	H, N		10f	H		H, N
11a			11c			11f			
12a		H	12c	B, H, N		12f		H, N	B, H, N
13a		H, B	13c	H		13f		N, H	B, H, N
14a	H		14c	B, H		14f	H		B, H
15a			15c			15f	N		N
16a	H		16c	H		16f		N, H	H, N
17a			17c	N		17f			N
18a	H		18c	S		18f	H, S		H, S
19a	B		19c	B, H, N		19f		B, H, N	B, H, N
20a			20c			20f			
21a			21c	H		21f	H		H
22a			22c			22f			
23a		B	23c	H, N	+ B	23f		N, H	B, H, N
24a	B, N		24c	N	+ B, H	24f	H		B, H, N
25a	N		25c	B, N		25f	N		B, N
26a	N		26c	N, H		26f	N		H, N
27a			27c			27f			
28a	B		28c	B		28f		B, H	B, H
29a			29c	H		29f	H		H
30a			30c	P		30f	B	+ H	H, B, P
31a			31c	H		31f	H		H
32a	B		32c	H	+ B	32f	B		B, H
33a	H		33c	B	+ H	33f	H		B, H
34a	H		34c	H		34f	N, B	+ H	B, H, N
35a			35c	H		35f	H		H
36a	H		36c	H		36f	H		H

H : « *H. heilmannii* »

B : *H. bizzozeronii*

N : Néo

S : *H. salomonis*

P : *H. pylori*

En gris : essai non réalisé (trop peu de matériel génétique à exploiter)

Conclusions

De la muqueuse gastrique du corps d'un chien, une souche d'*H. pylori* génétiquement proche à 98 % d'*H. pylori* de référence a été isolée. La présence d'*H. salomonis* a été objectivée chez un seul animal sur les échantillons provenant du corps et du fundus. *H. felis* n'a été identifiée chez aucun chien et ce qui distingue cette étude d'un certain nombre de publications récentes dans lesquelles *H. felis* est une souche fréquemment isolée chez le chien.

Utiliser des amorces « uréase » spécifiques du genre *Helicobacter*, mais non des différentes espèces d'hélicobactéries déjà répertoriées a permis de mettre en évidence, chez de nombreux chiens, la présence d'une souche dont la séquence ARNr 16S montre qu'il s'agit d'une hélicobactérie, mais dont la séquence uréase n'est similaire qu'à 83 % aux séquences uréase des hélicobactéries découvertes, identifiées et répertoriées.

« *H. heilmannii* » et Néo sont les deux souches les plus fréquemment isolées dans les différents échantillons de la cohorte.

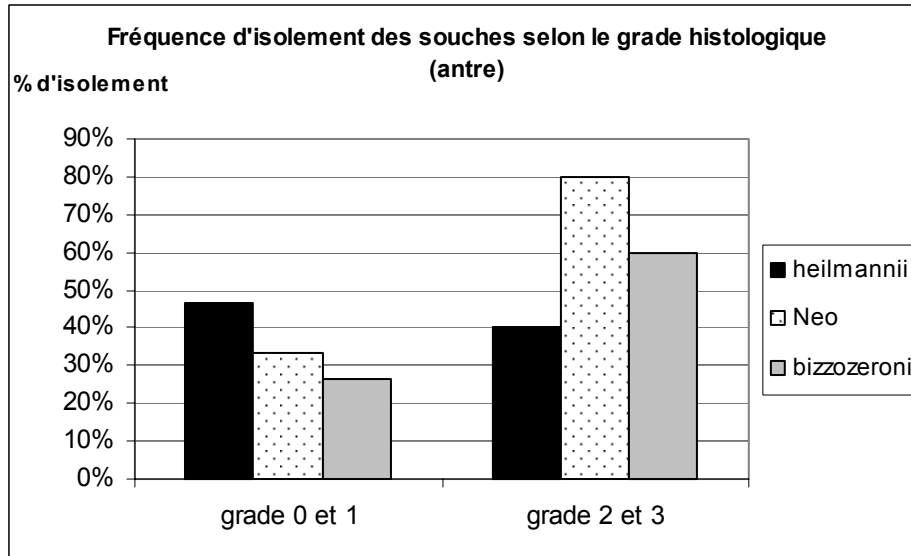
V. Relation entre souches bactériennes et lésions histologiques

Seules les biopsies provenant de l'antrum et du corps ont été analysées en histologie. Les échantillons de grades lésionnels 2 et 3 ont été rassemblés car il y a peu d'échantillons dans ces catégories prises à part. Les échantillons dont l'histologie avait observé le caractère « éosinophile » ont également été rajoutés à ce groupe, en raison de la réponse inflammatoire particulière que cela constitue. Les échantillons dont l'histologie avait noté le caractère « atrophie » sont aussi classés en grade lésionnel 3.

De même, les échantillons de grade 0 et 1 ont été rassemblés, tant leur distinction est délicate.

5.1. Antre

Graphique 16 : fréquence d'isolement des différentes souches d'hélicobactéries selon le grade lésionnel des échantillons de l'antre. Les échantillons de faible grade lésionnel sont comparés à ceux de grade plus sévère



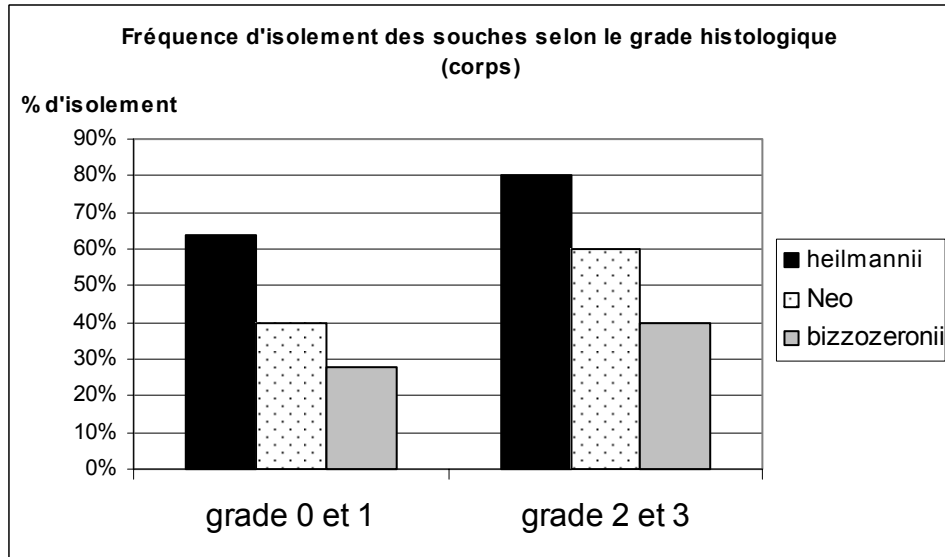
Grade \ Souche	grade 0 et 1	grade 2 et 3
« <i>H. heilmannii</i> »	47%	40%
Neo	33%	80%
<i>H. bizzozeronii</i>	26%	60%
Nombre de chiens concernés (Total =20)	15	5

Entre le groupe d'échantillons de grade lésionnel faible et celui de grade élevé, la prévalence des souches d'hélicobactéries isolées est inversée. En effet, dans les échantillons provenant d'antres peu lésées, « *H. heilmannii* » est la souche la plus fréquemment isolée alors que dans les échantillons d'antres sévèrement atteintes il s'agit de Néo et *H. bizzozeronii*.

Cela constitue une première observation qu'il faut néanmoins prendre avec précaution du fait du faible nombre d'échantillons concernés.

5.2. Corps

Graphique 17 : fréquence d'isolement des différentes souches d'hélicobactéries selon le grade lésionnel des échantillons du corps. Les échantillons de faible grade lésionnel sont comparés à ceux de grade plus sévère.



