



HAL
open science

Etudes épidémiologique et phylogénétique chez *Bartonella henselae* par la technique MLVA

Rim Bouchouicha

► **To cite this version:**

Rim Bouchouicha. Etudes épidémiologique et phylogénétique chez *Bartonella henselae* par la technique MLVA. Biochimie, Biologie Moléculaire. AgroParisTech, 2010. Français. NNT : 2010AGPT0030 . pastel-00591060

HAL Id: pastel-00591060

<https://pastel.hal.science/pastel-00591060>

Submitted on 6 May 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

présentée et soutenue publiquement par

Rim BOUCHOUICHA

le 27 mai 2010

ETUDES EPIDEMIOLOGIQUE ET PHYLOGENETIQUE CHEZ *BARTONELLA HENSELAE* PAR LA TECHNIQUE MLVA

Directrice de thèse : Pr. **Nadia HADDAD**

Jury

M. Jacques GUILLOT, Pr, UMR BIPAR 956/ ENVA,/ANSES/Paris XII/USC INRA

Mme. Catherine DAUGA, Dr, Institut Pasteur, France

M. Yves RICHARD, Pr, VetAgro Sup, Lyon

Mme. Christine POURCEL, Dr, Unité de recherche, Paris IX

M. Durand BENOIT, Dr, Unité d'épidémiologie, ANSES

M. Henri-Jean BOULOUIS, Pr, UMR BIPAR 956/ ENVA/ ANSES/ Paris XII/ USC INRA

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

À la mémoire de mon grand père ...

RESUME

Dans le cadre de cette thèse, nous avons mis au point un outil de différenciation moléculaire performant, simple et transférable pour *Bartonella henselae*, basé sur la technique **MLVA**.

5 VNTR dits « principaux » ont été sélectionnés pour leur polymorphisme (BHVA- E). Ceci nous a permis d'évaluer la diversité des souches et/ou isolats de *B. henselae*. Avec ces 5 VNTR, et pour 178 isolats et/ou souches testés, un index de diversité de 0.98 et 99 profils ont été obtenus. Ces profils se répartissent en groupes A et B. Le groupe A n'inclut que des isolats félines, alors que le groupe B est constitué d'isolats félines, d'un isolat canin et de la totalité des isolats humains testés. Une étude réalisée sur des isolats de chats et de leurs propriétaires a montré que la technique MLVA est un outil efficace pour la traçabilité.

Les VNTR les moins polymorphes semblent pouvoir jouer le rôle de marqueur géographique, alors que pour les BHV les plus polymorphes, certains allèles sont particulièrement associés aux isolats humains. Aucun profil commun aux génotypes I et II n'a été rencontré. Nos observations suggèrent par ailleurs que tous les isolats du groupe B, c'est-à-dire les isolats de génotype I (d'origine humaine et féline) ainsi que tous les isolats humains appartenant à l'un ou l'autre des 2 génotypes, pourraient être dérivés d'isolats félines de génotype II (groupe A).

En outre, la technique MLVA s'est avérée capable de typer des « variants » de *B. henselae* issus de félidés sauvages.

La comparaison des performances de la technique MLVA *versus* les autres techniques déjà développées telles que ECP, MLST et MST, utilisant des souches communes, a montré que la technique MLVA est plus discriminante que l'ensemble de ces techniques et par ailleurs plus stable que l'ECP.

Enfin, nos résultats suggèrent que seul le groupe B serait zoonotique, et que parmi les 5 VNTR polymorphes intragéniques que nous avons utilisés, certains au moins joueraient un rôle dans le potentiel zoonotique, la persistance chez le chat et/ou la virulence pour l'Homme.

Mots clé: *Bartonella henselae*, Applications épidémiologiques, MLVA, VNTR, Phylogénie.

EPIDEMIOLOGIC AND PHYLOGENETIC STUDIES FOR *BARTONELLA HENSELAE* USING MLVA TECHNIQUE

The aim of this study was to develop a simple, highly efficient and transferable tool for *Bartonella henselae* typing, based on multiple Locus variable Number tandem repeat Analysis (MLVA).

Five “main” VNTRs were selected according to their polymorphism (BHV-A, B, C, D and E). Their combination allowed us to evaluate strain diversity and to establish the relationships between different strains of *Bartonella henselae*. When tested on 178 *B. henselae* isolates and strains, a diversity index of 0.98 and 99 profiles were obtained. MLVA profiles were grouped into 2 main groups named A and B. Group A was exclusively constituted by genotype II feline isolates. Group B included the other feline isolates, one dog isolate and the totality of human isolates (20 human isolates).

A study carried out on some cat isolates and their owners showed that MLVA is very efficient for traceability studies.

The less polymorphic VNTR seem to constitute geographic markers, while for the most polymorphic VNTR, some alleles were particularly associated to human isolates. There was no common profile between genotypes I and II. Our observations suggest that all group B isolates, i.e. all genotype I isolates (of human and feline origins) and all human isolates (belonging to both genotypes) could be phylogenetically derived from one sub-population of genotype II feline isolates (group A).

Moreover, MLVA was efficient for typing “variant” isolates of *Bartonella henselae* obtained from wild felids.

We compared MLVA performances with those of PFGE, MLST and MST. MLVA appears as the most discriminatory technique and is, in addition, more stable than PFGE.

Our data suggest that the group B could contain all zoonotic isolates and strains, and that among the 5 intragenic polymorphic VNTR used for MLVA, some of them at least could play a role in their zoonotic potential, in their persistence in cats, and/or in their virulence for humans.

Keywords: *Bartonella henselae*, Molecular epidemiology, MLVA, VNTR, Phylogeny.

REMERCIEMENTS

A ma directrice de thèse, **le professeur Nadia Haddad**, pour avoir encadré cette thèse, avec beaucoup de compétence et d'enthousiasme. Ses conseils avisés, son optimisme et la confiance qu'elle m'a accordée au cours de ces années m'ont permis d'effectuer une thèse dans de très agréables conditions de travail. Malgré ses diverses occupations entre autres, la charge énorme d'enseignement et sa participation à la direction de l'UMR en tant qu' adjointe, elle a également su rester disponible jusqu'à la fin. Qu'elle trouve ici une modeste expression de ma profonde gratitude.

Au **docteur Cathérine Dauga** et au **Professeur Yves Richard**, qui ont très aimablement accepté d'être les rapporteurs de mon travail.

Au professeur **Henri-Jean Boulouis**, pour avoir suivi mes travaux avec intérêt du début à la fin de cette thèse en acceptant d'être membre de ce jury de thèse.

Au professeur **Jacques Guillot**, pour l'intérêt qu'il a témoigné envers mon travail et qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse le jour de la soutenance.

Au docteur **Christine Pourcel** et au docteur **Benoit Durand** pour avoir suivi l'avancement de mes travaux de près avec un grand intérêt depuis la formation de mon comité de thèse jusqu'au jour de ma soutenance pour laquelle ils m'ont fait l'honneur d'accepter de se joindre à ce jury.

A l'**Ecole Doctorale ABIES- AgoParisTech** sans qui cette thèse n'aurait pas été possible.

Aux différents autres membres de l'équipe 890, en particulier,

A **Martine Monteil**, avec qui j'ai réalisé mes premières PCR, pour m'avoir encadrée techniquement et pour m'avoir conseillée avec patience et générosité. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A **Elisabeth Petit**, pour l'intérêt qu'elle portait à mon travail, son aide précieuse, sa gentillesse, son soutien et surtout pour tous les services rendus.

A **Mohamed Kasbari**, qui m'a ouvert avec une grande générosité la porte de son bureau afin de pouvoir rédiger ma thèse dans les meilleures conditions, pour sa précieuse aide scientifique, ses efforts de disponibilité, sa remarquable écoute et patience pendant ce deux dernières années de thèse, pour tous les moments agréables passés à discuter de tout autour d'un thé vert et pour la qualité de sa relation humaine. Qu'il trouve ici une modeste expression de mon profond respect et mes vifs remerciements.

A **Francis Biville**, pour m'avoir aidée dans mes choix professionnels et pour ses conseils précieux.

A **tous les stagiaires de l'équipe 890** que j'ai côtoyés pendant mes quatre années de thèse que je cite sans ordre de préférence : **Moez Berrich**, **Vanessa**, **Mariane** , **Fatah Cheklat**, pour leur aide précieuse et les moments agréables qu'on a passés ensemble.

