



Méthodes

Épidémiologie moléculaire de la fièvre Q : une revue des méthodes de génotypage de *Coxiella burnetii* et des principales réalisations

Karim Sidi-Boumedine, Élodie Rousset

Anses, Laboratoire de Sophia-Antipolis, Unité Pathologie des ruminants, France



La bactérie intracellulaire obligatoire, *C. burnetii*, est l'agent responsable de la fièvre Q, une zoonose de répartition mondiale. L'identification rapide de la diffusion d'une souche donnée de *C. burnetii* dans une espèce-hôte ou entre différentes espèces est un préalable à toute investigation épidémiologique poussée (épidémies humaines, surveillance, suivi de l'efficacité des mesures de prophylaxie). Un certain nombre de méthodes de génotypage ont été explorées pour leur capacité à distinguer entre les isolats de *C. burnetii* dérivés de diverses zones géographiques et d'hôtes différents, mais surtout de patients présentant différents symptômes. Cependant, ces méthodes n'ont pas encore été utilisées largement pour des études d'épidémiologie moléculaire de la fièvre Q. Cela est sans doute lié aux particularités biologiques et à la difficulté de culture de cet agent pathogène. Cette revue a pour but de décrire les méthodes qui ont été explorées pour le typage de *C. burnetii*, et met l'accent sur les approches et les développements les plus récents. Ainsi, l'inventaire des méthodes est dressé pour permettre aux utilisateurs futurs de sélectionner la méthode la plus appropriée aux différents objectifs de l'étude épidémiologique de la fièvre Q, et ensuite déterminer leurs critères d'interprétation.

Introduction

La bactérie intracellulaire obligatoire à Gram négatif, *Coxiella burnetii*, est l'agent causal de la fièvre Q, une zoonose largement répandue. La fièvre Q a été décrite partout à travers le monde, même dans les zones arctiques, à l'exception probable de la Nouvelle-Zélande (Hilbink *et al.*, 1993; Maurin et Raoult, 1999; Koch *et al.*, 2010). Dans certaines conditions épidémiologiques, la fièvre Q peut provoquer des épidémies humaines explosives (van der Hoek *et al.*, 2010). De plus, pour certains groupes à risque, l'impact sur la santé publique, et donc aussi l'impact socio-économique, peuvent être importants (EFSA, 2010).

Le réservoir naturel de *C. burnetii* est très étendu, et comprend les ruminants, les carnivores domestiques, les mammifères sauvages, les oiseaux ainsi que les arthropodes, en particulier les tiques (Cutler *et al.*, 2007). Cette bactérie semble franchir facilement la barrière d'espèces. Les différentes espèces peuvent jouer un rôle dans la dissémination ou le maintien de la maladie comme porteurs de l'agent pathogène ou comme vecteurs. Bien que, le rôle de la plupart d'entre elles demeure incertain, les ruminants domestiques sont considérés comme le réservoir principal de la maladie, car les épidémies humaines majeures sont liées à l'exposition à ces animaux.

En effet, ces derniers peuvent excréter cet organisme dans les muqueuses vaginales, le lait, les urines et les matières fécales. Un grand nombre de bactéries est retrouvé dans le placenta et les liquides fœtaux, en particulier au cours de la mise bas pendant une flambée d'avortement due à la fièvre Q. En outre, la résistance de *C. burnetii*, sous une forme pseudo-sporulée, aux conditions du milieu extérieur augmente considérablement les risques d'exposition car la bactérie peut persister pendant de longues périodes et être disséminée. L'inhalation d'aérosols et de poussières contaminées constitue la voie principale de transmission à l'Homme (Maurin et Raoult, 1999; Woldehiwet, 2004; Arricau-Bouvery et Rodolakis, 2005).

Bien que les ovins et les caprins soient plus fréquemment

associés aux épidémies humaines de fièvre Q, les sources d'infections humaines demeurent souvent inconnues. Le génotypage des isolats de *C. burnetii* pourrait contribuer à expliquer les scénarios conduisant à la dissémination ainsi qu'aux épidémies de fièvre Q, et ainsi à trouver les meilleures solutions pour son contrôle. Évidemment, un génotypage systématique fournirait une base de données descriptive pour établir l'évolution temporelle et géographique des souches. Une large gamme de méthodes a été explorée pour le typage moléculaire et la caractérisation des souches de *C. burnetii*. Cependant, il reste essentiel de mener davantage de recherches sur les méthodes de génotypage pour obtenir une meilleure compréhension de l'épidémiologie moléculaire de *C. burnetii*. Le premier génome complet a été séquencé en 2003, bien que l'agent de la fièvre Q ait été découvert dans les années trente. L'identification des facteurs de virulence de *C. burnetii* a été limitée par l'absence d'un système de manipulation génétique. De plus, la plupart des chercheurs ont utilisé les méthodes de typage moléculaire surtout pour étudier l'association entre les polymorphismes génétiques des souches et les différents symptômes de la fièvre Q observés chez l'Homme. Les travaux moléculaires sur *C. burnetii* ont été ralentis par son cycle de développement intracellulaire complexe et sa culture fastidieuse. En outre, le potentiel infectieux élevé de *C. burnetii* limite les échanges de souches, et ainsi beaucoup d'études de typage sont basées uniquement sur des souches locales ou régionales. Il est également clair que dans la majorité des cas, un nombre limité de souches a été étudié. Les comparaisons des méthodes ont reposé seulement sur la présence de quelques souches communes, et non pas sur différentes méthodes utilisées dans la même étude. Ainsi, aucune méthode de typage n'est validée ou considérée comme une méthode de référence. Les efforts dans l'utilisation de méthodes de typage pour mieux comprendre l'épidémiologie de cet agent pathogène important sont plus récents. L'épidémie humaine de grande ampleur aux



Méthodes

Tableau 1. Caractéristiques des méthodes de typage de *C. burnetii* déjà utilisées ou qui pourraient être utiles