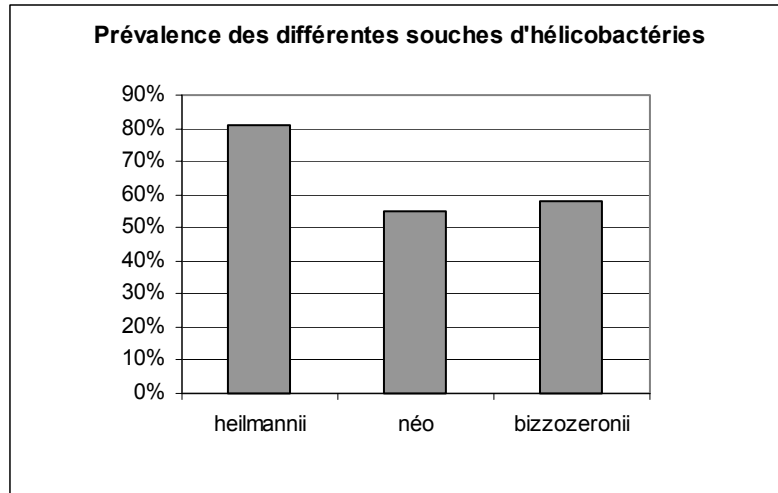
Grade Souche	grade 0 et 1	grade 2 et 3
« <i>H. heilmannii</i> »	60%	75%
Neo	47%	75%
<i>H. bizzozeronii</i>	40%	50%
Nombre de chiens concernés (Total=30)	25	5

Quelque soit le grade lésionnel, « *H. heilmannii* » est la souche la plus fréquemment isolée en comparaison de Néo et *H. bizzozeronii*. Le faible nombre d'échantillons à grade lésionnel élevé ne permet pas d'entrevoir la prévalence d'une souche sur l'autre.

5.3. Prévalence des différentes hélicobactéries

Graphique 18: Prévalence des souches les plus fréquemment rencontrées.

Ces résultats sont la combinaison de ceux obtenus par les méthodes de séquençage et de digestion enzymatique.



souche	« <i>H. heilmannii</i> »	Néo	<i>H. bizzozeronii</i>	<i>H. salomonis</i>	<i>H. pylori</i>
Nombre de chiens concernés	26/31	17/31	18/31	1/31	1/31

« *H. heilmannii* » est présente chez 80% des animaux étudiés, Néo et *H. bizzozeronii* chez environ 60%.

Les co-infections sont extrêmement fréquentes et concernent au moins 75% des animaux. Mais elle ne semble pas être un facteur prédisposant à un état lésionnel particulier.

Les animaux « mono-infectés » sont ceux pour lesquels les PCR ont été difficiles à réaliser. Il est très probable que ces animaux soient en réalité pluri-infectés car il n'est pas exclu que la difficulté de mise en évidence ait empêché l'isolement d'autres souches.

Conclusions

« *H. heilmannii* », très fréquemment isolée quel que soit le grade de lésion histologique, ne semble pas être liée directement au phénomène lésionnel.

Néo et *H. bizzozeronii* sont plus fréquemment isolées chez les animaux présentant des lésions sévères de l'antra mais cette observation ne peut être confirmée pour les échantillons

du corps, faute d'un nombre suffisant d'échantillons. De plus, cette association est également retrouvée dans des échantillons provenant de biopsies de zones que l'histologie classe en grade 0.

Il ne semble pas qu'une souche privilégie une localisation gastrique plutôt qu'une autre.

Enfin, les co-infections se retrouvent chez la grande majorité des chiens sans relation avec un état lésionnel particulier.

VI. Approches particulières

6.1. Espèces et génotypes particuliers

Le séquençage permet d'aligner les différentes séquences obtenues et de les comparer finement entre elles. En se basant sur les calculs de similitudes entre séquences, plusieurs « génotypes » de *H. bizzozeronii*, Néo, et « *H. heilmannii* » se sont distingués

Aucune « branche d'hélicobactéries » ne conduit, sur l'arbre phylogénique, vers un génotype uniquement présent chez des animaux malades ou sains.

6.2. Etude concernant les 6 chiens « sains » de chenil (n°3, 5, 13, 14, 16,18)

Le but est d'observer si, chez ces chiens vivant ensemble en milieu confiné, les génotypes des hélicobactéries isolées sont proches ou pas.

Concernant la quantité d'hélicobactéries retrouvées chez ces chiens, les chiffres montrent que 3 d'entre eux sont très infectés et les 3 autres moyennement infectés, par rapport à la moyenne des chiens.

Ces animaux vivent en chenil et ne présentaient aucun symptôme digestif lors des biopsies. Leur histologie gastrique était systématiquement normale (antre et corps).

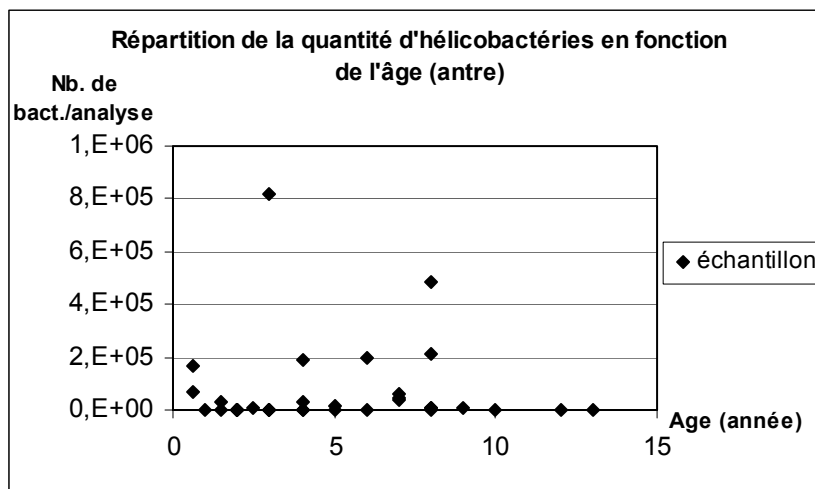
L'étude par digestion enzymatique et séquençage révèle qu'ils sont porteurs de souches d' « *H. heilmannii* », Néo, *H. bizzozeronii* et *H. salomonis*.

Il existe certaines souches où l'on peut suspecter une transmission d'animal à animal au sein du chenil. Il s'agit de souches très proches sur le phénogramme.

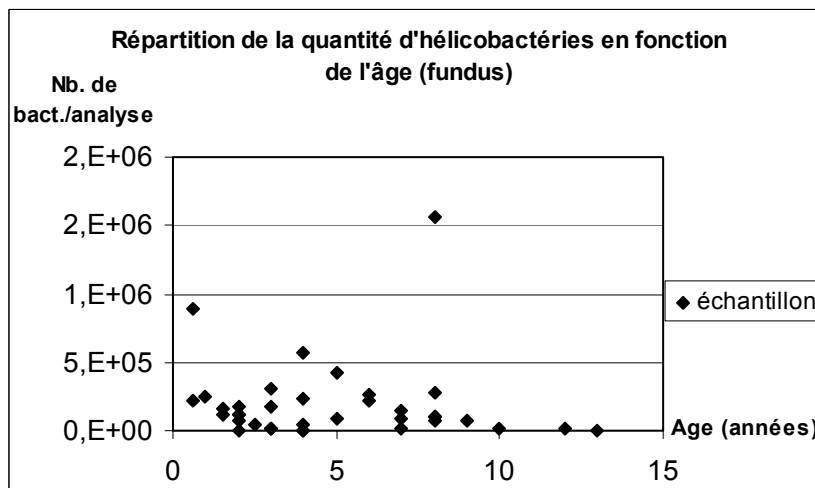
H. salomonis est retrouvée uniquement sur 1 chien. Un doute concerne le chien 13 chez qui une co-infection cacherait probablement une souche de *H. salomonis* également. Malheureusement, les essais de culture pour le clonage concernant ce chien ont été infructueux.

