

***Helicobacter* sp. dans l'estomac des porcs charcutiers : un problème de santé publique ?**

Catherine MAGRAS (1), F. CANTET (2), n'G. KOFFI (1), Marie-France PILET (1), F. MÉGRAUD (2), M. FEDERIGHI (1)

(1) I.N.R.A.-E.N.V.N. - Unité Associée d'Hygiène Alimentaire
École Nationale Vétérinaire, route de Gachet, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 03

(2) Université de Bordeaux II
Laboratoire de Bactériologie - 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux

***Helicobacter* sp. dans l'estomac des porcs charcutiers - un problème de santé publique ?**

L'infection à *Helicobacter pylori*, responsable de gastrites chroniques et d'ulcères chez l'homme, est aujourd'hui considérée comme une des infections bactériennes les plus répandues dans le monde. Cependant les réservoirs, les sources et les modes de transmission de *H. pylori* sont encore mal connus. Cette étude a pour objectif d'évaluer si l'espèce porcine est un réservoir de *Helicobacter* sp. et de *Helicobacter pylori*. Des prélèvements stomacaux de 80 porcs charcutiers provenant de 8 élevages différents et de deux régions de production française (Bretagne, Pays de Loire) ont été réalisés à l'abattoir. Des analyses bactériologique, histologique et moléculaire (amplification et séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S) ont été mises en oeuvre pour la détection et l'identification de *Helicobacter* sp. et de *Helicobacter pylori*. Aucun *H. pylori* n'a pu être mis évidence. En revanche, une autre hélicobactérie identifiée comme *Helicobacter heilmannii* a été observée chez 65 porcs (81%). Le porc n'apparaît donc pas comme un réservoir de *H. pylori*, mais comme une source potentielle de transmission directe à l'homme de *H. heilmannii*.

***Helicobacter* sp. in pig stomach - a problem of public health?**

Infection with either *Helicobacter pylori* or *H. heilmannii* causes gastritis in humans. It has been suggested that *H. pylori* and *H. heilmannii* are transmitted by animals. Pigs present spontaneously peptic ulcer in the gastric pars esophagea. Eight groups of 10 pigs bred in 8 different farms in western France (Bretagne, Pays de Loire) were studied at the time of slaughter for *Helicobacter* sp and *Helicobacter pylori*. Gastric specimens were obtained from each animal. Detection of *Helicobacter* sp. and *H. pylori* were performed by cultural microbiological methods, histology, PCR and sequencing after DNA extraction using *Helicobacter* genus specific primers and ureC primers. *H. pylori* was not found in pig stomach. Tightly spiralled organisms identified as *Helicobacter heilmannii* were found in the stomach of 65 (81%) pigs.

INTRODUCTION

Le genre *Helicobacter* compte aujourd'hui 15 espèces bactériennes observées dans l'estomac ou dans l'intestin de l'homme et des animaux. Parmi les *Helicobacter* gastriques, ceux qui présentent un intérêt majeur en clinique humaine et vétérinaire sont les espèces qui infectent l'homme et les animaux domestiques : *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis* et *Helicobacter heilmannii*. *H. pylori* est le principal agent causal des gastrites chroniques actives et des ulcères duodénaux (MÉGRAUD et LAMOULIATTE, 1992) chez l'homme. Et à ce jour, l'infection à *H. pylori* est considérée comme une des infections bactériennes les plus répandues dans le monde (50% de la population mondiale). L'étude de la transmission de cette bactérie s'avère donc primordiale, or de nombreuses questions sont encore sans réponse. En effet, l'homme est déjà identifié comme un réservoir mais existe-t-il d'autres réservoirs animaux ? Quels sont les sources et les modes de transmission ?