A **Naouelle Azzag**, avec qui j'ai passé des moments agréables et qui est toujours prête à parler VNTR, pour son amitié et pour son soutien moral constant.

A **Corinne et Christelle**, avec qui j'ai passé des matinées entières à identifier les bactéries, pour m'avoir initié aux techniques de diagnostic en bactériologie et pour leur patience.

A **tous les membres de l'UMR BIPAR, en particulier,**

Au **Docteur Pascal Boireau et au Professeur Jacques Guillot**, pour m'avoir accueilli dans l'UMR BIPAR dont ils furent les directeurs successifs au cours de ces quatre années de la thèse.

A **Hélène, Dany, Madeleine, Danielle, Evelyne, Myriam, Martine**, pour leur bonne humeur et leur sourire.

A **Catherine Perret**, avec qui j'ai partagé le bureau pour sa gentillesse et son soutien moral.

A **tous les autres thésards et stagiaires de l'UMR BIPAR** que j'ai connus, pendant les quatre années et que je cite pêle-mêle : **Adélaïde, Ayman, Simon, Alexander, Nicola, Assuza, Violaine...**

A **tous les collaborateurs internationaux**, pour la fourniture de l'ADN des souches et pour les échanges scientifiques fructueux.

A **mes parents**, pour leur soutien, leur encouragement, leur confiance, leurs sacrifices et leurs souffrances en silence toutes ces longues années. Je vous remercie pour ce que vous êtes: des parents extraordinaires. Trouvez ici un modeste hommage. Ce travail est avant tout pour vous.

A **mes grands parents paternels**, pour leur soutien et qui, je pense auraient été fiers de leur petite-fille.

A **ma grande mère maternelle**, partie un mois et demi avant ma soutenance que je n'ai pas pu revoir, comme prévu. Mais, vous resterez dans ma mémoire.

A mon oncle **Adel** et **sa famille**, pour ses encouragements et ses soutiens.

A ma **sœur** , bien aimée **Hajer**, qui m'a accompagné pendant toutes mes études universitaires, pour m'avoir donné tous les moyens nécessaires pour en

Arriver là et pour son soutien et ses encouragements constants.

A toutes mes sœurs, **Faten, Afef et Nahed** pour leur affection, leur assistance, leur complicité, leur amitié de tous les instants.

A mon petit frère **Med Rami** et sa femme **Yamina**, pour leur confiance et leurs encouragements.

A tous ceux que j'ai oubliés et qui ne méritent pas de l'être...

A celui qui me protège et qui guide mes pas : un grand Merci

TABLE DE MATIERE

REMERCIEMENTS	1
TABLE DE MATIERE	5
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES ABRIVIATIONS	13
INTRODUCTION	14
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	16
I. Données bibliographiques <i>B.henselae</i>	17
A. Aspects bactériologiques	18
B. Aspects taxonomiques	19
C. Génome de <i>B. henselae</i>	23
D. Facteurs de virulence chez <i>B. henselae</i>	23
E. Aspects cliniques.....	26
E.1. Formes cliniques chez l'Homme	26
E.2. Les pathologies animales	34
E.2.1. Chez le chat.....	34
E.2.2. Chez le chien.....	37
E.2.3. Infection à <i>B.henselae</i> chez d'autres espèces animales	40
F. Aspects épidémiologiques de l'infection par <i>B.henselae</i>	41
F.1. Étude de prévalence de l'infection par <i>B.henselae</i> chez le chat par zone géographique.....	41
F.2. Modes et voies de transmission.....	46
F.3. Facteurs favorisant la transmission.....	47
F.4. Facteurs de la gravité de la maladie chez l'Homme	49
G. Aspects synthétiques : cycle de <i>B.henselae</i>	51
H. Diagnostic	52
I. Traitement	56
J. Prévention.....	57
II. Typage moléculaire des bactéries : Cas de <i>B.henselae</i>	58

A. Critères de choix d'une technique de typage moléculaire	59
B. Catégories de méthode	61
B.1. Méthodes de première génération	62
B.2. Méthodes de deuxième génération.....	64
C. Comparaison de techniques	73
D. VNTR et leur évolution	73
D.1. VNTR et la technique MLVA.....	73
D.2 .Evolution des VNTR	79
D.2.1. Structure des populations bactériennes et concept de clonalité	79
D.2.2. Mécanismes de changement du nombre de répétitions et Conséquences	82
D.2.3. Rôle des VNTR dans les phénomènes adaptatifs et dans la virulence bactérienne	84
ETUDE EXPERIMENTALE	91
Chapitre I : Développement de la technique MLVA.....	92
I.Etape I : Développement initial	92
A. Matériel biologique	93
B. Méthodes	93
B.1.Identification des répétitions en tandem.....	93
B.2. Recherche des amorces.....	96
B.3. Culture des souches et extraction d'ADN	97
B.4. Amplification des répétitions en tandem par PCR.....	97
B.5. Électrophorèse et révélation	97
B.6. Stabilité de la méthode	97
B.7. Calcul du nombre des U.B.....	98
C. Résultats	98
C.1. Sélection des amorces (BHV).....	98
C.2. Comparaison MLVA-MLST.....	99
C.3. Choix du programme de PCR.....	99
C.4. Étude de la stabilité	103
C.5. Localisation des séquences sélectionnées sur le génome.....	104
D. Discussion et conclusion	104
II. Étape II : Développement complémentaire	114
A. Matériel Biologique.....	114

B. Méthodes	114
B.1. Changement de critères de sélection.....	114
B.2. Sélection des amorces et du programme PCR	115
C. Résultats	116
D. Discussion et conclusion	117
E. Bilan et conclusion sur la mise au point de la technique MLVA	118
Chapitre II : Comparaison de la technique MLVA vs ECP, MLST et MST	119
I. Comparaison des performances de MLVA vs ECP, MLST et MST	119
A. Matériel biologique	119
B. Méthodes	121
C. Résultats	123
C.1. Comparaison MLVA-ECP.....	123
C.2. Comparaison MLVA-MLST.....	129
C.3. Comparaison MLVA-MST.....	131
D. Discussion et conclusion	132
II. Validation des groupes MLVA par les autres techniques	135
A. Résultats	135
A.1. Correspondance entre les groupes et les sous groupes de MLVA avec les lignages et les clusters obtenus par MLST et MST.....	135
A.2. Correspondance entre MLVA et MLST	137
B. Discussion.....	137
Chapitre III : Applications épidémiologiques	142
I. Étude de la diversité chez <i>B. henselae</i> : Félidés domestiques, Souches humaines et canine.....	142
A. Matériel biologique	142
B. Méthodes	142
B.1. Calcul de l'index de diversité (I.D.)	142
B.2. Élaboration des arbres.....	143
C. Résultats	143
C.1. Étude de la diversité.....	143
C.1.1. Étude globale de la diversité.....	143
C.1.2. Diversité en fonction du génotype 16Sr DNA.....	144
C.1.3. Diversité en fonction de l'origine géographique	145
C.1.4. Diversité en fonction de l'hôte.....	146

C.2. Étude de la relation entre les isolats/souches testés	147
D. Discussion et conclusion	149
II. Étude de la traçabilité	151
A. Matériel biologique	152
B. Résultats	152
C. Discussion et conclusion	153
III. Étude des isolats/souches issus de félidés sauvages	160
A. Matériels biologiques	160
B. Méthodes	160
C. Résultats	161
C.1. Étude de la diversité	161
C.2. Étude de la relation entre les isolats de félidés sauvages	163
C.3. Étude de la relation entre les isolats/souches de félidés sauvages, domestiques et les humains	164
D. Discussion et conclusion	166
Chapitre IV : VNTR et pouvoir zoonotique	168
I. Exploitation des données de typage pour les 178 isolats avec VNTR	168
A. Etude de la relation entre taille VNTR et pouvoir zoonotique	168
B. Discussion	170
II. Recherche de nouveaux VNTR polymorphes dans des gènes de virulence connus	172
A. Matériel	173
B. Méthodes	173
C. Résultats	173
B. Discussion	175
DISCUSSION GENERALE	176
CONCLUSIONS GENERALE ET PERSPECTIVES	183
REFERENCES	187
ANNEXES	218