6.3. Approche de la quantité de bactéries présentes en fonction de l'âge des chiens

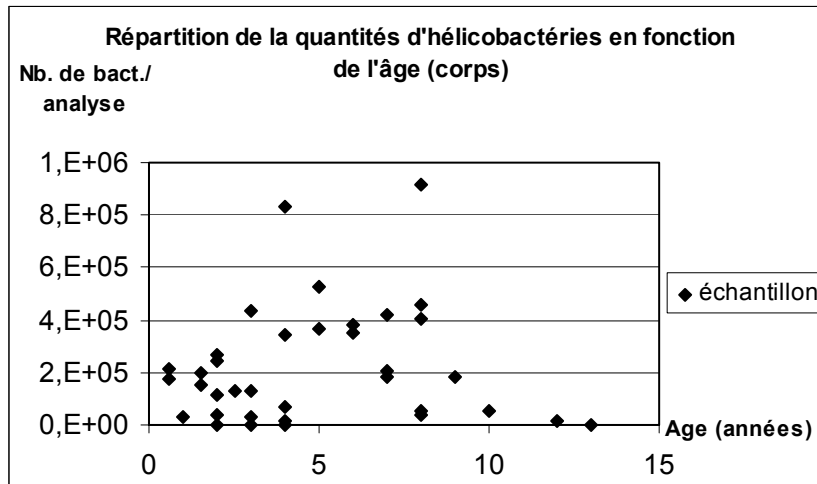
Graphique 19 : Echantillons provenant de l'antre



Graphique 20 : Echantillons provenant du fundus



Graphique 21 : Echantillons provenant du corps



Les graphiques 19, 20 et 21 ne montrent aucune relation particulière entre la quantité d'hélicobactéries mesurée et l'âge de l'animal.

Conclusions

La diversité des hélicobactéries gastriques a été révélée par l'étude des séquences du gène uréase. Chaque souche possède une certaine diversité de génotypes, en particulier « *H. heilmannii* ». L'analyse des protéines codées par ces séquences d'ADN indique que la plupart des mutations sont silencieuses.

Il est impossible d'identifier un génotype particulier au sein des souches étudiées qui soit constamment associé à un état lésionnel de la muqueuse gastrique.

Une contamination au sein du groupe de chiens vivant en chenil reste toujours possible, bien qu'elle n'ait pas réellement été mise en évidence.

Enfin, la quantité d'hélicobactéries gastriques présentes chez les chiens ne semble pas liée à l'âge.

Discussion et perspectives

Les outils fournis par la biologie moléculaire se révèlent indispensables à l'étude des hélicobactéries. L'utilisation de la PCR en temps réel offre un avantage sur la PCR classique, en particulier en ce qui concerne les valeurs seuils de détection. Le séquençage de brins d'ADN issus de l'amplification du gène uréase B permet une identification très précise des différentes souches, ce qui est impossible avec l'ARNr 16S.

La quantification par PCR en temps réel permet d'observer non seulement que la densité bactérienne est globalement très élevée chez les chiens mais aussi que cette densité varie d'une région gastrique à l'autre. Ainsi la quantité de bactéries est significativement plus élevée dans le corps que dans le fundus et l'antrum.

De plus, il a été mis en évidence que la densité bactérienne établie par PCR n'est pas corrélée au grading de densité bactérienne établie par l'histologie. Cela peut s'expliquer par le fait que nous avons choisi de réaliser la PCR sur un extrait réalisé à partir de trois biopsies gastriques alors que l'analyse histologique a été réalisée sur des biopsies (2 à 3) étudiées individuellement et seulement sur quelques coupes de 3 µm d'épaisseur. Avec cette dernière approche, la surface et le volume de tissu étudiés sont réduits et faiblement représentatifs de l'ensemble du prélèvement alors que l'approche PCR choisie et qui concerne trois fragments tissulaires complets est globale et donc plus représentative. En outre, par l'approche PCR, c'est l'ensemble biopsie et mucus qui est analysé alors que dans l'approche histologique le mucus est majoritairement dissout par le formol et ainsi perdu lors de la fixation. L'approche quantitative par PCR est probablement plus proche de la réalité que l'approche semi quantitative par histologie.

Aucune relation entre la densité bactérienne et les lésions inflammatoires du tissu gastrique n'a été mise en évidence dans notre étude. Cette observation est en accord avec la majorité des études récentes [10, 16, 37, 38, 47]. Qu'il s'agisse de l'antrum ou du corps de l'estomac, certains chiens présentent des lésions gastriques sévères associées à une densité bactérienne plutôt faible, alors que pour d'autres chiens c'est la situation opposée qui est observée.

La différenciation des très nombreuses souches, grâce à la digestion enzymatique et au séquençage des brins d'ADN bactérien produits par PCR et clonage, a permis de distinguer 5 espèces d'hélicobactéries. Trois sont retrouvées chez la majorité des chiens : « *H. heilmannii* » (86.6%), *H. bizzozeronii* (43.3%) ainsi qu'une espèce encore non décrite (73.3%). Dans cette étude, au moins 75 % des chiens sont infectés simultanément par plusieurs souches différentes.

H. felis n'a été isolée chez aucun chien, ce qui diffère de la plupart des études mais il est possible que les amorces PCR uréase B spécifique à *H. felis* utilisées par certains auteurs [3, 17] aient également amplifié l'espèce encore non décrite et qui est très présente dans notre étude car ces amorces s'hybrident en partie avec les nouvelles séquences ADN isolées.

H. salomonis a été observée chez un seul chien, qui était sain et *H. pylori* a été isolée de la muqueuse du corps gastrique d'un chien asymptomatique.

Les résultats de notre étude ne plaident pas en faveur de l'implication d'une des souches d'*Helicobacter* rencontrées dans l'inflammation gastrique. Cette observation permet de conclure qu'il est très improbable que l'infection par des bactéries du genre *Helicobacter* joue un rôle dans la pathogénie des gastrites chroniques chez le chien. Cependant, certaines analyses plus fines seraient sans doute nécessaires pour écarter définitivement l'hypothèse *Helicobacter* dans cette pathologie. En effet, il serait probablement judicieux de rechercher l'implication de certains facteurs de virulences exprimés par les hélicobactéries, à l'instar de ce qui est étudié actuellement chez *H. pylori*. De plus, une analyse de la répartition topographique des hélicobactéries dans la profondeur du tissu gastrique ou même à l'intérieur des cellules serait nécessaire pour conforter ou infirmer la conclusion de nos observations. Il est logique de penser que la réaction du tissu gastrique pourrait être différente selon la localisation des bactéries. Ce type d'étude est très lourd à réaliser car il nécessite une standardisation histologique (orientation des biopsies, lecture sur des zones équivalentes...) pratiquement inaccessible.

Une des limites de notre étude repose également sur la taille réduite de l'échantillon analysé. Malgré cet écueil, les résultats sont peu équivoques et la lourdeur de l'approche expérimentale mise en œuvre rend une étude à plus grande échelle difficile à envisager.

En médecine humaine, l'éradication d'*H. pylori* est recommandée pour les patients qui présentent un ulcère gastro-duodéal ou un cancer de l'estomac. Aucun traitement n'est conseillé pour les porteurs asymptomatiques *.

Les vétérinaires sont face à un dilemme : traiter ou ignorer les bactéries spiralées observées sur les biopsies de patients atteints de gastrite chronique. Le traitement Amoxicilline-Métronidazole-Famotidine est efficace chez la majorité des chiens présentant une hélicobactériose, bien qu'il ne permette pas l'éradication totale des bactéries et surtout que la réinfestation soit fréquente [16].

Aussi, le bien-fondé du recours à une thérapie anti-microbienne chez les animaux de compagnie qui présentent une hélicobactériose et des signes cliniques associés demeure-t-il discuté. Toutefois, un consensus se dégage pour choisir de traiter en cas d'infection sévère associée à une gastrite marquée ou lors de gastrite folliculaire.

Chez l'homme, l'infection se produit dans l'enfance, mais la maladie ne se développe que bien plus tard. On peut alors s'interroger quant à la durée de l'infection chez le chien, et se demander si elle pourrait être assez longue pour réellement entraîner une pathologie associée.

Enfin, la découverte, chez le chien, d'une souche très proche de *H. pylori* de référence impose de reconsidérer et réévaluer le risque de zoonose que représente cette bactérie. Il en est de même concernant « *H. heilmannii* », *H. bizzozeronii* et la nouvelle souche décrite, tant la prévalence chez les chiens est élevée et les quantités mesurées importantes.