Méthode de typage	Pouvoir discriminant	Nombre de profils (nombre de souches testées)	Index de diversité**	Répétabilité	Reproductibilité	Délai des résultats (jours)	Coût relatif	Commentaires	Références
Méthodes déjà utilisées pour l'analyse de <i>C. burnetii</i>									
Séquençage du génome complet	Élevé	4 (4)	1	Élevée	Élevée	Mois à années	Très élevé		Beare <i>et al.</i> , 2009
Génotypage par puce à ADN	Élevé	8 (23)	0,7154	Moyenne > Élevée	Moyenne > Élevée	Semaines à mois	Élevé	Les gènes ne seront pas tous présents dans la souche séquencée	Beare <i>et al.</i> , 2006
MLST et ses variantes	Modéré > Élevé (dépend du choix du gène)	34 (176)	0,9273	Élevée	Élevée	3+	Équipement : moyen à élevé Personnels et consommables : élevé.	La sélection initiale des gènes cibles peut prendre beaucoup de temps	Glazunova <i>et al.</i> , 2005
Typage VNTR	Modéré > Élevé (dépend du choix des locus)	9 (16)	0,9083	Élevée	Potentiellement élevée	2-3	Équipement : moyen à élevé Personnel et consommables : moyen.	La fiabilité dépend du rendement et de la pureté de l'ADN	Svraka <i>et al.</i> , 2006
		36 (42)	0,99119						Arricau-Bouvery <i>et al.</i> , 2006
ECP	Modéré > Élevé	20 (82)	0,8585	Moyenne > Élevée (dépend de l'enzyme de restriction choisie)	Moyenne > Élevée	3 jours à plusieurs semaines	Équipement : élevé. Personnels et consommables : élevé.	La différenciation dépend du type et du nombre d'enzymes choisies	Jager <i>et al.</i> , 1998
REA du génome entier	Modéré > Élevé (dépend du nombre de bandes observées)	6 (32)	0,7944	Moyenne > Élevée	Moyenne	1-3	Moyen	La différenciation dépend du type et du nombre d'enzymes choisies	Hendrix <i>et al.</i> , 1991
Séquençage direct d'une région du génome	Modéré > Élevé (dépend du choix du gène)	4 (21)	0,5429	Élevée	Élevée	2-3	Équipement : faible à élevé. Personnels et consommables : faible à élevé.	La sélection initiale des gènes cibles peut prendre beaucoup de temps	Zhang <i>et al.</i> , 1997
		3 (19)	0,5088						Andoh <i>et al.</i> , 2004
Enzyme de restriction sur un seul produit amplifié	Faible > Modéré (dépend de l'amplikon)	5 (37)	0,6351	Élevée	Élevée	1-2			Sekeyova <i>et al.</i> , 1999
REP et RAPD PCR	Faible > Modéré	4 (5)	0,9	Moyenne	Faible	1	Équipement : faible à moyen. Personnels et consommables : faible.	Les profils peuvent varier selon l'équipement utilisé	Rustscheff <i>et al.</i> , 2000
PCR de l'IS1111	Modéré	5 (21)	0,7286	Moyenne > Élevée	Élevée	1	Faible à moyen	L'IS présent dans les souches à analyser peut être détecté mais pas quand il est absent	Denison <i>et al.</i> , 2007
IRS-PCR	Modéré > Élevé	7 (14)	0,8791	Moyenne > Élevée	Moyenne > Élevée	1	Moyen à élevé	La différenciation dépend du type d'enzyme choisie.	Arricau-Bouvery <i>et al.</i> , 2006
Typage des SNP par PCR en temps réel	Modéré > Élevé	9 (65)	0,7438	Élevée	Élevée	1	Moyen à élevé	La différenciation dépend du type et du nombre de SNP choisis.	Huijsmans <i>et al.</i> , 2011
Profils plasmidiques	Faible	ND	ND	Élevée	Moyenne	1	Équipement : faible. Personnels et consommables : faible.	La différenciation pourrait être améliorée par la digestion des plasmides par des enzymes de restriction	Aarts <i>et al.</i> , 2001

ND : non disponible.

* L'index de diversité est calculé comme décrit par Hunter et Gaston, 1988.



Méthodes

Tableau 1. Caractéristiques des méthodes de typage de *C. burnetii* déjà utilisées ou qui pourraient être utiles (suite)

Méthode de typage	Pouvoir discriminant	Nombre de profils (nombre de souches testées)	Index de diversité**	Répétabilité	Reproductibilité	Délai des résultats (jours)	Coût relatif	Commentaires	Références
Méthodes qui pourraient être utilisées pour l'analyse de <i>C. burnetii</i>									
RFLP basé sur un Southern blot	Modéré > Élevé (dépend du nombre de bandes observées)	ND	ND	Moyenne > Élevée	Moyenne	1-3	Moyen	Pourrait aider à établir le nombre et la position des séquences d'insertion	van Soolingen, 2001
AFLP	Modéré > Élevé	ND	ND	Élevée	Moyenne > Élevée	2	Équipement : faible à moyen. Personnels et consommables : faible.	A montré son utilité pour une bactérie intracellulaire très homogène	Boumedine and Rodolakis, 1998
AP-PCR (utilisant des amorces aléatoires)	Faible > Modéré	ND	ND	Faible	Faible	1	Équipement : faible à moyen. Personnels et consommables : faible.	Les profils peuvent varier avec l'équipement utilisé, mais si appliquée dans des conditions bien contrôlées, la méthode fournit des résultats rapides de coût très faible	Sidi-Boumedine et al., 2009

ND : non disponible.

* L'index de diversité est calculé comme décrit par Hunter et Gaston, 1988.