Dans ce contexte, une éventuelle transmission de *H. pylori* à partir de réservoirs animaux peut être envisagée. Les espèces de productions animales apparaissent dès lors d'un grand intérêt. Parmi celles-ci, l'espèce porcine requiert une attention particulière du fait, d'une part, de sa sensibilité aux maladies digestives notamment gastriques, et d'autre part, de sa sensibilité à *Helicobacter pylori* démontrée expérimentalement. Par ailleurs, une étude menée au Brésil en 1988 (VAIRA et al., 1988) avait montré un taux d'anticorps anti-*H. pylori* significativement plus élevé chez les employés d'abattoirs travaillant au contact des carcasses de porcs que chez des employés de bureau, suggérant alors que le porc pourrait être une source de *H. pylori*. Depuis lors, peu de travaux sont venus confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Notre étude a pour objectif d'évaluer et de caractériser le statut microbiologique en France de l'espèce porcine vis à vis de *Helicobacter sp.* et de *Helicobacter pylori*. Pour des raisons de facilité d'accès aux plus grand nombre d'animaux, il a été choisi d'étudier les porcs charcutiers en fin d'engraissement, et, afin de nous placer dans les conditions optimales, les prélèvements des échantillons ont été effectués à l'abattoir.

1 . MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Origine des échantillons

Huit séries de prélèvements stomacaux, sur 10 porcs charcutiers par série, ont été réalisées, soit 80 porcs charcutiers analysés provenant de 8 élevages différents et de deux régions de production différentes (Bretagne, Pays de Loire). Les prélèvements stomacaux ont été effectués, selon un protocole standardisé, sur la chaîne d'abattage juste après l'éviscération. Trois sites de prélèvement ont été sélectionnés (figure 1) :

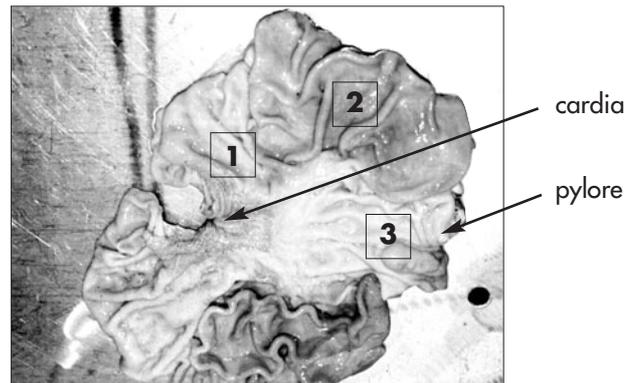
- le site 1 en région péri-cardiale
- le site 2 en région fundique.
- le site 3 en région pylorique.

Avant d'effectuer en triple (1/3 pour l'histologie, 1/3 pour la bactériologie, 1/3 pour l'analyse moléculaire) les prélèvements, un examen macroscopique rapide de la muqueuse de

l'estomac est fait. Les échantillons destinés à la bactériologie ont été placés dans le milieu de transport portagerm *pylori* (bioMérieux) acheminés sous régime du froid jusqu'au laboratoire et traités dans les heures suivant le prélèvement (au maximum 24 heures). Ceux destinés à l'analyse moléculaire sont congelés dans l'azote liquide puis conservés à - 80°C, et enfin, ceux destinés à l'histologie ont été conservés dans du formol à 10 %.

Figure 1

Position des trois sites de prélèvement de l'estomac de porc (estomac ouvert selon la grande courbure).



1.2. Analyses des échantillons

1.2.1. L'analyse bactériologique

Tous les échantillons (80 x 3) ont été traités en bactériologie. Chaque échantillon est broyé dans 3 ml de bouillon Preston. La suspension obtenue est récupérée et quelques gouttes sont déposées sur chaque milieu de culture. Les milieux utilisés sont :

- 1) des milieux spécifiquement développés pour la culture de *Helicobacter sp.* dont la composition est présentée dans le tableau 1 : milieu "H. pylori", milieu gélosé au sang humain (10%), milieu gélosé au sang de cheval lysé (7%), gélose au sang cuit (sang humain + polyvitex) ;
- 2) des milieux de routine : gélose chocolat (Biokar), milieu gélosé de Karmali (Biokar), milieu gélosé de Skirrow (Oxoid). Les milieux ensemencés sont incubés à 37°C en atmosphère microaérobie (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂) et maintenus jusqu'à 12 jours d'incubation.

Pour chaque échantillon, une goutte de la suspension ensemencée sur les différents milieux est déposée sur une lame pour la réalisation d'un frottis. Après fixation à l'alcool, une coloration de Gram est effectuée.