* The National Institute of Health and the European *H. pylori* study group

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
M. COILLARD Jérémie
a été admis(e) sur concours en : 1998
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 11/07/05
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, O. DOSSIN, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :

M. COILLARD Jérémie

intitulée :

«*Quantification par PCR en temps réel et identification génétique des souches d'hélicobactéries gastriques dans un groupe de chiens atteints de troubles digestifs.* »


**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Olivier DOSSIN**

**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**

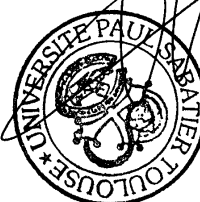
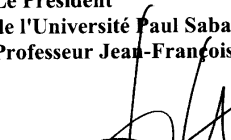


**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Jean-Pierre VINEL**

**Vu le : 08 DEC. 2005
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



**Professeur Jean-Pierre VINEL
Service de Médecine Clinique
CHU TOULOUSE-PURPAN
31059 TOULOUSE CEDEX**



Lexique

Blast

Comparaison de la séquence nucléotidique obtenue par séquençage d'un fragment d'ADN, d'ARN ou de protéine avec la base de donnée disponible en ligne sur internet.

Le logiciel BLAST 10.2.2. se charge de chercher, avec le plus de vraisemblance, plusieurs séquences correspondantes préalablement déposées dans la GenBank database, base de données internationale, et calcule la similarité entre le brin étudié et les brins déposés.

Adresse URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

Bootstrap

C'est la méthode la plus souvent utilisée pour tester la fiabilité des branches internes d'un arbre phylogénique. Le bootstrap consiste à effectuer un tirage des sites au hasard avec remise. Dans chaque répllication de bootstrap certains sites peuvent être présents plusieurs fois, tandis que d'autres peuvent être absents. Chaque répllication produit un nouvel alignement "artificiel" qui est utilisé pour construire un arbre "artificiel". Pour chaque branche interne on calcule le pourcentage des arbres "artificiels" contenant cette branche. On considère généralement que les branches définies par une valeur de bootstrap supérieure à 95% sont fiables. Il faut 1000 répllications de bootstrap pour que cette méthode soit statistiquement valable.

Ct (Cycle threshold)

Il correspond au nombre de cycles de PCR nécessaires pour atteindre le seuil de positivité de fluorescence, ce qui équivaut à une quantité de produits synthétisés.

Pendant la phase exponentielle de la PCR, la quantité de produits formés est proportionnelle à la quantité d'ADN de départ. Ainsi plus le Ct est bas, plus la quantité d'ADN initialement présente dans l'échantillon est importante.

En comparant deux quantités l'une par rapport à l'autre à l'aide de leur Ct, on procède à une quantification relative.

Pour réaliser une quantification absolue, il est nécessaire d'amplifier en parallèle une gamme de solution titrée d'ADN de séquence identique à celle de la cible, de façon à obtenir une droite étalon.

Dendrogramme

Schéma exprimant les liens entre des éléments sous la forme d'une succession de branchements. Les cladogrammes, phénogrammes et phylogrammes sont des dendrogrammes de type particulier, construits selon des règles qui sont propres à chacun d'eux.

Inhibiteurs de PCR

Ce terme désigne l'ensemble des molécules que l'étape de purification des acides nucléiques n'arrive pas à éliminer et qui peuvent gêner le bon déroulement de la réaction de PCR.

Ex. acides polysaccharidiques, divers produits du métabolisme...

Pour contourner ce problème, il suffit de suffisamment diluer l'échantillon. De ce fait, les inhibiteurs sont également dilués, et la réaction de polymérisation s'effectue normalement. Lorsque l'on utilise la PCR en temps réel, il est possible d'estimer mathématiquement la quantité de cible dans l'échantillon initial par la connaissance de la quantité de cible dans l'échantillon dilué et la valeur de la dilution appliquée.

PCR en temps réel

La réaction d'amplification de la séquence ADN cible suit les mêmes étapes qu'en PCR classique c'est-à-dire dénaturation, hybridation, extension. A la différence d'une PCR classique, la PCR en temps réel utilise une sonde fluorescente qui permet la quantification et la caractérisation de l'amplicon formé en temps réel.

Cette technique permet de faire de la quantification relative de cibles dans des échantillons donnés par rapport à une cible de référence. Elle permet aussi de faire de la quantification absolue (détermination en nombre de copies) par rapport à un standard externe.

Phénogramme

C'est un arbre où les différents éléments sont identifiés et rangés sur la base de la similitude globale. La signification évolutive des caractères n'est pas utilisée.

Les différences entre tous les caractères de deux éléments sont mesurées globalement à l'aide d'une variable continue (similitude globale) qui est une distance entre les éléments. On inscrit dans une matrice chaque distance pour chaque couple d'éléments, une classification est construite à partir de ces données.

Annexe 1

Souches références utilisées dans notre étude

« *Helicobacter heilmannii* » :

Il n'y pas de souche référence déposée à ce jour. Nous conviendrons, que malgré l'apparente diversité de bactéries désignées par ce même nom, « *Helicobacter heilmannii* » demeure une entité dont les paramètres génétiques décrits dans les études et enregistrés dans la GenBank Database satisferont à notre étude.

Nous avons utilisé les séquences des souches HU1 (n° accession AF508010), HU2 (n° accession AF508212), BC1 (n° accession AF507996), C3E (n° accession AF507999), RM1 (n° accession AF508015), MM2 (n° accession AF508009) et WD1 (n° accession AF508011).

Helicobacter bizzozeronii

Souche type: souche Hänninen 1 = Storkis = CCUG 35545 = CIP 105233. (n° accession AF508003 et AJ130881)

Référence: HÄNNINEN (M.L.), HAPPONEN (I.), SAARI (S.) and JALAVA (K.): Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1996, **46**, 160-166.

Nous avons également utilisé les séquences des souches CCUG 35046 (n° accession AJ130883), strain 14 (n° accession AF508002) et celle déposée n° accession AF330631.

Helicobacter felis

Souche type: souche CS1 = ATCC 49179 = CIP 104084 = CIP 104382 = NCTC 12436. (n° accession AF508004)

Référence: PASTER (B.J.), LEE (A.), FOX (J.G.), DEWHIRST (F.E.), TORDOFF (L.A.), FRASER (G.J.), O'ROURKE (J.L.), TAYLOR (N.S.) and FERRERO (R.): Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1991, **41**, 31-38.

Nous avons également utilisé les séquences des souches DS2 (n° accession AY368260), CS2 (n° accession AF508002), ATCC 51211 (n° accession AF116580), Strain

INTO (n° accession AY368267), DS5 (n° accession AY368261) et celle déposée au n° accession X69080.

Helicobacter salomonis

Souche type: souche Inkinen = CCUG 37845 = CIP 105607.

(n° accession AF508005 et AJ130880)

Référence: JALAVA (K.), KAARTINEN (M.), UTRIAINEN (M.), HAPPONEN (I.) and HÄNNINEN (M.L.): *Helicobacter salomonis* sp. nov., a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, **47**, 975-982.

Nous avons également utilisé les séquences des souches CCUG 37848 (n° accession AJ130882) et strain 06 (n° accession AY368266).

Helicobacter pylori

Souche type: souche Royal Perth Hospital 13487 = ATCC 43504 = CCUG 15815 B = CCUG 17874 = CCUG 39500 = CIP 103995 = DSM 4867 = LMG 18041 = LMG 19449 = NCTC 11637.

Référence: GOODWIN (C.S.), ARMSTRONG (J.A.), CHILVERS (T.), PETERS (M.), COLLINS (M.D.), SLY (L.), McCONNELL (W.) and HARPER (W.E.S.): Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1989, **39**, 397-405.

Nous avons également utilisé les séquences des souches J99 (n° accession AE001439), CH-CTXI (n° accession AF479027), strain 26695 (n° accession AF507994), et celle déposée au n° accession M60398.