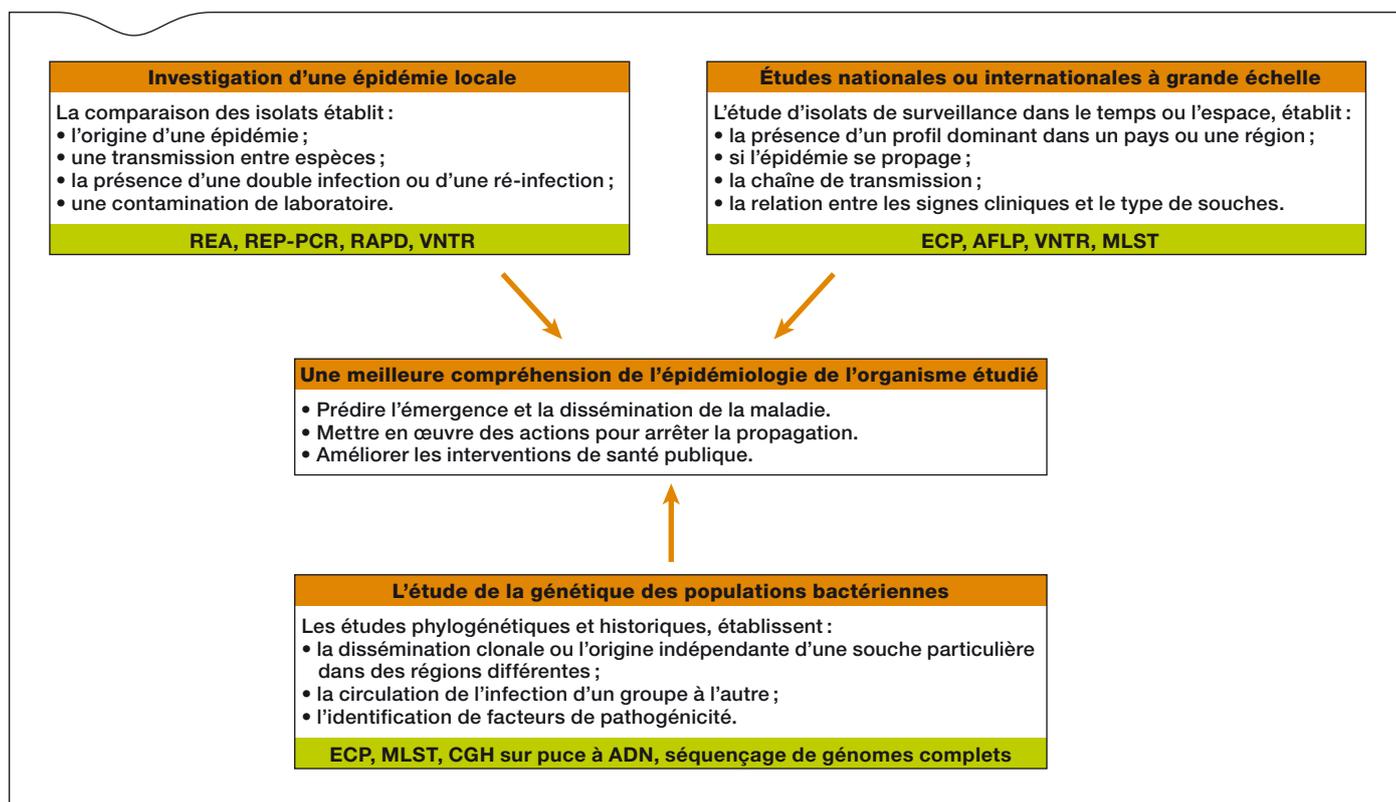


Figure 1. Visées et applications épidémiologiques du typage bactérien, avec une indication des techniques requises (adapté de Foxman et al., 2005)



Méthodes

Pays-Bas a renforcé l'urgence de ce besoin (EFSA, 2010). Cette revue a pour but de décrire les méthodes qui ont été explorées pour le typage de *C. burnetii*, en mettant l'accent sur les approches et les développements les plus récents. Le Tableau 1 fournit une vue d'ensemble des caractéristiques des méthodes rapportées dans la littérature. Le potentiel prometteur de certaines de ces méthodes pour les études épidémiologiques de la fièvre Q est discuté et un aperçu de leur utilisation pour des conditions épidémiologiques particulières est également proposé (Figure 1).

Les méthodes de typage moléculaire pour la caractérisation de *Coxiella burnetii*

Bien que les représentants, de l'unique espèce, du genre *Coxiella* montrent un niveau d'homogénéité génétique élevé, comme démontré par l'hybridation ADN-ADN et le séquençage génique de l'ARNr 16S (Stein et Raoult, 1993; Vodkin et al., 1986), un polymorphisme génétique entre les souches de *C. burnetii* a été mis en évidence en utilisant différentes techniques moléculaires (Tableau 1).

À ce jour, les séquences de cinq génomes complets et leur plasmide sont disponibles (Tableau 2). En 2003, la première séquence génomique complète a été obtenue pour la souche de référence: Nine Mile RSA 493 (Seshadri et al., 2003). Les séquences génomiques complètes de deux isolats d'endocardite humaine chronique et un isolat de rongeur naturellement atténué ont été récemment rendus publics (Beare et al., 2009). La taille des génomes et des plasmides allait de 2,03 à 2,22 Mb et de 37 à 54 kb, respectivement. La comparaison des génomes a révélé la présence de nombreux pseudogènes, un nombre relativement plus élevé de séquences d'insertion distribuées sur le chromosome par rapport aux autres bactéries intracellulaires obligatoires, et une grande plasticité induite par des transposons à l'intérieur du genre *Coxiella* (Seshadri et al., 2003; Beare et al., 2009).

Plusieurs méthodes de typage moléculaire développées pour l'épidémiologie moléculaire de différentes espèces bactériennes, examinées de manière approfondies par ailleurs (Olive and Bean, 1999; Foxman et al., 2005), ont été appliquées, avec plus ou moins de succès, à la différenciation d'isolats de *C. burnetii*.

Le profil plasmidique

La caractérisation des plasmides a conduit à l'identification de quatre types de plasmides de *C. burnetii*: les plasmides QpH1(36 kb)/QpDG, QpRS (39 kb), QpDV (33 kb) et un plasmide sans dénomination dérivé d'une souche chinoise (Hendrix et al., 1991; Ning et al., 1992; Thiele et al., 1994; Valkova et Kazar, 1995; Lautenschlager et al., 2000; Jager et al., 2002). En outre, des souches sans plasmide, contenant de longues séquences homologues de QpRS intégrées à l'ADN chromosomique, ont été décrites (Willems et al., 1997). Il est bien établi que des souches sans liens épidémiologiques peuvent montrer le même profil plasmidique. La faiblesse inhérente de la méthode du profil plasmidique est liée au fait que ces éléments extra-chromosomiques mobiles peuvent être perdus, parfois même pendant le passage en culture, ou acquis, conduisant à une instabilité du profil plasmidique (Aarts et al., 2001).

