

Caractérisation de souches de *Coxiella burnetii* isolées de ruminants en France par RAPD

RAPD characterisation of *Coxiella burnetii* isolated from ruminants in France

SIDI-BOUMEDINE K., DUQUESNE V., FERNANDES I., MARRO S., THIERY R.

Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) - Unité de pathologie des petits ruminants - 105 Route des Chappes - BP111, 06902 Sophia-Antipolis - France

INTRODUCTION

La fièvre Q est une zoonose due à *Coxiella burnetii*. Les ruminants représentent le principal réservoir de la bactérie. Chez ces derniers, *C. burnetii* est responsable d'avortements et autres pathologies de la reproduction. Des quantités élevées de bactéries sont excrétées dans l'environnement par ces animaux, au moment de l'avortement ou de la mise-bas. La contamination humaine survient généralement après l'inhalation d'aérosols contaminés (Maurin et Raoult, 1999). Pour mieux comprendre l'épidémiologie de la fièvre Q, plusieurs techniques de typage moléculaire ont été utilisées et semblent utiles pour les études épidémiologiques et phylogénétiques des souches de *C. burnetii*. Toutefois, la méthode de *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Welsh et McClelland, 1990 ; Williams *et al.*, 1990) n'a jamais été évaluée pour le typage de *C. burnetii*.

Nous avons utilisé cette technique pour évaluer la diversité génétique de souches de *C. burnetii* isolées chez les ruminants, en comparaison avec les données obtenues par la méthode de *Multiple Loci VNTR Analysis* (MLVA) (Arricau-Bouvery *et al.*, 2006).

1. MATERIEL ET METHODES

L'ADN de dix isolats français de *C. burnetii* obtenus de chèvres, de moutons, de vaches, et la souche de référence Nine Mile, ont été utilisés pour le typage par RAPD (tableau 1).

Pour établir les conditions optimales de la RAPD, plusieurs paramètres ont été testés, comme par exemple différentes concentrations de MgCl₂, mais aussi différentes marques de *Taq* polymérase.

Les RAPD *polymerase chain reactions* (PCRs) ont été réalisées en utilisant des amorces aléatoires dans les conditions suivantes pour un volume final de 25 µl: 1X tampon *Taq* polymérase (sans MgCl₂), 3 mM MgCl₂ ; 0,2 mM de chaque dNTPs ; 1U de *Taq* polymérase ; 0,5 µM 10-mer (P1-P4) et 10 ng d'ADN. Les amplifications ont été effectuées dans un *Eppendorf Mastercycler*, programmé pour une première étape de dénaturation de 5 min à 94°C, suivie de 45 cycles à 96°C pendant 30 s, 37°C pendant 30 s, 72°C pendant 90 s et une dernière étape à 72°C pendant 5 min. Les produits de PCR ont été séparés sur gel d'agarose 0,8 % contenant du bromure d'éthidium. L'analyse des gels a été réalisée en utilisant le logiciel *Quantity One 1-D Analysis* (Bio-Rad).

2. RESULTATS

Les résultats obtenus après utilisation du protocole RAPD optimisé sur les différents isolats sont indiqués dans le tableau 1. Un profil différent est généré avec chaque amorce auquel est assignée une lettre alphabétique. La combinaison des différents profils observés permet d'établir un profil ou type RAPD.

Les polymorphismes identifiés par RAPD permettent de faire la distinction entre des souches, qui sont identiques entre elles par la méthode MLVA, et qui proviennent de

troupeaux voisins, ou d'une même région mais également entre des souches provenant de régions différentes.

Tableau 1 : liste, caractéristiques et profils génétiques identifiés par MLVA et RAPD des isolats de *Coxiella burnetii* étudiés.

Souche	Hôte	Prélèvement	Signe Clinique	Pays (Département)	MLVA	P1	P2	P3	P4	Type RAPD
Nine Mile	Tique	--	--	USA (Montana)	4	A	A	A	A	1
CbB1	Bovin	Placenta	Avortement	France (61)	2	B	E	C	C	2
CbB4	Bovin	Placenta	Avortement	France (61)	2	B	G	F	E	3
CbB7	Bovin	Placenta	Avortement	France (61)	2	B	G	F	F	4
CbB5	Bovin	Lait	Avortement	France (76)	2	B	G	F	F	4
CbB2	Bovin	Lait	Métrite	France (76)	2	B	F	E	D	5
CbC1	Caprin	Placenta	Avortement	France (03)	2	B	B	B	B	6
CbC2	Caprin	Lait	--	France (79)	7	A	C	C	C	7
CbC5	Caprin	Lait	Avortement	France (82)	7	C	D	D	D	8
CbO1	Ovin	Placenta	Avortement	France (37)	19	D	H	E	G	9
CbO184	Ovin	Placenta	Avortement	France (06)	19	E	I	G	C	10

Par exemple, les deux souches CbB5 et CbB2 obtenues en 2001 et provenant de troupeaux voisins, ont été isolées respectivement sur une vache ayant avorté et chez une autre ayant présenté une métrite. Ces souches possèdent un profil MLVA identique mais sont différentes par RAPD. De même, les deux souches CbO1 et CbO184, isolées d'ovins élevés dans différentes régions françaises, à différentes périodes sont distinguables, quelle que soit l'amorce RAPD utilisée, mais sont similaires par MLVA. De plus, les souches isolées de chèvres semblent être polymorphes entre elles, et différentes des souches isolées chez les bovins et les ovins.

CONCLUSION

Cette étude préliminaire, a montré que la méthode RAPD est reproductible et permet d'identifier un polymorphisme entre des souches de *C. burnetii* étroitement liées.

Récemment, des méthodes de typage moléculaire, ont été décrites pour *C. burnetii*. Parmi ces méthodes, la MLVA (Arricau-Bouvery *et al.*, 2006) et la *Multispacer Sequence Typing* (MST) (Glazunova *et al.*, 2005) sont considérées comme hautement discriminantes. En effet, elles ont permis l'identification de trente-six génotypes différents.

Ces deux méthodes donnent des résultats similaires sur les dix souches utilisées pour cette étude : elles peuvent être séparées en quatre groupes distincts. En revanche, la RAPD a permis d'identifier de nouveaux polymorphismes entre des souches appartenant à un même groupe MLVA ou MST (données non montrées).

Pour conclure, la RAPD semble être un outil prometteur pour des études épidémiologiques de la fièvre Q, notamment pour l'étude de la propagation d'une souche au sein d'un même élevage mais également entre des élevages différents. Cependant, elle doit encore être évaluée avec un plus grand nombre d'échantillons provenant de foyers d'épidémies et récoltés à la fois chez l'homme et les ruminants, en comparaison avec d'autres méthodes de typage moléculaire.

Ce travail a été financé par le réseau d'excellence MedVetNet.

Arricau-Bouvery N. *et al.*, 2006. *BMC Microbiol.* 6, 38

Glazunova O. *et al.*, 2005. *Emerg Infect Dis.* 2005. 11, 1211-7

Maurin M., Raoult D., 1999. *Clin Microbiol Rev.* 12, 518-53.

Welsh J., McClelland M., 1990. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213-8

Williams J.G. *et al.*, 1990. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-5