Annexe 2

Caractéristiques cliniques des chiens participants à l'étude

Animal	Vomissements	Diarrhée	Amaigrissement	Douleurs abdominales
1	-	+	+	-
2	-	+	-	-
3	-	-	-	-
4	+	-	-	+
5	-	-	-	-
6	-	+	-	-
7	+	-	-	+
8	-	+	+	+
9	+	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	+	+	-	-
16	-	-	-	-
17				
18	-	-	-	-
19	+	+	-	+
20	+	-	-	+
21	+	+	-	-
22	-	-	-	-
23	+	+	+	-
24	-	+	-	-
25	-	+	-	+
26	+	+	-	-
27	-	+	-	-
28	-	+	-	-
29	+	+	+	-
30	-	+	-	+
31	-	+	+	+
32	+	-	-	-
33	-	+	-	-
34	-	+	-	+
35	-	+	+	-
36	+	-	+	-

Annexe 3

Quantification, caractères histologiques et séquences identifiées

Ech.	Antre			Corps			Fundus	
	PCR en temps réel	Grade histologique	Séquence identifiée	PCR en temps réel	Grade histologique	Séquence identifiée	PCR en temps réel	Séquence identifiée
1	166157	1	H	216313	0	H	218170	H
2	4031	0	B	126006	0	H, B, N	50946	H
3	48409			203241	0	B, N	89163	
4	1856	1	N	154956	1	B	121757	N
5	546	0		51872	0	N	13600	
6	9313	0	B	186450	0	H	77806	H
7	29095	3 (éosino)		346319	3 (éosino)	N	239758	
8	147	2		72339	2		43562	
9	452	2		112664	3 (atrophie)	B, H	168000	
10	985	1	H	354061	1	H, N	225406	H
11	4,8	1		20	0		1,39	
12	123	3 (atrophie)		270544	3 (atrophie)	B, H, N	119752	
13	7065	0		917331		H	272363	
14	4158	0	H	40827	0	B, H	108605	H
15	2888	3 (atrophie)		29284	3 (atrophie)		171208	N
16	199045	0	H	378451	0	H	255906	
17	0,48	2		596	0	N	14388	
18	189437	0	H	833091	0	S	564714	
19	34201	1	B	420557	0	B, H, N	153097	
20	9	3 (éosino)		367	3 (éosino)		223	
21	404	3 (atrophie)		127780	0	H	19539	H
22	0,29	1		0	0		193	
23	549	3 (éosino)		530126	3 (éosino)	H, N	92204	
24	484859	2	B, N	404369	0	N	95769	H
25	15995	0	N	368939	0	B, N	420252	N
26	819856	1	N	437401	1	N, H	309002	N
27	19			16882	1		1,18	
28	26570	1	B	200098	0	B	165998	
29	36	1 (éosino)		27819	1	H	246009	H
30	86	1		12955	1	P	8424	B
31	80	3 (éosino)		38048	0	H	69652	H
32	150	3	B	245639	1	H	110981	B
33	64539	0	H	177082	1	B	893490	H
34	64085	2	H	185630	1	H	15963	N, B
35	38	1		49690	0	H	67330	H
36	212466		H	459832	1	H	1556262	H

(PCR en temps réel : quantification en nombre de bactéries par analyse)

Histologie :

1 : grade léger
 2 : grade modéré
 3 : grade sévère
 éosino : gastrite éosinophilique
 atrophie : gastrite atrophique

Séquences :

H : « *H. heilmannii* »
 B : *H. bizzozeronii*
 N : Neo
 P : *H. pylori*
 S : *H. salomonis*

Bilan des souches identifiées à l'aide du séquençage et de la technique RFLP

Animal	Souches identifiées par séquençage	Souches identifiées par RFLP	Bilan
1	H		H
2	H, B, N		H, B, N
3	B, N		B, N
4	B, N		B, N
5	N	B	B, N
6	B, H		B, H
7	N	H	H, N
8			
9	B, H		B, H
10	H, N		H, N
11			
12	B, H, N		B, H, N
13	H	B, N	B, H, N
14	B, H		B, H
15	N		N
16	H	H	H, N
17	N		N
18	H, S	N	H, N, S
19	B, H, N		B, H, N
20			
21	H		H
22			
23	H, N	B	B, H, N
24	B, H, N		B, H, N
25	B, N		B, N
26	H, N		H, N
27			
28	B	H	B, H
29	H		H
30	B, P	H	B, H, P
31	H		H
32	B, H		B, H
33	B, H		B, H
34	B, H, N		B, H, N
35	H		H
36	H		H

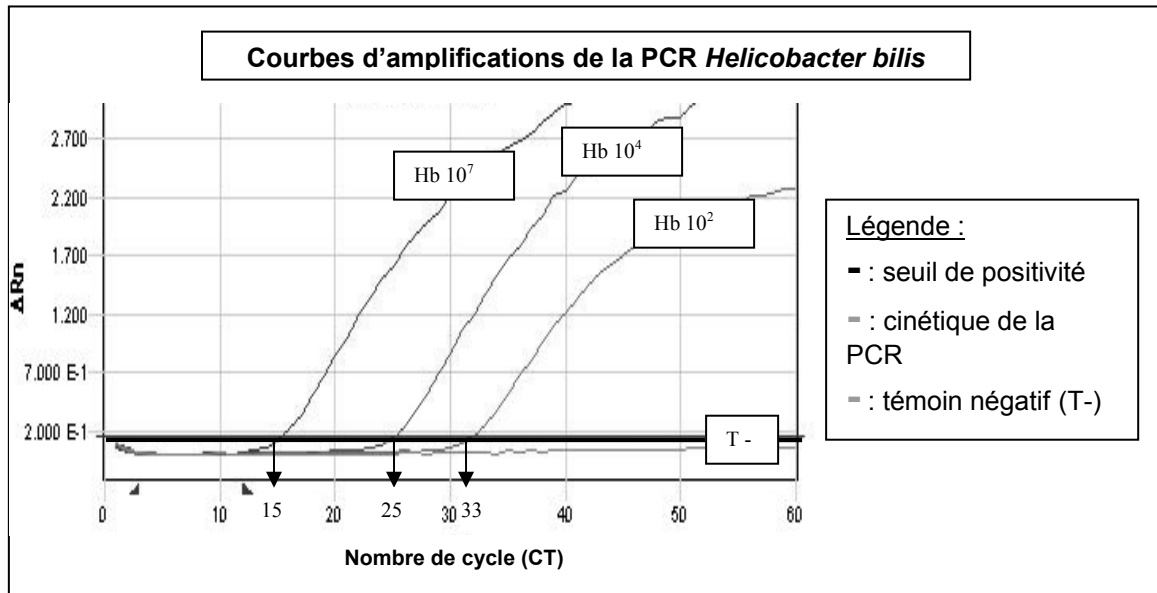
Concernant la technique RFLP :

Seules les souches que le séquençage des clones n'a pas permis d'isoler mais qui ont été tout de même identifiées par la méthode de digestion enzymatique ont été rapportées dans ce tableau.

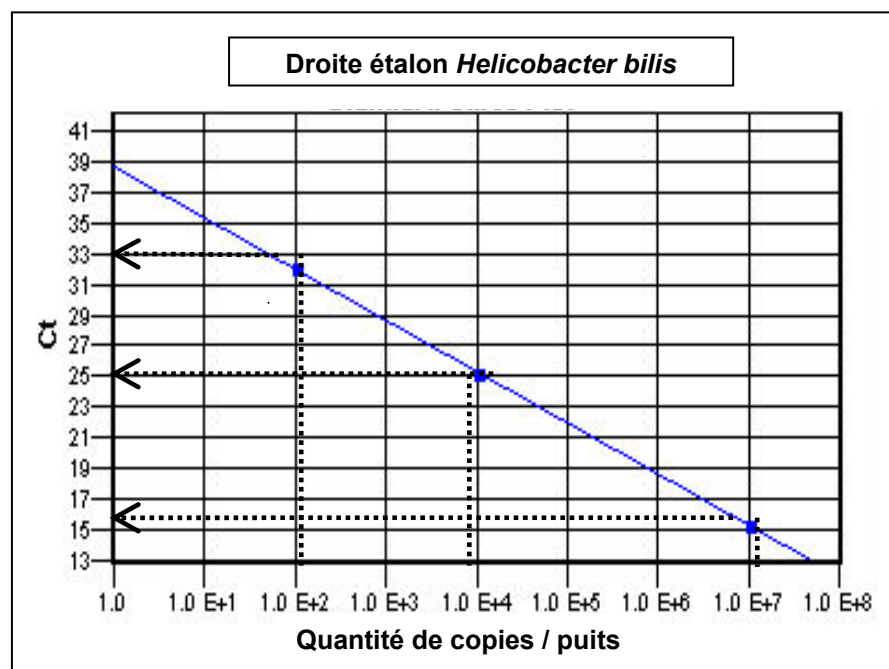
Annexe4

Principe simplifié de la quantification par PCR en temps réel

1^{ère} étape : Etablissement de la droite étalon à partir de 3 échantillons issus d'une gamme de dilution.