Les méthodes basées sur l'analyse de restriction de l'ADN chromosomique par des endonucléases

L'analyse du profil de restriction (REA) de l'ADN chromosomique

Les isolats de *C. burnetii* d'origines géographiques ou d'hôtes différents peuvent être différenciés par leur profil de restriction génomique, en utilisant différentes combinaisons d'enzymes de restriction, la meilleure résolution étant obtenue avec une digestion par *Bam*HI (Vodkin et al., 1986; Hendrix et al., 1991). Les isolats obtenus de cas de maladie aiguë étaient regroupés en trois profils similaires mais distincts formant les

Tableau 2. Liste des génomes de *C. burnetii* complètement séquencés

Souche	Numéro d'accèsion à Genbank	Géno-type*	Type de plasmide (numéro d'accèsion)	Hôte	Origine	Date d'isolement	Profil clinique	Publication
<i>C. burnetii</i> RSA 493	NC_002971	I	QpH1 (NC_002118 and NC_004704)	Tique	Montana États-Unis	1935	Aigu	Seshadri et al, 2003
<i>C. burnetii</i> RSA 331	NC_010117	II	QpH1 (non séquencé à partir de cette souche)	Homme, sang	Italie	1945	Aigu	Aucune
<i>C. burnetii</i> CbuK_Q154	NC_011528	IV	QpRS (NC_011526)	Homme, valve aortique sur endocardite	Orégon États-Unis	1976	Chronique	Beare et al., 2009
<i>C. burnetii</i> CbuG_Q212	NC_011527	V	Sans plasmide	Homme, valve aortique sur endocardite	Nouvelle Écosse Canada	1982	Chronique	Beare et al., 2009
<i>C. burnetii</i> Dugway 7E9-12	NC_009727	VI	QpDG (NC_009726)	Rongeur	Dugway, Utah États-Unis	1957	Atténué	Beare et al., 2009

* Défini par le profil des bandes de digestion par des enzymes de restriction (Hendrix et al., 1991)

Méthodes

groupes génomiques I, II, et III, alors que les isolats de cas chroniques se retrouvaient dans les groupes IV et V. Trois isolats supplémentaires, de pathogénicité inconnue et obtenus de rongeurs sauvages à Dugway (Utah, États-Unis), ont montré un profil de restriction unique et ont été assignés au groupe VI (Hendrix *et al.*, 1991). Les avantages de l'analyse du profil de restriction sont sa large applicabilité et son utilisation universelle. En revanche, ses désavantages comprennent la nécessité d'obtenir de l'ADN pur de bonne qualité pour l'analyse et la difficulté de comparaison des profils complexes obtenus composés de centaines de fragments.

L'analyse par électrophorèse en champ pulsé (ECP)

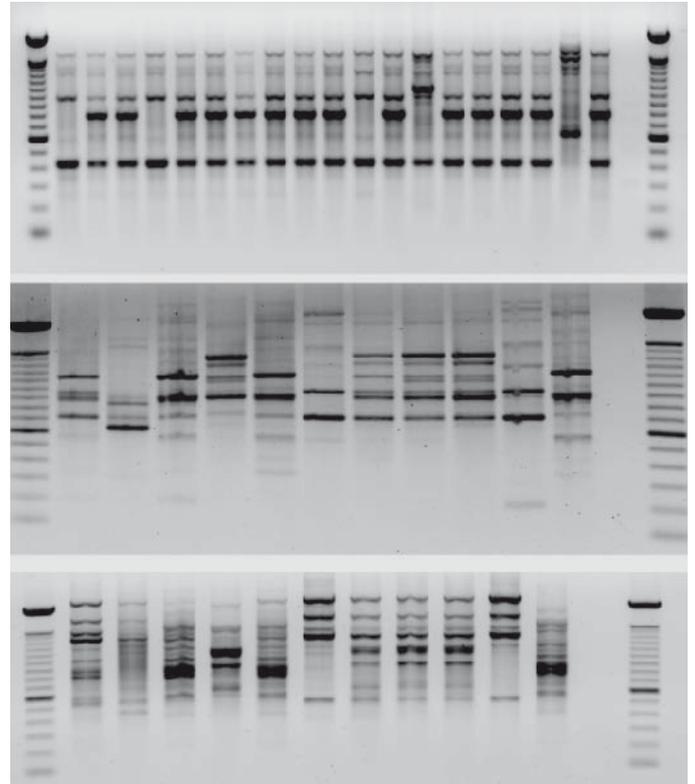
Une fois que les conditions optimales atteintes, par l'utilisation d'enzymes de restriction à sites de clivage rares, comme *NotI*, en combinaison avec les conditions électrophorétiques spécifiques de l'ECP et un système d'analyse de l'image, les isolats de *C. burnetii* peuvent être séparés en 20 profils différents associés à leur origine géographique (Heinzen *et al.*, 1990; Thiele *et al.*, 1993; Jager *et al.*, 1998). L'avantage principal de l'ECP est son pouvoir discriminant, le profil relativement simple des bandes et sa reproductibilité. En outre, l'ECP peut être utilisée pour la détermination de la taille du génome en additionnant celle des fragments (Willems *et al.*, 1998). Cependant, la nécessité de cultiver *C. burnetii*, l'utilisation de procédures longues et laborieuses d'extraction de l'ADN et de digestion des échantillons impliquent qu'une de quelques jours à quelques semaines est nécessaire pour l'obtention de résultats.

Les méthodes basées sur l'amplification Les méthodes d'empreinte génétique rep-PCR (amplification de séquences répétitives) et RAPD (amplification aléatoire d'ADN polymorphe)

La méthode de rep-PCR a été utilisée avec succès bien que très peu de souches de *C. burnetii* aient été testées. Différents variants génétiques de *C. burnetii* ont été trouvés parmi les souches isolées de chèvres avortées et de l'environnement (du foin) en Suède et parmi les souches de référence (Sjostedt *et al.*, 1998; Rustscheff *et al.*, 2000). Récemment, la technique de RAPD a été utilisée comme un moyen rapide et peu cher pour apprécier la variabilité génétique des isolats de ruminants (Sidi-Boumedine *et al.*, 2009a). Ces méthodes souffrent particulièrement d'une faible reproductibilité, et donc d'un manque de portabilité ainsi que de difficultés d'interprétation d'un laboratoire à un autre.