1.2.2. L'analyse moléculaire

Dans un premier temps, l'analyse moléculaire a été réalisée sur les échantillons provenant des sites 1.

L'extraction de l'ADN : Deux méthodes d'extraction ont été utilisées. Elles reposent toutes deux sur le même principe : une lyse de l'échantillon suivie d'une adsorption des acides nucléiques sur une membrane en gel de silice (pour la méthode d'extraction par le Kit Qiagen, QIAmp Tissue Kit) ou sur des diatomées (pour la méthode de BOOM et al., 1990).

Tableau 1 - Composition des milieux spécifiques de culture de *Helicobacter pylori*

Pour 1l de milieu	Milieu "H. pylori"	Milieu gélosé au sang humain	Milieu gélosé au sang de cheval lysé
Wilkins Chalgren (Oxoid)	43 g/l	43 g/l	43 g/l
Sang humain	10%	10%	/
Sang de cheval lysé	/	/	7%
Vancomycine (10 mg/ml)	1 ml	/	/
Céfsulodine (10 mg/ml)	0,2 ml	/	/
Triméthoprim (5 mg/ml)	1 ml	/	/
Actidione (20 mg/ml)	5	/	/

Tableau 2 - Amorces utilisées pour les différentes amplifications géniques

Amorce	Gène cible	Séquence nucléotidique (5' → 3')	Position	Taille de l'amplifiat	Utilisation
HS1 ⁽¹⁾	ARNr	AAC GAT GAA GCT TCT AGC TTG CTA G	65-89	400 pb	PCR/séq
HS2 ⁽¹⁾	16S	GTG CTT ATT CGT TAG ATA CCG TCA T	464-439		
AL1 ⁽²⁾	ureC	AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T	1289-1314	294 pb	PCR
AL2 ⁽²⁾		AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC	1584-1561		

(1) Séquence et numérotation des amorces oligonucléotidiques basées sur la séquence du gène de l'ARN ribosomal 16S de *H. pylori* (accession : UO1328)

(2) Séquence et numérotation des amorces oligonucléotidiques basées sur la séquence du gène *ureB* de *H. pylori* (accession : M60398)

L'amplification génique : La recherche de *Helicobacter sp.* a été effectuée par amplification d'une région d'ADN de 400 pb codant pour l'ARNr 16S au moyen d'amorces HS1/HS2 spécifiques du genre *Helicobacter* (GERMANI et al., 1997). Pour la recherche spécifique de *Helicobacter pylori*, les amorces AL1/AL2 du gène (*ureC*) de l'urée (LABIGNE, 1991) ont été utilisées (tableau 2). Pour toutes les amplifications, la souche de référence CIP101260 de *Helicobacter pylori* a été utilisée comme témoin positif. Les cycles d'amplification ont été réalisés avec un thermocycleur Perkin Elmer 480 et un Amplitron II R (ThermoLyne).

Le séquençage des produits d'amplification : Les produits d'amplification obtenus avec les amorces HS1/HS2 ont été purifiés puis séquencés selon la méthode de Sanger et avec le Kit Prism Ready Reaction Ampli Taq FS DyeDeoxy Terminator (Applied Biosystems, Perkin Elmer). Afin d'obtenir plus de 80% du gène de l'ARNr 16S une seconde région FH1/FH2, chevauchant la région HS1/HS2 (figure 2), a été amplifiée et séquencée. Une identification par comparaison (programmes "Blast" et "clustal" utilisés) aux séquences nucléotidiques contenues dans la banque de données GenBank a ainsi été possible.

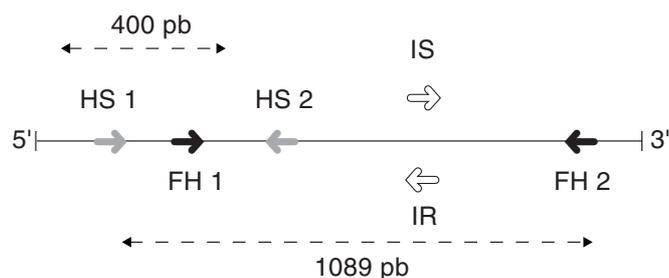
1.2.3. L'analyse histologique

Pour chaque échantillon, trois coupes en paraffine de 4 à 5 µm ont été réalisées et colorées à l'hémalum-éosine et par la coloration de Giemsa modifiée. La première coloration permet d'étudier les structures tissulaires, les bactéries apparaissant colorées en rose plus ou moins intense. La seconde permet une meilleure mise en évidence, par une coloration bleue intense,

des bactéries à coloration de Gram négative spiralées comme les *Campylobacter* et les *Helicobacter* (GRAY et al., 1986).