LISTE DES TABLEAUX

De l'étude bibliographique

Tableau 1 : Aspects cliniques des infections à Bartonella chez l'Homme et le chien	38
Tableau 2 : Etudes de prévalence de l'infection féline par <i>B. henselae</i> en Afrique	42
Tableau 3 : Etudes de prévalence de l'infection féline par <i>B. henselae</i> en Amérique	42
Tableau 4 : Etudes de prévalence de l'infection féline par <i>B. henselae</i> en Australie et en Asie	43
Tableau 5 : Etudes de prévalence de l'infection féline par <i>B. henselae</i> en Europe du nord	44
Tableau 6 : Etudes de prévalence de l'infection féline par <i>B. henselae</i> en Europe centrale	44
Tableau 7 : Etudes de prévalence de l'infection féline par <i>B. henselae</i> en Europe du sud.....	45
Tableau 8 : Etudes de prévalence de l'infection féline par <i>B. henselae</i> en Europe de l'ouest	45
Tableau 9 : Recommandations proposées pour l'interprétation épidémiologique des profils ECP	63
Tableau 10 : Comparaison de performances de techniques de typage déjà développées	73
Tableau 11 : Tableau récapitulatif des micro-organismes (Bactéries et agents de mycoses (1,2,3), typés par MLVA)	78
Tableau 12 : Séquences répétées de type minisatellites codant pour des protéines à fonction connue	89
Tableau 13 : Séquences répétées de type microsateellites codant pour des protéines à fonction connue	90

De l'étude expérimentale :

Chapitre I :

Tableau 1 : Caractéristiques de 6 souches de la mise au point.....	93
Tableau 2 : Caractéristiques de 30 séquences répétées retenues et leurs amorces correspondantes lors du développement initial	101
Tableau 3 : Caractéristiques de 11 BHV retenus.....	103

Tableau 4 : Liste des isolats utilisés lors du développement complémentaire 114

Tableau 5 : Caractéristiques de nouvelles séquences et leurs amorces) 116

Chapitre II :

Tableau 1 : Caractéristiques de souches communes à comparer avec MLVA.....120

Tableau 2 : Caractéristiques des isolats à comparer avec MLSTN121

Tableau 3 : Caractéristiques des sites de polymorphisme des gènes de *B.henselae* utilisés dans la technique MLST 123

Tableau 4 : Comparaison de profils MLVA-ECP 125

Tableau 5 : Comparaison de profils MLVA-ECP 126

Tableau 6 : Comparaison de profils MLVA-ECP) 127

Tableau 7 : Comparaison de profils MLVA-ECP 128

Tableau 8 : Comparaison MLVA-ECP..... 129

Tableau 9 : Comparaison de profils MLVA-MLST 130

Tableau 10 : Comparaison MLVA-MLST 131

Tableau 11 : Comparaison de profils MLVA-MST 132

Tableau 12 : Correspondances entre les groupes et les sous groupes formés par MLVA avec les lignages et les clusters obtenus respectivement par MLST et MST)..... 136

Chapitre III :

Tableau 1 : Etude de la diversité en fonction de génotype (I/II) des isolats 145

Tableau 2 : Etude de la diversité en fonction de l'origine géographique des isolats..... 145

Tableau 3 : Etude de la diversité en fonction de l'hôte (Chat/Homme) 147

Tableau 4 : Profils MLVA de 4 paires (Homme,/Chat) et d' un groupe formé d'un Homme et ses 7 chats..... 153

Tableau 5 : Profils MLVA des isolats issus de félinés sauvages 162

Tableau 6 : Etude de la diversité en fonction de l'hôte 162

Chapitre VI

Tableau 1 : Caractéristiques des répétitions des VNTR A à E des groupes A et B de *B.henselae* 169

Tableau 2 : Caractéristiques des VNTR localisés dans les gènes *trw* et dans les gènes codant pour la tête de *BadA*..... 174

LISTE DES FIGURES

De l'étude bibliographique :

Figure 1 : Aspect de colonies de <i>B. henselae</i> à balayage).....	19
Figure 2 <i>B. henselae</i> en microscopie.....	19
Figure 3 : Comparaison des arbres phylogénétiques du genre <i>Bartonella</i> basée sur les séquences partielles ou complètes de : <i>gltA</i> , <i>rpoB</i> , <i>groEL</i> , ITS 16S rRNA et <i>ftsZ</i>	21
Figure 4 : Arbre phylogénétique de 19 espèces de Bartonelles basée sur le gène ARN 16S	22
Figure 5 : Génome de <i>B. henselae</i>	23
Figure 6 : (A&B): Photos illustrant des cas typiques de MGC montrant des Adénopathies	28
Figure 7 : Chorioretinite provoqué par <i>B. henselae</i> chez un enfant.....	30
Figure 8 : Photos illustrant quelques cas d'angiomatose bacillaire	33
Figure 9 : Taux de bactériémie chez des chats SPF inoculés expérimentalement par une souche féline de <i>B. henselae</i>	36
Figure 10 : Taux de bactériémie chez des groupes de chats inoculés par la souche, F1 après plusieurs passages	37
Figure 11 : Photo prise chez un chien souffrant d'endocardite.....	39
Figure 12 : Prévalence de l'infection humaine par <i>B. henselae</i> dans les différentes régions d'Amérique du nord.....	49
Figure 13 : Distribution des formes typiques et atypiques de la MCG réalisée chez 846 patients en fonction de l'âge.....	50
Figure 14 : Cycle de transmission de <i>Bartonella henselae</i>	51
Figure 15 : Principe de la technique MLVA.....	76
Figure 16 : Classification de la population bactérienne	
Figure 17 : Représentation schématique du mécanisme de glissement (SSM) lors de la réplication.....	84

De l'étude expérimentale**Chapitre I :**

Figure 1 : Interface du logiciel montrant le formulaire de choix de critère.....	94
---	----

Figure 2 : Exemple des résultats montrant les caractéristiques des séquences répétée selon les critères choisis	95
Figure 3 : Choix de la Taq Polymérase : Exemple : VNTR 10 et 22	100
Figure 4 : Exemples de BHV monomorphe BHV14, dimorphes BHV15&13 et polymorphes BHV26.....	102
Figure 5 : Localisation génomique de 30 premières séquences répétées (VNTR) chez <i>B.henselae</i>	104
Figure 6 : Localisation des séquences retenues lors de développement initial	115
 <u>Chapitre II :</u>	
Figure 1 : Validation de groupe A et B de MLVA (par MLST)	137
 <u>Chapitre III :</u>	
Figure 1 : Minimum Spaning Tree montrant les groupes et les sous groupes	148
Figure 2 : Dendrogramme englobant les isolats/souches de <i>B.henselae</i> issus de chats, hommes, chiens présentant 99 profils	159
Figure 3 : Dendrogramme montrant la relation entre les différents isolats sauvages	163
Figure 4 : Dendrogramme montrant la relation entre les chats, hommes, chien et félidés sauvages.....	165

LISTE DES ABRIVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Arp	Acidic repeat protein
B.h	<i>Bartonella henselae</i>
BHV	<i>Bartonella henselae</i> VNTR
B	Bactériologie
ECP	Electrophorèse en Champs Pulsés
ERIC	Enterobacterial Repetition Intergenic Consensus
I.D.	Index de diversité
IFI	ImmunoFluorescence Indirecte
IOPS	Indèmne d'Organismes Pathogènes Spécifiques
ITS	Internal Trascripted Spacer
Kb	Kilobase
MCG	Maladie des Griffes du Chat
MLST	Multilocus Sequence Typing
MLVA	Multilocus VNTR Analysis
MST	Minimum Spaning Tree
MST	MultispacerTyping
NJ	Neigbor-Joining
Pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
REP	Repetitive Extragenic Palindromic Sequences
RFLP	Restriction Frangment Length Polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Short Sequence Repeat Tandem Repeats Finder
ST	Sequence Typing
S	Sérologie
TRF	Tandem Repeats Finder
T4SSs	Système de Sécretion Type 4
U.B	Unité de Base
VNTR	Variable Number Tandem Repeats

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'avènement de diverses méthodes de biologie moléculaire (PCR, séquençage...) ainsi que des outils de la bioinformatique a permis aux microbiologistes d'étudier de façon plus approfondie le génome des organismes vivants et sa plasticité. Ce couplage entre ces deux disciplines semble être devenu nécessaire et indissociable. La mise à portée de nombreux laboratoires des outils du typage moléculaire et leur diversification a notamment résulté de la nécessité d'adapter les techniques existantes aux particularités génétiques des micro-organismes étudiés. Les nouvelles techniques de génomique présentent en effet l'avantage de permettre l'étude du génome et non pas de ses produits d'expression et sont donc, contrairement au phénotypage, indépendantes des conditions de culture et, parfois, de la culture même de certains micro-organismes qui sont difficilement cultivables (durée de culture relativement longue), voire non cultivables. La mise au point raisonnée de logiciels adaptés aux questions biologiques a rendu possible l'exploitation de la masse d'informations complexes qui en a résulté.