L'IRS-PCR (Infrequent Restriction Site-PCR)

Récemment cette méthode a été appliquée au typage de 13 isolats de *C. burnetii* obtenus de ruminants et de la souche de référence Nine Mile (Arricau-Bouvery *et al.*, 2006). Sept profils différents d'IRS-PCR ont été identifiés. Une bonne performance a été observée, bien que la méthode MLVA ait permis de différencier jusqu'à 11 groupes pour le même panel d'isolats. À notre connaissance, l'IRS-PCR pourrait être améliorée en sélectionnant une combinaison d'enzymes de restriction et d'adaptateurs appropriés pour le typage de *C. burnetii*. En effet, la combinaison d'enzymes qui a été utilisée précédemment pour l'IRS-PCR de *C. burnetii* avait été conçue pour la différenciation des espèces de *Brucella* (Cloeckert *et al.*, 2003). Cette combinaison n'était probablement pas la



Genotypage de *Coxiella* par RAPD

meilleure pour le typage de *C. burnetii*.

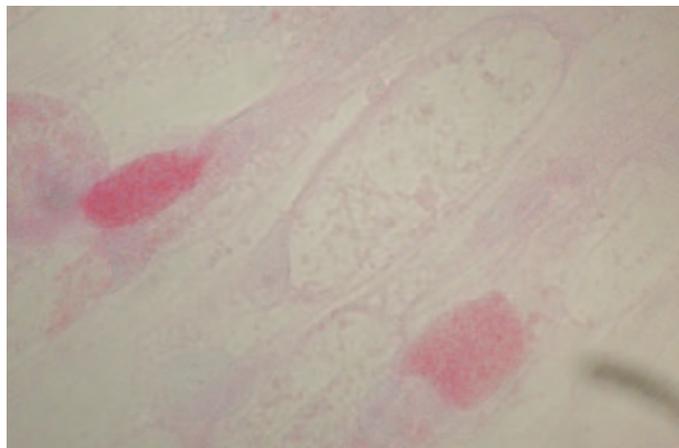
L'empreinte génétique par amplification génique de l'IS1111

Une variabilité très grande du nombre d'éléments IS1111 a été récemment décrite, entre les différents isolats de *C. burnetii* (Klee *et al.*, 2006). Cependant cette caractéristique n'a été utilisée que récemment pour le génotypage, lorsqu'une méthode de typage basée sur l'amplification génique de l'IS1111 a été décrite (Denison *et al.*, 2007). Ce test par PCR, qui utilise quatre couples d'amorces et une PCR en deux étapes, permet la différenciation des isolats de *C. burnetii* en cinq groupes génomiques. Ces groupes étaient corrélés à ceux précédemment décrits pour la REA (Hendrix *et al.*, 1991).

La VNTR-PCR (amplification par PCR des VNTR)

Deux systèmes de MLVA (analyse de plusieurs locus VNTR) pour la caractérisation de *C. burnetii* ont été décrits (Svraka *et al.*, 2006; Arricau-Bouvery *et al.*, 2006). Le système de MLVA proposé par Svraka *et al.* est composé de sept locus VNTR et est inclus dans le système d'Arricau-Bouvery *et al.* En utilisant 17 locus VNTR et 42 isolats de *C. burnetii*, la MLVA a conduit à l'identification de 36 génotypes différents. Ainsi, ces données démontrent que la MLVA est un outil approprié pour des études épidémiologiques de *C. burnetii* (Arricau-Bouvery *et al.*, 2006). De plus, des ressources électroniques sur Internet sont disponibles gratuitement pour faciliter le développement de nouveaux tests de MLVA (<http://bacterial-genotyping.igmors.u-psud.fr>) ou pour interroger les bases de données existantes

Méthodes



Vacuoles contenant *Coxiella* après coloration Gimenez

(<http://minisatellites.u-psud.fr>).

À ce jour, les données de MLVA pour *C. burnetii* sont dérivées d'un nombre limité de souches, notamment celles ayant servi à la mise au point de la méthode. À présent, de nombreux laboratoires sont intéressés par la mise en place de la méthode de MLVA afin de typer les souches de *C. burnetii* circulant dans un pays donné, dans un contexte normal mais aussi dans le cas d'épidémies (Chmielewski *et al.*, 2009; Klaassen *et al.*, 2009; Roest *et al.*, 2011). Cependant, un certain nombre d'incohérences ont été confirmées lors de la mise en œuvre de cette méthode, comme démontré par les résultats obtenus au travers d'une comparaison entre sept laboratoires européens (Sidi-Boumedine *et al.*, 2009b). Une première révision et des recommandations pour le génotypage de *C. burnetii* par MLVA seront donc diffusées prochainement (publication à venir). Brièvement, des améliorations importantes sont décrites concernant les incohérences dues à des erreurs typographiques, à l'utilisation de définitions ou nomenclature différentes, à la présence de séquence se chevauchant pour certains marqueurs VNTR et enfin au choix des motifs répétés.

Le génotypage des SNP par PCR en temps réel

Un nouveau test de génotypage des SNP par PCR en temps réel a été développé récemment (Huijsmans *et al.*, 2011). Un panel de dix SNP, sept situés sur des gènes mono-copie et trois situés sur le gène à copies multiples *IS1111*, a permis la distinction de neuf génotypes SNP parmi 28 souches de *C. burnetii*. Une bonne performance du typage des SNP a été constatée, bien que 14 types MLVA aient été décrits précédemment pour le même groupe d'isolats testés.

L'analyse des échantillons de l'épidémie néerlandaise a révélé la présence de trois et quatre génotypes distincts pour respectivement 14 patients humains et divers échantillons vétérinaires testés. Deux des génotypes identifiés dans les échantillons humains étaient aussi présents dans neuf fermes de la zone de l'épidémie. Ainsi, cette méthode a été utile pour établir un lien épidémiologique, montrant que de multiples souches de *C. burnetii*, d'origine animale, avaient infecté l'Homme dans l'épidémie néerlandaise de fièvre Q. En outre, cette méthode a l'avantage d'être rapide et appropriée pour le typage direct de *C. burnetii* à partir d'échantillons vétérinaires. Des recherches supplémentaires seront nécessaires pour permettre une

standardisation internationale et une comparaison des données de génotypage des différents utilisateurs.