Figure 2

Positions des amorces utilisées pour séquencer le gène de l'ARNr 16S du genre *Helicobacter* (1414 pb).



2 . RÉSULTATS - DISCUSSION

2.1. Absence d'*Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori n'a pas pu être mis en évidence dans notre étude, ni par observation microscopique sur les coupes histologiques, ni par mise en culture et enfin, ni par PCR du gène *ureC* intervenant dans la colonisation de *H. pylori*. Des études bactériologiques réalisées au Brésil (120 porcs étudiés, QUEIROZ et al., 1990) et en Italie (85 porcs étudiés, GRASSO et al., 1996) n'avaient également pas pu mettre en évidence la présence de *Helicobacter pylori* chez les porcs à l'abattoir. Mais il est vraisemblable que la complexité de la flore gastrique du porc a pu gêner l'isolement par culture de *H. pylori* dont la fragilité et les exigences culturelles sont

connues. Cependant dans notre étude, nous avons mis en oeuvre plusieurs techniques complémentaires telles que l'histologie et l'amplification génique. Or aucune de ces techniques n'a permis la mise en évidence de *Helicobacter pylori*. Par ailleurs, les études d'inoculation expérimentale à des porcelets montrent une colonisation massive (10⁶ à 10⁷ UFC/g de muqueuse, (EATON et al., 1996) et rapide (2 à 4 jours après l'inoculation, (EATON et al., 1996) de la muqueuse gastrique par *H. pylori*, et l'apparition de lésions similaires à celles provoquées par *H. pylori* chez l'homme. A ce titre, les porcelets gnotobiotiques constituent un modèle animal intéressant pour l'étude de *H. pylori*. Aussi l'hypothèse d'un portage gastrique sain des porcs semble-t-elle peu probable. Ce que confirme nos résultats puisque l'étude a porté sur des porcs tout venant "sains". En effet, l'observation macroscopique des estomacs a montré la présence de lésions d'ulcère sur 7% des porcs. Ces lésions étaient d'évolution subaiguë, de petite taille (inférieures à environ 5 mm de diamètre), unique (57% des ulcères observés) ou multiples (2 à 3 ulcères dans 43% des cas observés). Or aucune n'a été observée en région pylorique et aucune n'a été associée à la présence de *H. pylori*. Une étude complémentaire sur des cas référés "d'ulcères" porcins (truies, porcelets, porcs charcutiers) est en cours.

2.2. Présence d'*Helicobacter* identifiées comme *H. heilmannii*

L'observation des coupes histologiques montrent, dans la lumière des glandes gastriques (figure 3) et en surface de la muqueuse, la présence de bactéries fusiformes, de grande taille (de 7 à 10 µm), avec de nombreuses spires de faible amplitude. Les caractéristiques morphologiques et la coloration de Gram négative de ces bactéries suggèrent leur appartenance au genre *Helicobacter* et plus particulièrement aux espèces *H. felis* ou *H. heilmannii*. Cette présence d'hélicobactéries dans les estomacs des porcs est confirmée par la détection par PCR au moyen des amorces HS1/HS2 spécifiques de *Helicobacter* sp. Cependant, bien que leur présence ait été notée à l'examen des frottis des suspensions servant à leur mise en culture, l'isolement de ces bactéries n'a pas été possible par les méthodes classiques de bactériologie. Leur identification a donc nécessité le séquençage de l'ARNr 16S. Les résultats fournis ont permis d'identifier les bactéries comme étant *Helicobacter heilmannii*.