L'avènement des techniques moléculaire a ainsi fortement contribué à rendre possible l'étude de la diversité de nombreux agents bactériens, notamment *Bartonella henselae*.

B. henselae est une bactérie émergente, zoonotique, agent de la maladie des griffes du chat (MCG), mais pouvant occasionner des manifestations plus graves comme l'angiomatose et le péliose bacillaires. Cette bactérie de culture difficile a le chat comme réservoir, généralement porteur asymptomatique. Le contact avec les chats, en particulier par griffure, constitue un facteur de risque majeur d'infection humaine.

La présente thèse a pour objet de développer un outil de typage moléculaire, la technique MLVA (Multi-Locus VNTR Analysis) basée sur des séquences répétées en tandem de type VNTR (Variable-Number Tandem-Repeats) afin d'étudier d'une d'autre part, de comprendre le rôle de ces structures dans le pouvoir zoonotique et/ou la virulence.

Dans la première partie, nous avons synthétisé les principales données bibliographiques relatives à la bactérie et à ses facteurs de virulence, aux manifestations cliniques qu'elle peut occasionner chez les espèces sensibles, et en particulier l'Homme, et à son épidémiologie. Puis nous nous sommes intéressés aux mécanismes de variation de taille des VNTR et au rôle susceptible d'être joué par ces structures dans les phénomènes adaptatifs et la virulence, en particulier pour ce qui concerne les bactéries pathogènes.

Notre partie expérimentale est subdivisée en quatre chapitres.

Le premier est consacré aux deux étapes de la mise au point de la technique MLVA.

Le second chapitre décrit les différentes applications épidémiologiques que nous avons mises en œuvre, en particulier l'étude de la diversité et des relations qui pourraient exister entre les souches/isolats de *B. henselae* provenant de chats, d'humains et de félinés sauvages provenant de différentes régions du monde, et d'autre part, son utilisation à des fins de traçabilité.

Dans le troisième chapitre, nous avons essayé de comparer les performances de la technique MLVA avec celles des autres techniques moléculaires déjà développées chez cette espèce, puis d'évaluer la validité de la technique MLVA pour des études phylogénétiques par rapport à la technique MLST, considérée comme technique de référence pour la phylogénie.

Enfin, nous avons abordé dans le quatrième et dernier chapitre, l'exploration du rôle biologique susceptible d'être joué par les VNTR chez *B. henselae*, en particulier au travers du lien pouvant exister entre l'évolution du nombre d'unités de base et le pouvoir zoonotique et/ou la virulence.



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Données bibliographiques sur *B. henselae*

A. Aspects bactériologiques

Les bartonelles sont des bactéries de connaissance ancienne. La première espèce identifiée, *Bartonella bacilliformis*, a été décrite microscopiquement en 1909 par le médecin péruvien Alberto Barton (Barton *et al.*, 1909) et cultivée en 1926 par Noguchi Battisti (Noguchi *et al.*, 1926). Les bactéries du genre *Bartonella*, dont *B. henselae*, sont des petits bacilles ou des coccobacilles, parfois légèrement incurvés (environ 0.5 à 0.6 μm de diamètre sur 1 à 2 μm de longueur), non acido-alcool-résistants, aérobies, Gram négatif, oxydase et catalase négatives (*B. henselae* est faiblement catalase positive), nitrate-réductase, indole et uréase négatives (Slater *et al.*, 1990 ; Regnery *et al.*, 1992 ; Welch *et al.*, 1991). Elles sont incapables d'oxyder le glucose pour la fourniture de leurs besoins énergétiques mais elles utilisent le glutamate et le succinate comme source de carbone. La culture de ces bartonelles, entre autres *B. henselae*, est laborieuse et très difficile (La Scola and Raoult, 1999). Les conditions optimales de culture valables pour la plupart des espèces sont réalisées par l'ensemencement de milieux enrichis avec du sang (5 pour cent de sang défibriné de mouton, de lapin ou de cheval), à l'exception de *B. quintana* et *B. koehlerae* qui préfèrent la gélose chocolat en primo-culture (Heller *et al.*, 1999 ; Birtles *et al.*, 1993). Les bartonelles poussent mieux sur le sang frais de lapin ou de cheval que sur celui de mouton. Sur gélose au sang cuit, incubée à une température comprise entre 35 et 37°C, dans une chambre à teneur d'humidité élevée et en présence de 5% de CO₂ (à l'exception de *B. bacilliformis* qui croît à 28-30°C sans nécessiter de CO₂), les colonies apparaissent généralement après environ 8 jours mais parfois seulement après de nombreuses semaines. Dans ces conditions, on obtient sur gélose des colonies sèches, ayant un aspect en chou-fleur, de petite taille, grisâtres, dont certaines sont rugueuses et adhérentes sur la gélose (cf. **Figure 1 & 2**). Certaines bartonelles possèdent des flagelles unipolaires comme *B. bacilloformis*, *B. clarridgeiae*, *B. chomelii* et *B. capreoli* (Droz *et al.*, 1999). Suite à plusieurs repiquages, certaines bactéries peuvent perdre leurs flagelles et se cultivent plus rapidement (minimum 5 jours) ; les colonies deviennent lisses,

brillantes et moins adhérentes sur la gélose. Des milieux de culture liquides, relativement complexes, ont permis d'étudier plus précisément le métabolisme de *Bartonella*, mettant en évidence une activité faible sur les carbohydrates (Chenoweth *et al.*, 2004).

Parmi les difficultés classiquement rencontrées lors de la culture de ces bactéries, figure le développement de contaminants sur la gélose, favorisé par la lenteur de la culture de ces bactéries (de 5 jours à plusieurs semaines). Ceci pourrait expliquer également la description tardive de bon nombre de ces espèces. Dans le but d'étudier la taxonomie des bartonelles et la position phylogénétique de diverses souches, de nombreuses techniques de biologie moléculaire ont été développées qui seront évoquées dans le paragraphe suivant.

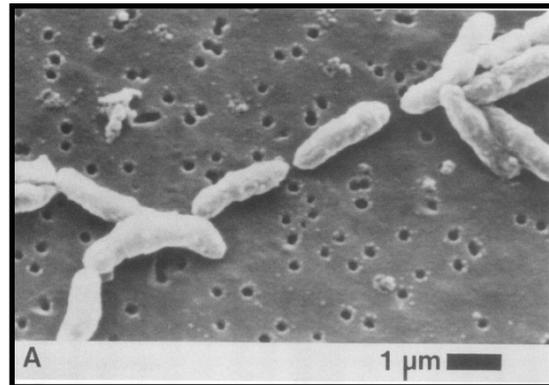


Figure 1: Aspect de colonies de *B.henselae* **Figure 2:** *B.henselae* en microscopie à balayage

B. Aspects taxonomiques :

Les bartonelles font partie des α -Protéobactéries et sont biologiquement et génétiquement proches des genres *Rickettsia* et *Brucella*. Ce n'est qu'en 1993 que Brenner *et al* ont pu, en se basant sur la comparaison des séquences de l'ARN 16S et l'hybridation ADN-ADN, unifier les genres *Bartonella*, représenté par *B. bacilliformis*, et *Rochalimaea* constitué par *R. henselae*, *R. quintana*, *R. vinsonii* et *R. elizabethae* (Brenner *et al.*, 1993). En 1995, les espèces appartenant au genre *Grahamella* (*G. talpae*, *G. grahamii*, *G.taylori*, *G. peromysci* et *G. doshiae*) ont été affiliées au genre *Bartonella* au vu de la

similarité (98.5%) de leur séquence 16S rRNA avec celle de *Bartonella bacilliformis* (Birtles *et al.*, 1995).