Méthodes basées sur le séquençage

Le typage par séquençage d'un locus unique (SLST)

Plusieurs cibles, pour l'analyse spécifique d'un locus, ont été évaluées pour leur variabilité et leur utilité pour le typage de *C. burnetii*. La comparaison de séquences et/ou l'analyse par PCR-RFLP (analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction combinée à la PCR) de *com1* (qui code pour une protéine immunoréactive associée à la membrane externe) et de *mucZ* (qui confère la propriété mucoïde à la bactérie), rebaptisé *djIA* lorsque le génome complet de *C. burnetii* a été séquencé (Seshadri *et al.*, 2003), ont conduit à la séparation de 37 isolats de *C. burnetii* en cinq groupes *mucZ/com1* différents (Sekeyova *et al.*, 1999). Cette étude a montré des similitudes avec la classification de *C. burnetii* par ECP. Cependant, les groupes de souches étudiées n'étaient pas définis sur la base de leur origine géographique, probablement en raison de leur provenance d'Europe et essentiellement de France. Dans une autre étude, basée sur le séquençage de *com1*, 21 souches ont été séparées en quatre groupes différents et tous les isolats venant du Japon appartenaient au même groupe (Zhang *et al.*, 1997).

De plus, le séquençage du gène de l'isocitrate déshydrogénase (*icd*) a permis de différencier entre les isolats d'origines géographiques diverses et les propriétés phénotypiques (Nguyen et Hirai, 1999). Dix-neuf isolats ont pu être divisés en trois groupes: les isolats des cas aigus de fièvre Q, de tiques et de vaches étaient dans le groupe 1, alors que les isolats de patients avec une fièvre Q chronique et une souche prototype d'une chèvre avortée étaient respectivement dans les groupes 2 et 3. Dans cette même étude, l'analyse par PCR-RFLP a été développée pour la différenciation des isolats de *C. burnetii*. Dans une étude plus importante portant sur 72 isolats de sources diverses au Japon (Homme, bétail, chats, chiens et tiques), le séquençage et la PCR-RFLP des gènes *icd* et *com1* ont suggéré la présence d'isolats de *C. burnetii* spécifiques du Japon (Andoh *et al.*, 2004).

Le typage par séquençage multi-locus (MLST) et ses variantes

Le MLST est basé sur les séquences de fragments internes courts de plusieurs gènes dits de ménage, qui correspondent aux allèles de chaque locus, afin de définir des séquences types, (Maiden *et al.*, 1998). Le MLST cible les régions codantes et utilise des variations qui s'accumulent très lentement dans la population. C'est pourquoi le MLST est utilisé pour décrire la situation épidémiologique sur une longue échelle de temps et pour l'identification de lignages ayant une incidence marquée à provoquer une maladie.

Une variabilité faible a été retrouvée dans les gènes de ménage de *C. burnetii*. Aussi, la méthode de typage MST (Multispacer Sequence Typing: typage par séquençage de multiples régions intergéniques) a été décrite pour *C. burnetii* (Glazunova *et al.*, 2005). Le MST est une variante du MLST, basée sur l'étude de séquences de régions du génome entre deux cadres de lecture ouverts (ORF). Étant donné que les séquences intergéniques sont considérées comme potentiellement plus variables que celles des gènes codants, car soumises à une plus faible pression sélective, le MST cible les séquences de ces régions non-codantes plutôt que celles des gènes de ménage. Dans



Méthodes

ce travail, les auteurs ont testé 173 isolats de *C. burnetii* et 10 régions intergéniques variables ont été séquencées permettant la caractérisation de 34 types de séquence (ST) différents. Un site Internet mis à jour héberge les systèmes, les bases de données et les logiciels d'analyse, concernant le MSLT, qui ont été développés pour plusieurs micro-organismes (<http://pubmlst.org/>). De même, une base de données est disponible pour le MST de *C. burnetii* (<http://ifr48.timone.univ-mrs.fr>), où la détermination d'un type ST peut être réalisée par comparaison de séquence.

L'analyse phylogénétique déduite du typage MST a conduit à la caractérisation de trois groupes monophylétiques, qui ont pu être divisés en différents sous-groupes. Il est important de noter que les résultats entre le MST, les comparaisons de séquences *com1* et *djIA* et les types plasmidiques étaient concordants. Un lien a aussi été établi entre le type plasmidique, certains ST et le type de maladie. Une distribution géographique des isolats a été observée, mais certains types n'étaient pas délimités sur la base de l'origine géographique. Ceci est probablement dû à la circulation des patients, des animaux ou des tiques infectés, compliquant l'établissement de relations géographiques (Glazunova *et al.*, 2005).

Les méthodes basées sur l'hybridation

Avec l'accès aux séquences génomiques complètes d'une large variété d'espèces microbiennes, les analyses de génomes complets deviennent possibles par la technique des « microarray » ou puces à ADN permettant de passer au crible différentes souches de la même espèce. Une puce à ADN consiste en une collection de sondes d'ADN, dérivées de la séquence génomique disponible et fixées sur un support solide, contre lesquelles des acides nucléiques marqués sont hybridés. La présence ou l'absence de régions d'ADN du génome séquencé dans l'isolat analysé est étudiée en une seule réaction d'hybridation. Récemment, une méthode d'hybridation génomique comparative (CGH) utilisant des puces à ADN a été décrite pour *C. burnetii* (Beare *et al.*, 2006). L'ADN génomique de 24 isolats de *C. burnetii* d'origine géographique et de milieu variés a été hybridé à des puces à ADN comprenant des séries de sondes correspondant à tous les ORF de l'isolat Nine Mile de phase I. Il a été montré que le génome des 24 isolats de *C. burnetii* était très conservé, néanmoins 139 ORF étaient polymorphes, avec une délétion complète de l'ORF dans la plupart des cas. Vingt-cinq polymorphismes correspondaient à des délétions partielles d'ORF, des mutations ponctuelles ou de petites insertions à l'intérieur d'un ORF entraînant ainsi des signaux négatifs d'hybridation, et un petit nombre d'entre eux reliés à un effet fonctionnel potentiel. Ces polymorphismes des ORF pourraient contribuer aux propriétés biologiques des isolats telles que leur pouvoir pathogène. En ce qui concerne le génotypage, l'analyse par CGH a classé les 24 isolats en huit groupes. Les groupes génomiques I à IV ont montré une bonne concordance avec les groupes obtenus par REA. De plus, les arbres phylogénétiques ont suggéré une évolution divergente dans laquelle le groupe génomique I est l'ancêtre du groupe génomique III, et le groupe génomique III est l'ancêtre du groupe génomique II. Deux nouveaux groupes génomiques VII et VIII, ont été identifiés, comprenant quatre isolats précédemment non-groupables par REA. Enfin, les groupes génomiques IV, V, VI, VII et VIII constitueraient une lignée distincte des groupes génomiques I, II, et III.