Helicobacter heilmannii, initialement nommé *Gastrospirillum hominis*, a d'abord été observé dans l'estomac de l'homme (Mc NULTY et al., 1989). Cette hélicobactérie a une morphologie particulière : plus longue que *H. pylori* avec 6 à 8 tours de spire. Elle est en revanche morphologiquement proche de *Helicobacter felis*, isolée chez le chat et le chien. Mais jusqu'à ce jour à la différence de *H. felis*, cette bactérie n'a pas pu être isolée par les méthodes classiques de bactériologie, même si un essai réussi de culture sur des milieux gélosés a été rapporté par (HANNINEN et al., 1995). Actuellement, la méthode de culture de *H. heilmannii* apparaissant comme la plus efficace est la culture in vivo, par inoculation d'homogénat de biopsies infectées à des souris (MENDES et al., 1998). Les échecs à la mise en culture, que nous avons observés sur nos échantillons positifs, ont égale-

Figure 3

Coupes histologiques de l'estomac de porc
(Coloration à l'hémalum-éosine).
Observation en microscopie optique (3.1) objectif 40,
(3.2) objectif 100.
De nombreuses bactéries fusiformes et spiralées (→)
s'observent dans la lumière de la glande.

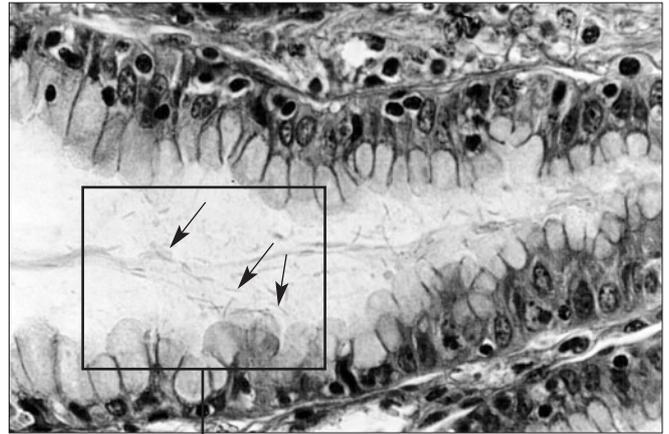


Figure 3.1



Figure 3.2

ment été notés par QUEIROZ et al., (1990) et GRASSO et al., (1996) sur le même type d'échantillons (muqueuse gastrique de porc, (QUEIROZ et al., 1990, GRASSO et al., 1996). Par ailleurs ces 2 études décrivent des aspects morphologiques et une localisation des bactéries dans la lumière des glandes gastriques tout à fait similaires à nos observations. L'espèce porcine apparaît donc bien comme un réservoir de *Helicobacter heilmannii*, dont le portage chez les porcs à l'abattoir est élevé : 81% d'après notre étude. Le taux de portage que nous avons obtenu ne peut malheureusement pas être comparé à d'autres données de la bibliographie. En effet, seuls les travaux de QUEIROZ et al., (1990) et de GRASSO et al., (1996) apportent des données chiffrées (respectivement 10,8% et 9,4%) mais ces chiffres ont été obtenus par des méthodes de détection des *Helicobacter* sp. reposant sur la bactériologie et l'histologie, et non pas comme dans nos travaux, avec une détection par PCR dont la plus grande sensibilité dans la détection de *Helicobacter* sp. est actuellement largement reconnue.

À ce jour, *Helicobacter heilmannii* est reconnu comme responsable de gastrite chronique active et d'ulcère chez l'homme, même si l'infection semble bien moins fréquente que celle à *H. pylori* (39 cas/15 180 étudiés par (HEILMANN et BORCHARD, 1991); 0,6% (HOLCK et al., 1997). Chez le porc, plusieurs études suggèrent une association très forte entre la présence de *H. heilmannii* et les ulcères du cardia (QUEIROZ et al., 1996, BARBOSA et al., 1995) et des gastrites chroniques (QUEIROZ et al., 1990 ; GRASSO et al., 1996). L'étude des structures tissulaires de nos échantillons se poursuit, cependant nos premières observations révèlent également la présence de lésions de la muqueuse (infiltration lymphocytaire, développement très important du Mucosa Associated Lymphoid Tissue - résultats non montrés). L'hypothèse d'ulcère et/ou de gastrite du porc à *Helicobacter heilmannii* ne doit donc pas être éludée. D'un point de vue santé publique enfin, une transmission de *H. heilmannii* à l'homme par les animaux semble très probable (LEE et al., 1988, DIETERICH et al., 1998). De plus une étude récente (MEINING et