Pour l'identification et la description des *Bartonella*, divers gènes ou portions de gènes ont été étudiés et amplifiés. On peut notamment citer les gènes codant l'acide ribonucléique ribosomal 16S (ou 16rRNA) (Pitulle *et al.*, 2002 ; Matar *et al.*, 1999), les gènes codant l'extrémité 3' du gène de la citrate synthase (*gltA*) (Birtles *et al.*, 1996, Norman *et al.*, 1995), la riboflavine synthase (*ribC*) (Bereswill *et al.*, 1999), la protéine de choc thermique de 60 kDa (GroEL) (Zeaiter *et al.*, 2002), la protéine de division cellulaire (*ftsZ*) (Zeaiter *et al.*, 2002 ; Kelly *et al.*, 1998), la protéine 17kDa (Swurger *et al.*, 2000), la flagelline Fla (Sander *et al.*, 2000), la protéine de choc thermique HtrA (Anderson *et al.*, 1997), l'endoribonucléase B (RpoB) (Pitulle *et al.*, 2002) et le fragment intergénique 16S-23S rRNA ou ITS pour Internal Transcribed Spacer (Birtles *et al.*, 2000).

Chez les bactéries en général, la séquence de 16S rDNA est l'un des outils les plus souvent utilisés et est considérée comme l'une des plus informatives dans les études phylogénétiques (Olsen and Woese, 1993). Cette séquence a aussi été la première étudiée chez les bartonelles. Mais, certains auteurs ne la considèrent pas comme un outil efficace pour distinguer entre elles certaines espèces de bartonelles (Fox *et al.*, 1992 ; Hasegawa and Hashimoto, 1993 ; Teichmann and Mitchison, 1999). Pour résoudre cette difficulté, certains auteurs ont proposé d'autres gènes, les plus utilisés étant *gltA* et *groEL*, qui permettent d'avoir de meilleures valeurs de « bootstrap » au niveau des nœuds par rapport à ceux obtenus en se basant sur la séquence de 16S rDNA. En se basant sur d'autres séquences, les résultats ne sont pas pleinement concordants (**cf. figure 3**), comme le soulignent Marston *et al.*, (1999) et Birtles *et al.*, (1996), ce qui peut poser des problèmes d'interprétation et suggère des phénomènes anciens de recombinaison. Plus récemment, Pitulle *et al.*, (2002) ainsi que La Scola *et al.*, 2003 ont montré l'intérêt de la combinaison de plusieurs gènes afin de bien étudier les relations phylogénétiques. Le genre *Bartonella* comporte actuellement 25 espèces et sous espèces validés

présentant entre elles une forte homologie de séquence, dont 12 sont pathogènes pour l'Homme et/ ou pour l'animal (**cf. figure 4 et annexe 1**).

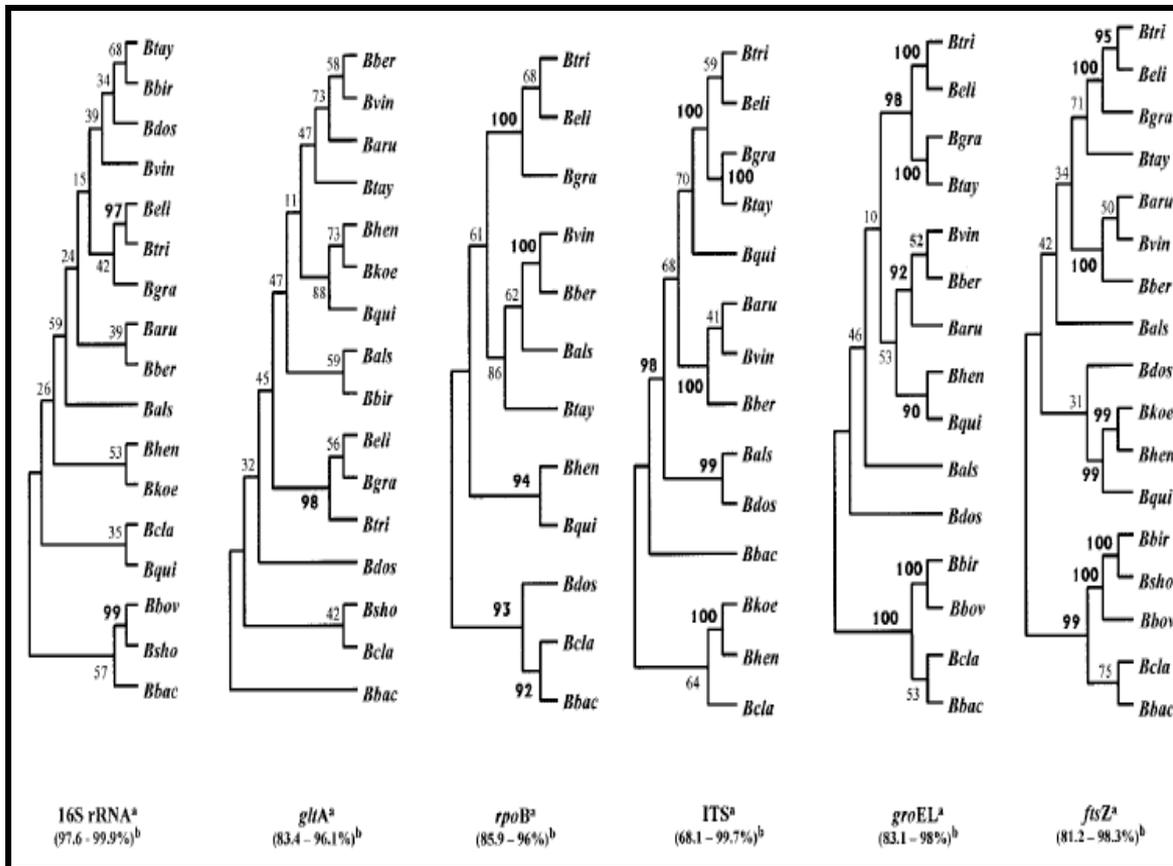


Figure 3: Comparaison des arbres phylogénétiques du genre *Bartonella* basée sur les séquences partielles ou complètes de *gltA*, *rpoB*, *groEL*, *ITS*, *16S rRNA* et *ftsZ*.

ber, *vinsonii* subsp. *berkhoffii*; *vin*, *vinsonii* subsp. *vinsonii*; *aru*, *vinsonii* subsp. *arupensis*; *tri*, *tribocorum*; *eli*, *elizabethae*; *gra*, *grahamii*; *tay*, *taylorii*; *als*, *alsatica*; *dos*, *doshiae*; *hen*, *henselae*; *qui*, *quintana*; *koe*, *koehlerae*; *cla*, *clarridgeiae*; *bir*, *birtlesii*; *sho*, *schoenbuchensis*; *bac*, *bacilliformis*; *bov*, *bovis*, (Zeiter et al., 2002)