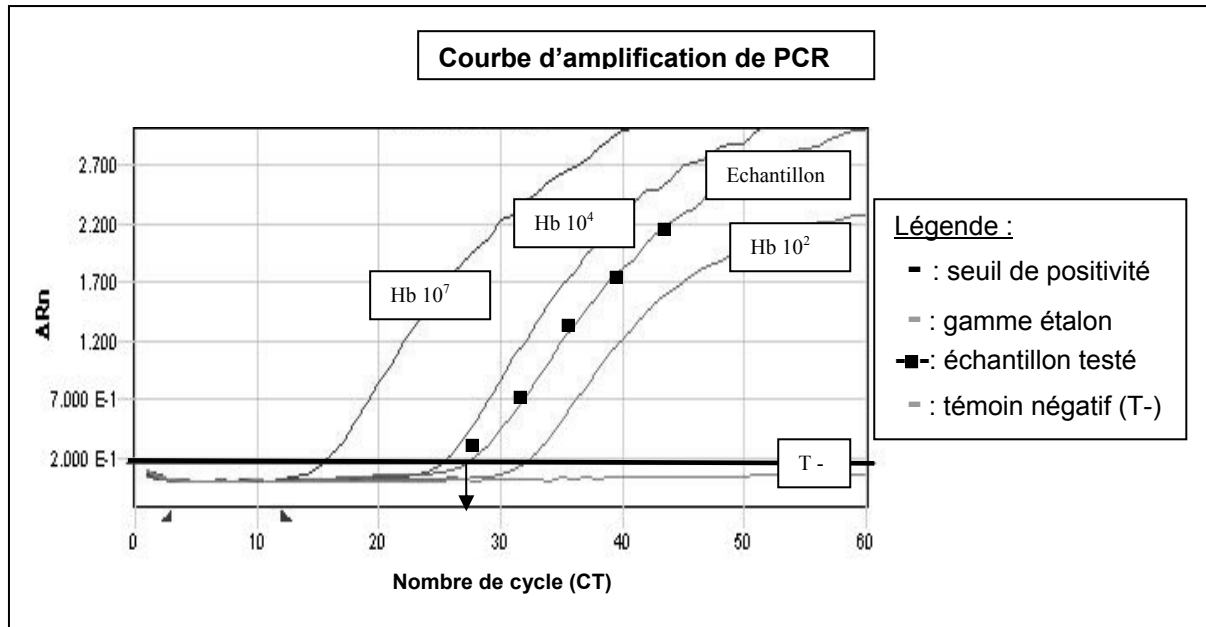


A chaque échantillon correspond une valeur donnée de CT, correspondant au nombre de cycle de PCR nécessaire pour que la quantité d'ADN produite dépasse le seuil de positivité, et qui permet de tracer la droite suivante :

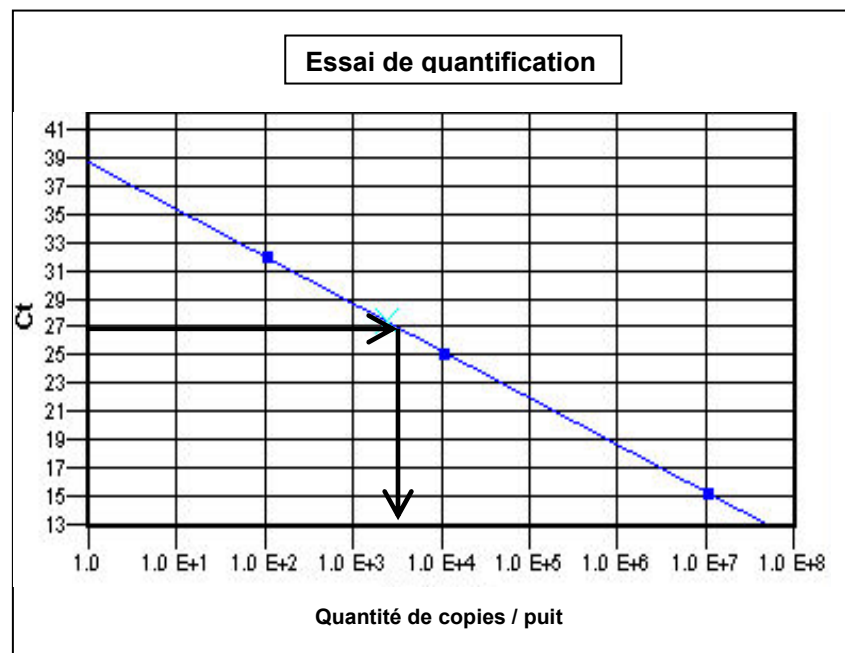


L'échantillon contenant 10^7 copies devient positif à 15 cycles de PCR, celui à 10^4 copies à 25 cycles de PCR et enfin celui à 10^2 copies à 32 cycles.

2nde étape : test d'un échantillon



L'échantillon testé devient positif à 27 cycles de PCR. Ce qui correspond à une quantité de 20.000 hélicobactéries présentes dans le puit.



Index bibliographique

1. ANDERSEN, L.P., BOYE, K., BLOM, J., et al.
Characterization of a culturable "*Gastrospirillum hominis*" (*Helicobacter heilmannii*) strain isolated from human gastric mucosa.
J. Clin. Microbiol., 1999, **37**, 1069-76.
2. AKIN, O.Y., TSOU, V.M., WERNER, A.L.
Gastrospirillum hominis associated chronic active gastritis.
Pediatr. Pathol. Lab. Med., 1995, **15**, 429-435.
3. BAELE, M., VAN DEN BULCK, K., DECOSTERE, A., et al.
Multiplex PCR assay for differentiation of *Helicobacter felis*, *H. bizzozeronii* and *H. salomonis*.
J. Clin. Microbiol., 2004, **42**, 3, 1115-1122.
4. BUCZOLITS, S., HIRT, R., ROSENGARTEN, R., et al.
PCR-based genetic evidence for occurrence of *Helicobacter pylori* and novel *Helicobacter* species in the canine gastric mucosa.
Vet. Microbiol., 2003, **95**, 259-270.
5. CATTOLI, G., VAN VUGT, R., ZANONI, R.G., et al.
Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter spp.* in naturally infected dogs.
Vet. Microbiol., 1999, **70**, 239-250.
6. DEBONGNIE, J.C., DONNAY, M., MAIRESSE, et al.
Gastric ulcers and "*Helicobacter heilmannii*".
Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 1998, **10**, 251-254.
7. DEWHIRST, F.E., FOX, J.G., MENDES, E.N., et al.
"*Flexispira rappini*" strains represent at least 10 *Helicobacter* taxa.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2000, **5**, 1781-1787.
8. DO-REGO SEYAWI, C., ROSSERO, A., LE GAL, A., et al.
«*Helicobacter heilmannii*», pathogène humain et animal : revue.
Rev. Med.Vet., 2001, **152**, 8-9, 623-632.
9. DUMAS, M.
Utilisation de la PCR pour le diagnostic de l'hélicobactériose chez les chiens atteints de troubles digestifs chroniques.
Th.: Med. vet.: Toulouse: 2001-TOU 3, 4045.
10. EATON, K.A., DEWHIRST, F.E., PASTER, B.J., 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.
11. EUZEBY, J.P., (Site consulté le 30 Juillet 2005)
Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, [en ligne].
Adresse URL : <http://www.bacdico.net>