Manipulation de *Coxiella* en L3

Conclusion et perspectives

Cette revue critique des méthodes de typage pour *C. burnetii* décrites dans la littérature est la première à comparer leur fiabilité pour des études épidémiologiques approfondies (Tableau 1, Figure 1). Cependant, cette revue souligne aussi que chaque méthode a été décrite en utilisant un nombre restreint de souches (Tableau 1). En outre, peu d'études ont été conçues pour comparer plusieurs méthodes sur un même panel de souches. Le prochain défi du génotypage de *C. burnetii* est de produire une large quantité d'informations conduisant à une meilleure compréhension de son épidémiologie. Ainsi, la génération d'un nombre maximum de marqueurs et l'évaluation de leur utilité pour des études épidémiologiques sont des étapes nécessaires au préalable. Les études futures doivent donc être conduites sur un échantillonnage plus large et bien défini, comprenant des souches de référence, pour établir les critères d'interprétation de ces méthodes de typage. Le choix de la méthode adéquate doit être déterminé par l'objectif pour lequel le génotypage est mis en œuvre (Foxman *et al.*, 2005). Les différents buts et applications des méthodes de typage bactérien sont fournis à titre d'illustration dans la Figure 1. Les niveaux de résolution offerts par les différentes méthodes produisent des données qui peuvent servir différents buts. En outre, les résultats du typage des souches doit être interprété dans le contexte de la situation épidémiologique ainsi que des caractéristiques de la bactérie. De façon inévitable, une seule méthode ne pourra être applicable à toutes les situations. À notre avis, les études futures devraient se concentrer sur l'utilisation des nouvelles techniques prometteuses comme la MLVA, le MST et le génotypage des SNP. Ces méthodes basées sur la PCR permettraient d'obtenir, rapidement et à un coût réduit, la détection et la caractérisation de *C. burnetii* à partir d'échantillons cliniques et environnementaux. Elles pourraient devenir couramment utilisées en routine pour fournir des données abondantes et comparables, si leur standardisation et leur harmonisation sont réalisées. En outre, afin d'identifier une méthode de référence pour une application épidémiologique donnée, il est nécessaire de mener des études comparatives qui comprennent différentes méthodes de typage utilisant le même groupe de souches, afin de pouvoir déterminer l'utilité ou non d'une méthode donnée. À ce jour, les problèmes auxquels nous sommes confrontés



Méthodes

sont de mieux comprendre les phénomènes de plasticité génomique des souches de *C. burnetii* isolées de sources environnementales, d'animaux ou de l'Homme et d'identifier la signification de cette variation génétique. L'utilisation du typage microbien par puce à ADN ou du séquençage de génomes complets permettrait de déchiffrer cette plasticité génomique des isolats de *C. burnetii* et à élucider son rôle dans la complexité de l'épidémiologie de la fièvre Q. Ces connaissances complémentaires amélioreront l'évaluation de la valeur des informations épidémiologiques pour les marqueurs et les méthodes génétiques.

Remerciements

Ce travail a été soutenu par le réseau d'excellence Med-Vet-Net à travers le *WorkPackage 25* sur la fièvre Q (www.medvetnet.org). Une partie du travail ayant pour but la conception et l'évaluation des outils de typage moléculaire de *C. burnetii* a été présentée à la Conférence scientifique annuelle de l'association Med-Vet-Net, Madrid, Espagne, 3-6 juin 2009 (Sidi-Boumedine *et al.*, 2009b).

Références bibliographiques

- Aarts, H.J., Boumedine, K.S., Nesme, X., Cloeckaert, A., 2001. Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria. *Vet. Res.* 32, 363-380.
- Andoh, M., Nagaoka, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 2004. Comparison of Japanese isolates of *C. burnetii* by PCR-RFLP and sequence analysis. *Microbiol. Immunol.* 48, 971-975.
- Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, C.C., Souriau, A., Meyer, H., Neubauer, H., Rodolakis, A., Vergnaud, G., 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC. Microbiol.* 6, 38.
- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet. Res.* 36, 327-349.
- Beare, P.A., Samuel, J.E., Howe, D., Virtaneva, K., Porcella, S.F., Heinzen, R.A., 2006. Genetic diversity of the Q fever agent, *C. burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J. Bacteriol.* 188, 2309-2324.
- Beare, P.A., Unsworth, N., Andoh, M., Voth, D.E., Omsland, A., Gilk, S.D., Williams, K.P., Sobral, B.W., Kupko, J.J., III, Porcella, S.F., Samuel, J.E., Heinzen, R.A., 2009. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect. Immun.* 77, 642-656.
- Boumedine, K.S., Rodolakis, A., 1998. AFLP allows the identification of genomic markers of ruminant *Chlamydia psittaci* strains useful for typing and epidemiological studies. *Res. Microbiol.* 149, 735-744.
- Chmielewski, T., Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Podsiadly, E., Thiery, R., Tylewska-Wierzbanowska, S., 2009. Molecular epidemiology of Q fever in Poland. *Pol. J. Microbiol.* 58, 9-13.
- Cloeckaert, A., Grayon, M., Grepinet, O., Boumedine, K.S., 2003. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes. Infect.* 5, 593-602.
- Cutler, S.J., Bouzid, M., Cutler, R.R., 2007. Q fever. *J. Infect.* 54, 313-318.
- Denison, A.M., Thompson, H.A., Massung, R.F., 2007. IS1111 insertion sequences of *C. burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *C. burnetii* isolates. *BMC. Microbiol.* 7, 91.
- European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on Q fever. Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). *EFSA Journal* 8, -114 p.
- Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J.S., Manning, S.D., Marrs, C.F., 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol. Perspect. Innov.* 2, 10.
- Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fournous, G., Tyczka, J., Tokarevich, N., Kovacova, E., Marrie, T.J., Raoult, D., 2005. *C. burnetii* genotyping. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1211-1217.
- Heinzen, R., Stiegler, G.L., Whiting, L.L., Schmitt, S.A., Mallavia, L.P., Frazier, M.E., 1990. Use of pulsed field gel electrophoresis to differentiate *C. burnetii* strains. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590, 504-513.
- Hendrix, L.R., Samuel, J.E., Mallavia, L.P., 1991. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *J. Gen. Microbiol.* 137, 269-276.
- Hilbink, F., Penrose, M., Kovacova, E., Kazar, J., 1993. Q fever is absent from New Zealand. *Int. J. Epidemiol.* 22, 945-949.
- Huijsmans, C.J., Schellekens, J.J., Wever, P.C., Toman, R., Savelkoul, P.H., Janse, I., Hermans, M.H., 2011. SNP-genotyping of a *Coxiella burnetii* outbreak in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* Published online ahead of print on 21 January 2011
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465-2466.
- Jager, C., Willems, H., Thiele, D., Baljer, G., 1998. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiol. Infect.* 120, 157-164.