al., 1998), menée sur 177 patients atteints de gastrite confirmée à *H. heilmannii*, montre que le contact avec des animaux augmente le risque d'infection de l'homme. Parmi les espèces étudiées (le chat, le chien et le porc), c'est le contact avec le porc qui augmente le plus (odds de 4,990 vs 1,710 pour le chat et 1,462 pour le chien) ce risque.

CONCLUSION

Le porc charcutier ne semble pas être une source de transmission de *Helicobacter pylori* pour l'homme. En revanche, il apparaît porteur de *Helicobacter heilmannii* et de ce fait il constitue une source potentielle de transmission directe à l'homme. La grande fréquence de cette infection chez le porc et l'association apparente de ces bactéries avec des lésions digestives pourraient également être à l'origine de troubles digestifs pouvant entraîner des baisses des performances zootechniques chez le porc en engraissement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARBOSA A. J. A., SILVA J. C. P., NOGUEIRA A. M. M. F., PAULINO E., MIRANDA J. A. C. R., 1995. Vet Pathol, 32, 134-139.
- BOOM R., SOL C. J. A., SALIMANS M. M. M., JANSEN C. L., WERTHEIM-VAN DILLEN P. M. E., VAN DER NOORDAA J., 1990. J. Clin. Microbiol., 28, 495-503.
- DIETERICH C., WIESEL P., NEIGER R., BLUM A., CORTHESEY-THEULAZ I., 1998. J. Clin. Microbiol., 36, 1366-1370.
- EATON K. A., SUERBAUM S., JOSEPHANS C., KRACKOWKA S., 1996. Infect. Immun., 64, 2445-2448.
- GERMANI Y., DAUGA C., DUVAL P., HUERRE M., LEVY M., et al., 1997. Res. Microbiol., 148, 315-326.
- GRASSO G. M., RIPABELLI G., SAMMARCO M. L., RUBERTO A., IANNITTO G., 1996. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 19, 213-217.
- GRAY S., WYATT J. I., RATHBONE B. J., 1986. J. Clin. Pathol., 39, 1279.
- HANNINEN M. L., JALAVA K., SAARI S., HAPPONEN J., WESTERMARCK E., 1995. EurocarniEuropean Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 14, 145-146.
- HEILMANN K. L., BORCHARD F., 1991. Gut, 32, 137-140.
- HOLCK S., INGEHOLM P., BLOM J., NORGAARD A., ELSBORG L., et al., 1997. Apmis, 105, 746-756.
- LABIGNE A., 1991. J. Bacteriol., 173, 1920-1931.
- LEE A., DENT J., HAZELL S., McNULTY C., 1988. Lancet, 1, 300-301.
- McNULTY C. A. M., DENT J. C., CURRY A., UFF J. S., FORD G. A., et al., 1989. J. Clin. Pathol., 42, 585-591.
- MÉGRAUD F., LAMOULIATTE H., 1992. Dig Dis Sci, 37, 769-772.
- MEINING A., KROHER G., STOLTE M., 1998. Scand J Gastroenterol, 33, 795-798.
- MENDES E. N., QUEIROZ D. M. M., MOURA S. B., ROCHA G. A., 1998. Braz J Med Biol Res, 31, 373-376.
- QUEIROZ D. M. M., ROCHA G. A., MENDES E. N., LAGE A. P., CARVALHO A. C. T., BARBOSA A. J. A., 1990. Vet. Microbiol., 24, 199-204.
- QUEIROZ D. M., ROCHA G. A., MENDES E. N., DE MOURRA S. B., DE OLIVEIRA A. M., MIRANDA D., 1996. Gastroenterol., 111, 19-27.
- VAIRA D., HOLTON J., LONDEI M., BELTRANDI E., P.R. S., D'ANASTASIO C., et al., 1988. Lancet, 24, 725-726.