12. FLATLAND, B.
Helicobacter Infection in humans and Animals.
Compendium, 2002, **24**, 9, 688-698.
Adresse URL : <http://www.VetLearn.com>
13. HÄNNINEN, M.L., HAPPONEN, I., SAARI, S., et al.
Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1996, **46**, 160-166.
14. HAPPONEN, I., SAARI, S., CASTREN, L., et al.
Comparison of diagnostic methods for detecting gastric *Helicobacter*-like organisms in dogs and cats.
J. Comp. Path., 1996, **115**, 117-127.
15. 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.
16. HAPPONEN, I., LINDEN J., WESTERMARK, E. et al.
Effect of triple therapy on eradication of canine gastric helicobacters and gastric disease.
J. Small Anim. Pract., 2000, **41**, 1, 1-6.
17. HWANG, C., HAN, H., YOUN, H.
Prevalence and clinical characterisation of gastric *Helicobacter* species infection of dogs and cats in Korea.
J. Vet. Science, 2002, **3**, 2, 123-133.
18. JALAVA, K., KAARTINEN, M., UTRIAINEN, M., et al.
Helicobacter salomonis sp. Nov., a canine *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii*.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1997, **47**, 975-982.
19. JALAVA, K., ON, S.L.W., VAN DAMME, P.A.R., et al.
Isolation and identification of *Helicobacter spp.* from canine and feline gastric mucosa.
Appl. Environ. Microbiol., 1998, **64**, 3998-4006.
20. JALAVA, K., ON, S.L., HARRINGTON, C.S., ANDERSEN, L.P., et al.
A cultured strain of "*Helicobacter heilmannii*", a human gastric pathogen, identified as *H. bizzozeronii*: evidence for zoonotic potential of helicobacter.
Emerg. Infect. Dis., 2001, **7**, 6, 1036-1038.
21. LECOINDRE, P., CHEVALLIER, M., PEYROL, S., et al.
Contribution à l'étude des hélicobactéries de l'estomac du chien et de leur pouvoir pathogène.
Rev. Med. Vet., 1995, **146**, 10, 671-680.
22. LECOINDRE, P., CHEVALLIER, M., PEYROL, et al.
Les hélicobactéries gastriques des carnivores domestiques.
PMCAC, 1998, **33**, 403-413.

23. LEE, A., HAZELL, S.L., O'ROURKE, J., et al.
Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach.
Infect Immun., 1988, **56**, 2843-2850.
24. LEE, A., KRAKOWKA, S., FOX, J.G., et al.
Role of *Helicobacter felis* in chronic canine gastritis.
Vet. Pathol., 1992, **29**, 6, 487-494.
25. LEUTENEGGER, C. M.
The Real-Time TaqMan PCR and Application in Veterinary Medicine.
Veterinary Sciences Tomorrow, 2001, Issue 1.
26. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION,
Site de la NCBI, [en ligne] (Site consulté le 30 Juillet 2005).
Adresse URL : <http://www.pubmed.com>
27. MIKKONEN, T., KARENLAMPI, R., HANNINEN, M-L.
Phylogenetic analysis of gastric and enteropathic *Helicobacter* species based on partial HSP 60 gene sequences.
Inter. J. System. Evol. Microbiol., 2004, **54**, 753-758.
28. O'ROURKE, J., LEE, A.
Animals models of *Helicobacter pylori* infection and disease.
Microb. Infect., 2003, **5**, 741-748.
29. O'ROURKE, J.L., SOLNICK, J.V., NEILAN, B.A., et al.
Description of '*Candidatus Helicobacter heilmannii*' based on DNA sequence analysis of 16S rRNA and urease genes.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2004, **54**, 2203-2211.
30. PASTER, B.J., LEE, A., FOX, J.G., et al.
Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae*, and related bacteria.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1991, **41**, 31-38.
31. 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.
32. PRICE AB.
The Sydney system: Histological division.
J. Gastroenterol. Hepat., 1991, **6**, 209-222.
33. PRIESTNALL, S.L., WIINBERG, B., SPOHR, A., et al.
Evaluation of "*Helicobacter heilmannii*" subtypes in the gastric mucosae of cats and dogs.
J. Clin. Microbiol., 2004, **42**, 5, 2144-2151.
34. RADIN, M.J., EATON, K.A., KRAKOWKA, S, et al.
Helicobacter pylori gastric infection in gnotobiotic beagle dog.
Infect. Immun., 1990, **58**, 8, 2606-2612.

35. ROSSI, G., ROSSI, M., VITALI, C.G., et al.
A conventionnal Beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*.
Infect. Immun., 1999, **67**, 6, 3112-3120.
36. ROSSI, G., RUGGIERO, P., PEPPOLONI, S. et al.
Therapeutic vaccination against *Helicobacter pylori* in the beagle dog experimental model : safety, immunogenicity and efficacy.
Infect. Immun., 2004, **72**, 6, 3252-3259.
37. SEO, W.J., PARK, C.S., CHO, Y.J. et al.
A case of gastric ulcer induced by *Helicobacter heilmannii*-like organism.
Korean J. Gastroenterol. 2003, **42**, 1, 63-66.
38. SIMPSON, K. W., MCDONOUGH, P. L., STRAUSS-AYALI, D., et al.
Helicobacter felis infection in dogs: effect on gastric structure and function.
Vet. Pathol., 1999, **36**, 237-248.
39. 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.
40. SOLNICK, J.V., O'ROURKE, J., LEE, A. et al.
An uncultured gastric spiral organism is a newly identified *Helicobacter* in humans.
J. Infect. Dis., 1993, **168**, 379-385.
41. STOFFEL, M.H., FRIESS, A.E., BURNENS, A., et al.
Distinction of gastric *Helicobacter spp.* in humans and domestic pets by scanning electron microscopy.
Helicobacter. 2000, **5**, 232-239.
42. STOLTE, M., WELLENS, E., BETHKE, B. et al.
“*Helicobacter heilmannii*” (formerly *Gastrospirillum hominis*) gastritis: an infection transmitted by animals?
Scand. J. Gastroenterol., 1994, **29**, 12, 1061-1064.
43. STRAUSS-AYALI, D., SIMPSON, K.
Gastric *Helicobacter* infection in dogs.
Small Animal Practice, 1999, **29**, 2, 397-413.
44. TREBESIUS, K., ADLER, K., VIETH, M., et al.
Specific detection and prevalence of *Helicobacter heilmannii*-like organisms in the human gastric mucosa by fluorescent in situ hybridization and partial 16S ribosomal DNA sequencing.
J. Clin. Microbiol., 2001, **39**, 4, 1510-1516.
45. VAJNER, L., VORTEL, V., SYKOROVA, B., et al.
Helicobacter gastritis in Beagle dogs: Review of 33 cases in a breeding colony.
Eur. J. Vet. Pathol., 2000, **6**, 2, 49-55.

46. VAN DEN BULCK, K., DECOSTERE, A., BAELE, M., et al.
Identification of Non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs and cats.
J. Clin. Microbiol., 2005, **43**, 5, 2256-2260.
47. WIINBERG, B., SPOHR, A., DIETZ, H., et al.
Quantitative analysis of inflammatory and immune responses in dogs with gastritis and their relationship to *Helicobacter spp.* infection.
J. Vet. Intern. Med., 2005, **19**, 4-14.
48. YAMASAKI, K., SUEMATSU, H., TAKAHASHI, T.
Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spirals organisms.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 1998, **212**, 4, 529-533.
49. YANG, H., Li, X., XU, Z. et al.
« *Helicobacter heilmannii* » infection in a patient with gastric cancer.
Dig. Dis. Sci., 1995, **40**, 5, 1013-1014.
50. ZHU, J., TENG, C.H., CHANG, C.F. et al.
Cloning and characterization of a *Helicobacter bizzozeronii* urease gene cluster.
DNA Seq., 2002, **13**, 6, 321-331.