Méthodes

Jager, C., Lautenschlager, S., Willems, H., Baljer, G., 2002. *Coxiella burnetii* plasmid types QpDG and QpH1 are closely related and likely identical. *Vet. Microbiol.* 89, 161-166.

Klaassen, C.H., Nabuurs-Franssen, M.H., Tilburg, J.J., Hamans, M.A., Horrevorts, A.M., 2009. Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 613-614.

Klee, S.R., Tyczka, J., Ellerbrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G., Appel, B., 2006. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *C. burnetii*. *BMC. Microbiol.* 6, 2.

Koch, A., Svendsen, C.B., Christensen, J.J., Bundgaard, H., Vindfeld, L., Christiansen, C.B., Kemp, M., Villumsen, S., 2010. Q fever in Greenland. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 511-513.

Lautenschlager, S., Willems, H., Jager, C., Baljer, G., 2000. Sequencing and characterization of the cryptic plasmid QpRS from *C. burnetii*. *Plasmid* 44, 85-88.

Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G., 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 3140-3145.

Maurin, M., Raoult, D., 1999. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 518-553.
Nguyen, S.V., Hirai, K., 1999. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 180, 249-254.

Ning, Z., Yu, S.R., Quan, Y.G., Xue, Z., 1992. Molecular characterization of cloned variants of *Coxiella burnetii* isolated in China. *Acta Virol.* 36, 173-183.

Olive, D.M., Bean, P., 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1661-1669.

Roest, H.I.J., Ruuls, R.C., Tilburg, J.J.H.C., Nabuurs-Franssen, M.H., Klaassen, C.H.W., Vellema, P., van den Brom, R., Dercksen, D., Wouda, W., Spierenburg, M.A.H., van der Spek, A.N., Buijs, R.M., Willemsen, T.J., Villumsen, S., Villumsen, S., van Zijderveld, F.G., 2011. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in the Dutch Q fever outbreak. *Emerging Infectious Diseases* 17, 668-675.

Rustscheff, S., Norlander, L., Macellaro, A., Sjostedt, A., Vene, S., Carlsson, M., 2000. A case of Q fever acquired in Sweden and isolation of the probable ethiological agent, *Coxiella burnetii* from an indigenous source. *Scand. J. Infect. Dis.* 32, 605-607.

Sekeyova, Z., Roux, V., Raoult, D., 1999. Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by *com1* and *mutZ* sequence comparison. *FEMS Microbiol. Lett.* 180, 61-67.

Seshadri, R., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Nelson, K.E., Nelson, W.C., Ward, N.L., Tettelin, H., Davidsen, T.M., Beanan, M.J., Deboy, R.T., Daugherty, S.C., Brinkac, L.M., Madupu, R., Dodson, R.J., Khouri, H.M., Lee, K.H., Carty, H.A., Scanlan, D., Heinzen, R.A., Thompson, H.A., Samuel, J.E., Fraser, C.M., Heidelberg, J.F., 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 5455-5460.

Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Fernandes, I., Marro, S., Thiery, R., 2009a. Evaluation of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for discrimination of *Coxiella burnetii* ruminant strains isolated in France. *Clin. Microbiol. Infect.* 15 Suppl 2:194-5. Epub 2009 May 2.

Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Rousset, E., Thiéry, R., 2009b. A multicentre MLVA and MST typing-ring trial for *C. burnetii* genotyping: An approach to standardisation of methods. 5th MedVetNet Annual Scientific Conference, Madrid (Espagne), 03-06 June 2009.

Sjostedt, A., Goransson, I., Macellaro, A., Norlander, L., 1998. Genotypic and phenotypic characterization of two Swedish isolates and two prototypic strains of *Coxiella burnetii*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 20, 165-172.

Stein, A., Raoult, D., 1993. Lack of pathotype specific gene in human *Coxiella burnetii* isolates. *Microb. Pathog.* 15, 177-185.

Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K., Homan, W.L., 2006. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 254, 268-274.

Thiele, D., Willems, H., Haas, M., Krauss, H., 1994. Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid QpH1 from *Coxiella burnetii*. *Eur. J. Epidemiol.* 10, 413-420.

Valkova, D., Kazar, J., 1995. A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever. *FEMS Microbiol. Lett.* 125, 275-280.

van Soolingen, D., 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Intern. Med.* 249, 1-26.

Vodkin, M.H., Williams, J.C., Stephenson, E.H., 1986. Genetic heterogeneity among isolates of *Coxiella burnetii*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 455-463.

Willems, H., Ritter, M., Jager, C., Thiele, D., 1997. Plasmid-homologous sequences in the chromosome of plasmidless *Coxiella burnetii* Scurry Q217. *J. Bacteriol.* 179, 3293-3297.

Woldehiwet, Z., 2004. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. *Res. Vet. Sci.* 77, 93-100.

Zhang, G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 1997. Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (*com1*) encoding a 27-kDa outer membrane protein. *Microbiol. Immunol.* 41, 871-877.