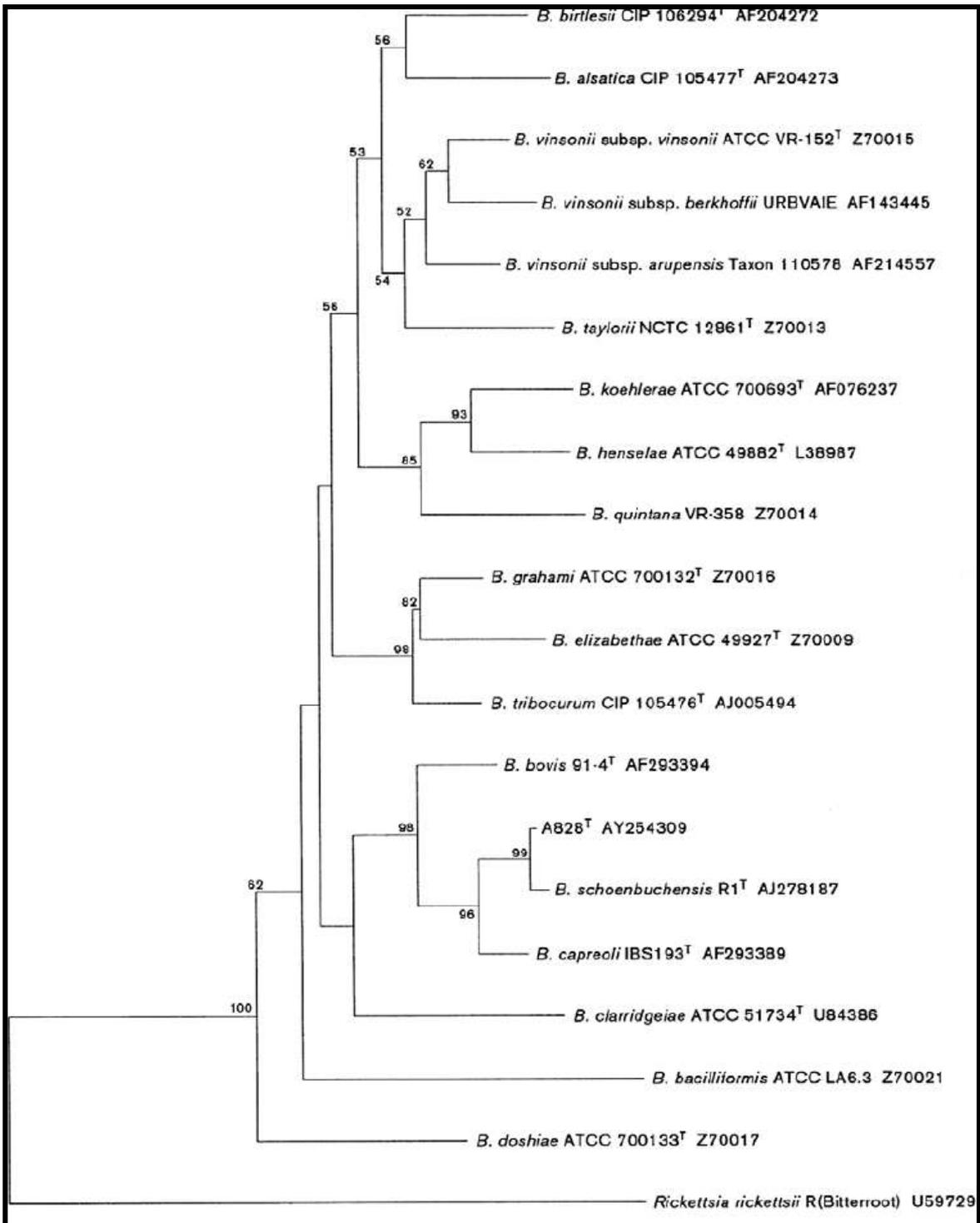


Figure 4 : Arbre phylogénétique de 19 espèces du genre *Bartonella*, basé sur le gène ARN 16S (Boulouis *et al.*, 2007)

C. Génome de *Bartonella henselae* :

A ce jour, 5 espèces de Bartonelles ont été entièrement séquencées : *B. quintana* (2005), *B. henselae* (2005); *B. bacilliformis* (2007). *B. tribocorum* (2007) et *B. grahamii* (2009) et une espèce en cours du séquençage : *B. birtelsii*.

Pour *B. henselae*, seul le génotype Houston I a été a été séquencé. Son génome de 1.9 MB se présente sous forme d'ADN circulaire contenant 1665 gènes qui codent pour 1488 protéines et 124 pseudogènes. Son G+C% est de 38(cf.figure 5).

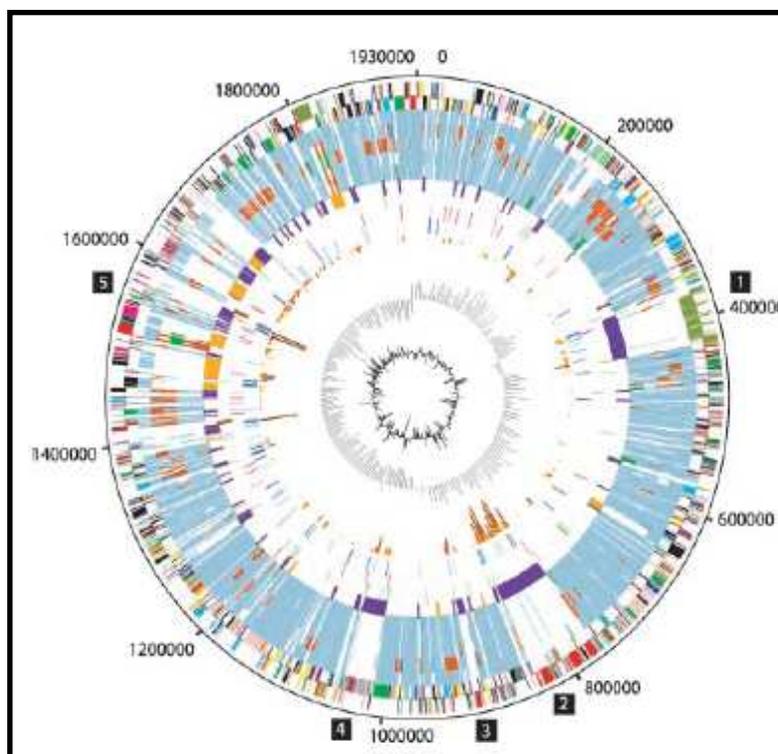


Figure 5 : Génome de *B. henselae*

D. Facteurs de virulence chez *B. henselae* :

B. henselae est caractérisée d'une part par sa capacité à induire une bactériémie intra-érythrocytaire au long cours chez son hôte réservoir mammifère, le chat (Kordick & Breitschwerdt, 1997), et d'autre part, par son aptitude à coloniser les cellules endothéliales de plusieurs organes en induisant un phénomène de prolifération vasculaire. Ces deux mécanismes font intervenir divers facteurs de virulence qui ne sont pas tous identifiés avec certitude. Dans

cette partie, je vais me focaliser sur les facteurs les plus connus et sur ceux dont la participation à la virulence est fortement suspectée.

D.1. Bad A (Bartonella adhesin A) :

La protéine Bad A (340kD) est localisée dans la membrane externe de *B. henselae*. Cette protéine est une adhésine, appartenant à la classe des autotransporteurs trimériques (TAAs). Elle module l'adhérence de *B. henselae* à des protéines de la matrice extracellulaire et à des protéines membranaires des cellules endothéliales *via* les β 1 intégrines. Elle joue également un rôle dans la vasoprolifération, en activant le facteur HIF-1 (Hypoxia inducible facteur -1) qui est un facteur clé de transcription de l'angiogenèse, et la sécrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). (Reis *et al.*, 2004, Reis *et al.*, 2007, Szczesny *et al.*, 2008). Cette protéine est exprimée pendant les infections par *B. henselae*. La structure de la protéine Bad A est similaire à celle des autres protéines trouvées chez d'autres bactéries appartenant à la classe des autotransporteurs tels que Yad A (pour *Yersinia enterocolitica*) (Cover *et al.*, 1989; Bolin *et al.*, 1982), Nad A (pour *Neisseria meningitidis*) (Commnducci *et al.*, 2002), Hia et Hsf (pour *Haemophilus influenzae*) (Cotter *et al.*, 2005).

Comme tous les autotransporteurs, Bad A est caractérisé par trois parties: la tête (zone N-terminale), le corps et un domaine C-terminal d'ancrage dans la membrane. La structure de la tête de Bad A est proche de celle des protéines de virulence Yad A et Nad A. En revanche la partie C-terminale ne présente aucune homologie avec les autres protéines connues (Reis *et al.*, 2004, Szczesny *et al.*, 2008). D'après Kaiser *et al.*, (2008), la tête de Bad A est le domaine actif le plus important de la protéine, responsable de l'adhérence à des cellules hôtes. Le gène codant pour la tête de Bad A contient en particulier un VNTR avec 11 répétitions, alors que celui de YadA n'en contient que huit (Szczesny *et al.*, 2008).

D.2. La protéine Arp (Acidic repeat protein) :

La protéine Arp, associée à la membrane externe, appartient aussi à la famille des autotransporteurs. En 2007, Litwin *et al.* ont identifié la structure de cette

protéine chez la souche de référence, *B. henselae* Houston I, et ont mis en évidence son caractère immunodominant. Comme les autres protéines autotransporteurs, la protéine Arp est composée d'un domaine α (domaine passager secrété) et d'un domaine de translocation de l' α -domaine à l'extérieur de la surface de la bactérie.