Table de matières

Sommaire	8
Introduction	9
<u>Première partie : Etude bibliographique</u>	11
I. Identification des hélicobactéries gastrique du chien	12
1.1. Espèces décrites	12
1.1.1. " <i>Helicobacter heilmannii</i> "	12
1.1.2. <i>H. felis</i>	13
1.1.3. <i>H. bizzozeronii</i>	13
1.1.4. <i>H. salomonis</i>	14
1.1.5. Autres hélicobactéries	14
1.2. Méthodes de différenciation et de quantification	14
1.2.1. Observation directe : la différenciation des espèces selon l'ultrastucture	14
1.2.1.1. Examens de routine et caractères biochimiques	14
1.2.1.2. Microscope optique et électronique	15
1.2.2. Observation indirecte : les techniques génétiques	15
1.2.3. Quantification des hélicobactéries	16
1.2.3.1. Quantification directe : le microscope	16
1.2.3.2. Quantification indirecte	16
1.2.4. Mesure des lésions gastriques	16
1.2.4.1. Méthode de mesure directe : la microscopie	16
1.2.4.2. Méthode de mesure indirecte : les marqueurs de souffrance cellulaire	17
II. Hypothèses concernant la pathogénie des hélicobactéries chez le chien	17
2.1. Etudes concernant la prévalence des hélicobactéries	17
2.2. Etudes concernant la quantité des hélicobactéries	18
2.3. Etudes concernant la localisation des hélicobactéries au sein des différentes régions gastriques	18
2.4. Etudes concernant la localisation des hélicobactéries au sein de la muqueuse gastrique	19
2.5. Etudes concernant l'espèce	20
2.5.1. « <i>H. heilmannii</i> »	20
2.5.2. <i>H. felis</i>	20
2.5.3. <i>H. bizzozeronii</i>	21
2.5.4. <i>H. salomonis</i>	21
III. Pathologie comparée et risque zoonotique	21
3.1. <i>H. pylori</i>	21
3.2. « <i>H. heilmannii</i> »	22
3.3. Autres hélicobactéries	22
3.4. Thérapies et voies d'avenir dans le traitement de l'hélicobactériose gastrique	23
Conclusion	24

<u>Seconde partie : Matériel et méthodes</u>	25
I. Les prélèvements	26
1.1. Animaux participant à l'étude	26
1.2. Réalisation des prélèvements	26
1.3. Récolte et conservation des prélèvements	27
1.4. Analyse histologique des prélèvements	27
II. Quantification par PCR en temps réel	27
2.1. Quantification des hélicobactéries	27
2.1.1. Utilisation d'une gamme étalon	28
2.1.2. PCR en temps réel « hélicobactéries »	28
2.2. Quantification des cellules gastriques	28
2.2.1. Le marqueur cellulaire : le gène PrP	28
2.2.2. PCR en temps réel « marqueur cellulaire »	29
2.3. Appareil de PCR en temps réel	29
2.4. Statistiques	30
III. Méthodes de discrimination des souches	30
3.1. PCR classique Uréase	30
3.1.1. Préparation du mélange réactionnel	30
3.1.2. Thermocycleur et électrophorèse sur gel	31
3.2. Méthode de discrimination par digestion enzymatique	31
3.2.1. Principe, la technique RFLP	31
3.2.2. Méthode	32
3.3. Clonage	32
3.3.1. Principe	32
3.3.2. Méthode	33
3.3.2.1. Utilisation d'un plasmide ouvert : Ligation dans le plasmide PGEM	33
3.3.2.2. Transformation des bactéries	33
3.3.2.3. Sélection des colonies	34
3.3.3. Méthode de vérification de l'insertion : la PCR M13-M13 Rev	34
3.3.4. Un outil supplémentaire : la PCR classique « ARNr 16S »	34
3.4. Analyse des séquences des brins « uréase » et « ARNr 16S »	35
3.4.1. Procédé	35
3.4.2. Analyse des séquences et recherche d'homologies (Blast)	35
3.4.3. Alignement des séquences	36
3.4.4. Etablissement d'un arbre phylogénétique (ADN et protéines)	36

<u>Troisième partie : Analyse, interprétation et discussion des résultats</u>	37
I. Discussion concernant la quantification des hélicobactéries	38
1.1. Premières observations	38
1.1.1. Prévalence des hélicobactéries	38
1.1.2. Comparaison des résultats obtenus à partir des différents types de PCR	39
1.2. Répartition des hélicobactéries au sein des différentes régions gastriques	41
1.2.1. Échantillons provenant de l'antre	41
1.2.2. Échantillons provenant du fundus	42
1.2.3. Échantillons provenant du corps	42
1.2.4. Comparaison des quantités de bactéries selon les localisations	43
1.3. Calculs de quantité moyenne et médianes arithmétiques	44
1.3.1. Résultats et analyse	44
1.3.2. Classement des échantillons	45
Conclusions	47
II. Standardisation par rapport à un marqueur cellulaire	47
2.1. Objectif	47
2.2. Résultats et analyses de la quantification du marqueur cellulaire.	48
2.2.1. Répartition des quantités d'ADN cellulaire en fonction de la zone de biopsie	48
2.2.2. Correction apportée par la quantification des cellules gastriques aux quantités de bactéries par échantillon	49
Conclusions	50
III. Relation entre quantification et lésions histologiques	51
3.1. Corrélation quantité/ densité histologique	51
3.1.1. Échantillons de l'antre	51
3.1.2. Échantillons du corps	52
3.2. Corrélation entre quantité de bactéries et grade lésionnel histologique	53
3.2.1. Antre de l'estomac	53
3.2.2. Corps de l'estomac	54
3.3. Répartition des échantillons en fonction du caractère éosinophile des lésions	55
3.4. Répartition des échantillons en fonction du caractère « atrophie de la muqueuse »	56
Conclusions	57
IV. Identification des différentes hélicobactéries	57
4.1. Premières observations	57
4.2. Digestion enzymatique et co-infections	57

4.3. Résultats des « blasts » et comparaison avec les résultats de la digestion enzymatique	60
4.4. Arbre phylogénétique des séquences analysées	62
4.5. Fréquence d'isolement des différentes souches	68
4.6. Répartition des souches d'hélicobactéries en fonction de la localisation	68
Conclusions	71
V. Relation entre souches bactériennes et lésions histologiques	71
5.1. Antre	72
5.2. Corps	73
5.3. Prévalence des différentes hélicobactéries	74
Conclusions	74
VI. Approches particulières	75
6.1. Espèces et génotypes particuliers	75
6.2. Etude concernant les 6 chiens « sains » de chenil (n°3, 5, 13, 14, 16 et 18)	75
6.3. Approche de la quantité de bactéries présentes en fonction de l'âge des chiens	76
Conclusions	77
Discussion et perspectives	78
Lexique	81
Annexes	83
Index bibliographique	90

Toulouse, 2006

NOM : COILLARD

PRENOM : JEREMIE

TITRE: QUANTIFICATION PAR PCR EN TEMPS REEL ET IDENTIFICATION GENETIQUE DES SOUCHES D'HELICOBACTERIES GASTRIQUES DANS UN GROUPE DE CHIENS ATTEINTS DE TROUBLES DIGESTIFS.

RESUME:

Le rôle des hélicobactéries gastriques chez les chiens présentant des troubles digestifs chroniques n'est pas clairement démontré. L'utilisation des techniques de biologie moléculaire a ouvert de nouvelles perspectives.

La quantification par PCR en temps réel des hélicobactéries, sur 30 chiens malades et 6 chiens sains, a révélé une prévalence de 100%, une charge bactérienne globalement élevée et significativement plus importante dans le corps par rapport au fundus et à l'antré.

Aucune corrélation n'a été établie entre la quantité d'hélicobactéries et la sévérité ou la nature de la gastrite observées par l'histologie.

Le séquençage ADN et l'analyse phylogénétique ont permis d'isoler 5 souches, dont *H. heilmannii* (86.6% des animaux), *H. bizzozeronii* (43.3%) ainsi qu'une souche encore non décrite (73.3%). Soixante-quinze pour cent des chiens présentaient une co-infection.

Aucune corrélation n'a été établie entre une souche bactérienne précise et la sévérité ou la nature de la gastrite.

MOTS-CLES:

HELICOBACTER-CHIEN-ESTOMAC-PCR

ENGLISH TITLE:

REAL-TIME PCR QUANTIFICATION AND GENETIC IDENTIFICATION OF GASTRIC HELICOBACTER STRAINS IN A GROUP OF DOGS WITH DIGESTIVE DISORDERS.

ABSTRACT:

The involvement of gastric helicobacteria in chronic digestive diseases of the dog is not clear. Molecular biology technologies have been used to further characterize this involvement.

Quantification of helicobacteria by real-time PCR in 30 dogs with digestive signs and 6 healthy dogs showed a 100% prevalence and a high bacterial density which is significantly higher in the body of the stomach than in the fundus and the antrum.

No relationship between *Helicobacter* density and gastritis score has been observed.

Five *Helicobacter* strains have been isolated by DNA sequencing and phylogenetic analysis, among which *H. heilmannii* (86.6% of dogs), *H. bizzozeronii* (43.3%) and a new strain (73.3%). Seventy-five percent of the dogs were co-infected by different strains.

No link has been observed between a particular bacterial strain and either the histological score or the type of the gastritis.

KEY WORDS:

HELICOBACTER-DOG-STOMACH-PCR