Au sein du domaine passager, Litwin *et al.* (2007) ont identifié un domaine pertactin-like (par homologie avec la pertactine de *Bordetella pertussis*, qui est également un autotransporteur) (Leininger *et al.*, 1991) ainsi qu'une région de répétitions en tandem constituée de sept unités de base, de 144 pb chacune. Cette région la fait appartenir à une famille de domaines à fonction ATPase, la famille AAA ATPase. La protéine Arp a été également décrite, récemment, chez *Treponema pallidum*, dont le gène *arp* contient un nombre variable de répétitions selon les souches. Selon ces auteurs, cette zone est la cible des anticorps anti-syphilis spécifiques d'espèce (Harper *et al.*, 2008).

Chez *B. henselae*, le domaine AAA ATPase est plus immunogène que le reste de la protéine (Litwin *et al.*, 2007).

D.3. Le système de sécrétion de type IV (T4SSs):

Chez *B. henselae*, les systèmes de sécrétion de type IV les plus connus sont Trw et VirB/VirD4 qui ont pour fonction de libérer des facteurs de virulence à l'intérieur des cellules endothéliales et des érythrocytes (Dehio, 2005).

a- Le système VirB/VirD4 permet chez diverses bactéries pathogènes la translocation dans les cellules hôtes de différents substrats comme de l'ADN ou des protéines effectrices. Ce système est codé par un opéron de 10 gènes (*virB2-virB11*) et par un autre gène codant pour la protéine VirD4. Ce système est primordial pour la virulence de *B. henselae* puisqu'il permet l'auto-aggrégation, l'attachement, l'invasion et la colonisation des cellules endothéliales. Il intervient également dans d'autres processus tels que: (i) le réarrangement du cytosquelette à l'origine de formation de l'invasome, l'activation des facteurs proinflammatoires NF- KB, (iii) l'augmentation de la survie de la cellule hôte *via* un effet anti-apoptotique et (iiii) la translocation des

protéines Bep (*Bartonella* translocated effector protein) (Schröder & Dehio, 2005).

b- Le système Trw a été montré essentiel dans le parasitisme intra-érythrocytaire chez les bartonelles et plus particulièrement chez *B. tribocorum* (Schulein *et al.*, 2001). Ce système a une grande homologie avec celui trouvé dans le plasmide R388, originaire d'*E. coli* (80% d'homologie). Les gènes *trw* sont colinéaires avec les gènes de ce plasmide. La comparaison de deux systèmes montre que celui de *B. tribocorum* présente des duplications multiples de gènes tels que *trwL*, *trwJ* et *trwH*.

E. Aspects cliniques :

Depuis la première description faite de la maladie des griffes du chat par Debré *et al* en 1950, le nombre des autres formes cliniques rencontrées chez l'Homme et décrites dans la littérature ne cesse d'augmenter. Certaines d'entre elles ont été également décrites chez le chien et très récemment des cas cliniques ont été signalés chez le cheval.

E.1. Formes cliniques chez l'Homme :

Chez l'homme, *B. henselae* engendre différentes manifestations cliniques selon le statut immunitaire de son hôte (Raoult, 1999). Parmi elles, on peut citer la maladie des griffes du chat (MGC), l'angiomatose bacillaire et la péliose bacillaire hépatique ou splénique, des bactériémies fébriles récurrentes ou persistantes, des endocardites, des manifestations oculaires, des méningo-encéphalites...

E.1.1. La maladie des griffes du chat (MGC)

E.1.1.1. Historique :

Historiquement, la première forme identifiée a été la "maladie des griffes du chat" (MGC) ("cat scratch disease") ou "maladie des griffures du chat" ou "syndrome des griffures de chat" ou "fièvre du chat" ("cat scratch fever") lymphoréticulose bénigne d'inoculation" ("benign inoculation lymphoreticulosis").

Elle a été découverte en 1932 par l'américain L. Foshay. Ce microbiologiste travaillant sur la tularémie eut l'occasion d'observer le développement d'adénites

consécutives à des griffures de chat qui les distinguaient de la tularémie. La MGC fut décrite cliniquement pour la première fois en France en 1950 par Débré *et al.*

Son étiologie fut longtemps incertaine, et ce n'est qu'en 1992 que *B. henselae* a été désignée par Regnery *et al.* (1992) comme l'agent principal de cette maladie.

E.1.1.2. Données de prévalence :

Cette maladie n'est pas circonscrite à une zone particulière de la planète, mais semble avoir une répartition mondiale. En effet, de nombreuses études portant sur l'infection féline et/ou humaine par *B. henselae* ont été menées sur différents continents (Amérique, Asie, Europe, Océanie). Mais la prévalence globale de cette maladie chez l'Homme n'est connue que dans quelques pays du monde.

- Aux États-Unis : 22 000 à 24 000 cas de MGC ont été détectés en 1992, soit une prévalence de 9.3 pour 100 000 habitants dont 2 000 ont nécessité une hospitalisation c'est-à-dire 0.8 cas /100000 hospitalisations (Jackson *et al*/1993).

- En France : Cette maladie est assez fréquente avec environ 5000 cas déclarés/an (Al-Soud *et al.*, 2000).

- Au Pays Bas : L'incidence de la MGC est d'environ 2 000 cas/an soit l'équivalent de 12.5 cas par 100 000 personnes (Bergmans *et al.*, 1997).

- Au Japon: L'estimation est de 10 000 cas/an (Murakami *et al*, 2002).

E.1.1.3. Les symptômes :

Ils font le plus souvent suite à une griffure, éventuellement une morsure ou un contact étroit avec un chat (souvent un chaton de moins d'un an).

α. Forme classique :

La MGC typique, chez un sujet immunocompétent, se caractérise par l'apparition d'une papule ronde de un à quelques millimètres, qui se développe 3 à 10 jours après le contagé. La taille de la papule reste constante pendant les deux semaines suivantes puis commence à décroître, mais parfois, elle persiste plusieurs semaines. Durant la première et la deuxième semaine qui suivent l'inoculation, les ganglions lymphatiques drainant la zone d'inoculation subissent une augmentation de volume, atteignant une taille de 2 à 3 centimètres (**cf. figure 6 A & B**).

Une suppuration locale est présente dans 10 % des cas. Leur localisation est le plus souvent axillaire, épitrochléenne, cervicale, supra-claviculaire ou sub-mandibulaire.

L'évolution de la MGC peut durer 2 à 3 mois mais certains cas plus sévères peuvent durer plus longtemps (Edouard & Raoult, 2009).

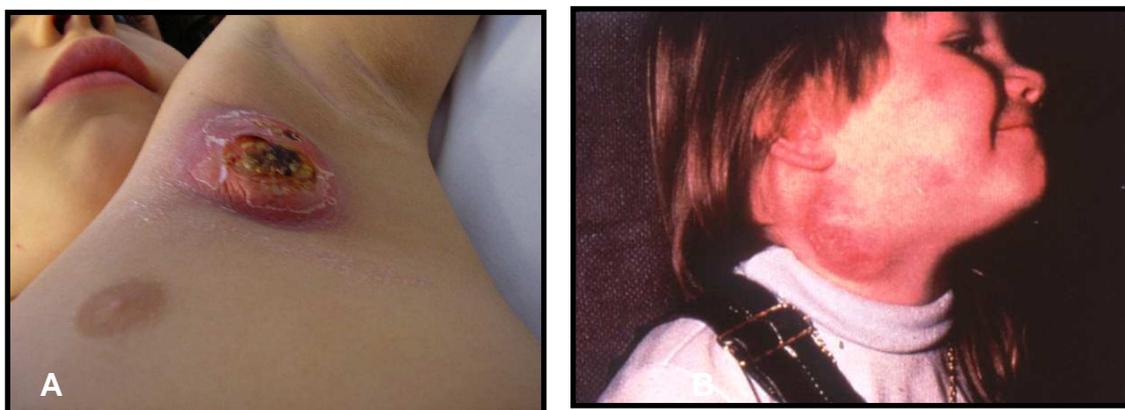


Figure 6 (A & B): Photos illustrant des cas typiques de MGC montrant des adénopathies

β. Les formes atypiques sévères:

En plus des adénopathies, 5 à 14% des patients immunocompétents atteints de MGC présentent des symptômes systémiques sévères en raison de la dissémination de l'infection (Carithers, 1985 ; Margileth, 1993). Les patients peuvent présenter une fièvre prolongée de plus de deux semaines, un malaise, une fatigue, une perte de poids, des myalgies, des arthralgies et une splénomégalie (Bass *et al*, 1997).

Les formes atypiques de MGC peuvent être classées en plusieurs catégories en fonction de l'organe ou du tissu touché :

- **Formes nerveuses:** elles sont considérées comme les formes les plus graves de MGC chez les patients immunocompétents. Elles sont très rares et surviennent chez 2% des patients immunocompétents environ (Florin *et al*, 2008). Selon Carithers (1985), il s'agit d'une encéphalopathie dans 90% des cas rencontrés, généralement, aiguë et diffuse, révélée dans un cas sur deux par des convulsions, ou plus rarement un coma. Elle se manifeste par des cris, des hallucinations visuelles, avec un état confusionnel. Des atteintes focalisées avec hémiplégie ou aphasie transitoire ont été décrites (Carithers, 1991).

D'autres manifestations neurologiques ont été décrites, centrales, de type choréique cérébelleux (Carithers, 1985), ou atteignant le système nerveux périphérique :

atteinte du nerf facial (Carithers, 1985) associée ou non à des manifestations parotidiennes (Premachandra *et al.* , 1990). En 1991, Carithers et Margileth décrivent 76 patients ayant des complications neurologiques de MGC. Soixante-dix avaient une encéphalopathie et quinze avaient une atteinte des nerfs périphériques ou crâniens. Elles toucheraient plutôt les grands enfants, les adolescents et les adultes que les plus jeunes.

Les complications neurologiques commencent à se développer quelques jours à deux mois après l'apparition des adénopathies.

En 1995, Marra confirme les observations de Carithers et Margileth et cite des observations de myélite, de radiculite, de neuropathie par compression et d'ataxie cérébelleuse. En outre, une démence a été notée chez des patients propriétaires de chats et infectés par le virus de l'immunodéficience humaine avec des taux d'anticorps élevés vis-à-vis de *B. henselae*.

- **Formes oculaires :** La première description d'une bartonellose oculaire a été faite par Henri Parinaud en 1889 chez trois patients présentant une fièvre prolongée, des adénopathies locorégionales et une conjonctivite folliculaire. Ce syndrome, secondairement appelé syndrome de Parinaud, fut rattaché à la MGC pour la première fois par Presme et Marchand en 1950. Carithers *et al.* (1991) montrèrent que ce syndrome pouvait traduire une forme atypique de

MGC et qu'il existait souvent sur la conjonctive des paupières une lésion granulomateuse spécifique ayant la forme d'un nodule (quelques millimètres à plus de un centimètre) et de couleur variant du rouge au jaune. Bien que le syndrome de Parinaud puisse être engendré par d'autres agents infectieux, il est considéré comme étant la manifestation oculaire la plus fréquente de la MGC puisqu'il survient dans 4 à 6% des cas atypiques de la maladie après inoculation de la bactérie dans l'œil.

La conjonctivite est généralement unilatérale, non suppurée, non douloureuse, avec formation d'une lymphadénopathie régionale au niveau des nœuds lymphatiques pré-auriculaires ou sous mandibulaires. Les autres manifestations ophtalmologiques liées à la MGC sont moins connues par des médecins généralistes car elles sont habituellement prises en charge directement par les ophtalmologistes. Parmi ces manifestations, on peut mentionner des névrites optiques (Mason *et al.*, 2004), des rétinites stellaires (Ormerod *et al.*, 1999 ; Ormerod *et al.*, 1998), des neurorétinites (Cunningham *et al.*, 2000 ; Wade *et al.*, 2000), des uvéites (Drancourt *et al.*, 2004) (**cf. figure 7**).

- **Autres manifestations:** D'autres manifestations plus rares peuvent apparaître :

- manifestations cutanées : éruption vésiculaire, urticaires (Landau *et al.*, 1999), érythèmes noueux et polymorphe (Carithers HA., 1985)
- manifestations ostéo-articulaires: ostéomyélite (Hulzebos *et al.*, 1999)
- manifestations respiratoires: pneumonie (Margileth *et al.*, 1998).
- manifestations hématologique: anémie hémolytique (Greenbaum *et al.*, 1986).

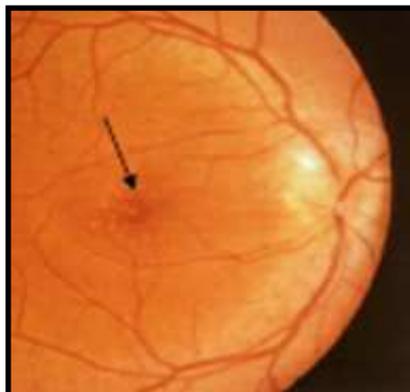


Figure 7: Chorio-rétinite provoquée par *B. henselae* chez un enfant (Earhart et Power, 2000)

E.1.2. Endocardite :

Plusieurs espèces de bartonelles sont responsables d'endocardites telles que *B. henselae*, *B. quintana*, *B. elizabethae* et *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. koehlerae*, *B. alsatica* et *B. washoensis* (Breitschwerdt *et al.*, 1995 ; Daly *et al.*, 1993 ; Drancourt *et al.*, 1995 ; Jalava *et al.*, 1995 ; Roux *et al.*, 2000 ; Spach *et al.*, 1995 ; Raoult, 2006). Cette maladie touche aussi bien les patients immunodéprimés que les sujets immunocompétents (Raoult *et al.*, 1996 ; Holmes *et al.*, 1995).

Globalement, chez l'homme, les bartonelles sont responsables de 3 % des endocardites à hémoculture négative en France, en constituant la 2^{ème} cause, loin cependant derrière *Coxiella burnetii* (48%) (Raoult *et al.*, 1996, Houpikian *et al.*, 2005). Environ 80 % des cas rencontrés d'endocardite à *Bartonella* .sp sont imputables à *B. quintana* et les 20 % restants étant dus à *B. henselae* (Fournier *et al.*, 2001). Les autres espèces sont très rarement impliquées (Houpikian *et al.*, 2005 ; Raoult *et al.*, 1996). Dans la plupart des cas d'endocardite, les bartonelles affectent le plus souvent les valves natives et rarement des prothèses valvulaires (Holenarasipur *et al.*, 2007 ; Klein *et al.*, 2002 ; Kreisel *et al.*, 2005 ; Lesprit *et al.*, 2003 ; Sondermeijer *et al.*, 2006 ; Walls *et al.*, 2006).

Les endocardites induites par *B. henselae* sont moins sévères que celles provoquées par *B. quintana* (Raoult *et al.*, 1996).

D'autres études ont montré que *B. quintana* provoque essentiellement des endocardites chez des personnes sans domicile fixe (SDF), celles-ci étant porteuses de poux du corps, vecteurs de cette espèce, ou chez des alcooliques chroniques sans valvulopathie antérieure. En revanche, *B. henselae* semble le plus souvent responsable d'endocardite chez des patients déjà atteints de valvulopathie, surtout lorsqu'ils ont été en contact avec des chats ou bien des puces du chat (Fournier *et al.*, 2001 ; Houpikian *et al.*, 2005).

Les signes cliniques sont très variables, allant de formes aiguës septicémiques, d'évolution brutale, à des formes très lentes. La fièvre est la première manifestation majeure et peut être associée à un amaigrissement et

une altération de l'état général. L'apparition ou la modification d'un souffle cardiaque est le deuxième symptôme de l'endocardite. Les bactéries véhiculées par le sang se localisent dans l'endocarde tout en provoquant deux types de lésions : des végétations et des lésions destructrices.

E.1.3. Angiomatose et péliose bacillaires :

Cette maladie concerne presque exclusivement les personnes immunodéprimées, comme les sujets atteints de sida (taux de CD4+ inférieur à 200 par mm³), de cancer, transplantés ou sous traitement par immunosuppresseurs (Koehler *et al.*, 1993). Koehler *et al.* ont montré en 1992 que deux espèces, *B. henselae* et *B. quintana*, pouvaient être responsables de cette maladie. Le premier cas d'angiomatose bacillaire a été publié en 1983 par Stoler *et al.*, chez un patient âgé de 32 ans et atteint de Sida. Depuis, de nombreux cas ont été décrits dans les pays industrialisés (Hnatuk *et al.*, 1994, Mohle-Boetani *et al.*, 1996).

Des rares cas ont cependant été observés chez des sujets immunocompétents, se traduisant par l'apparition progressive de nombreuses tumeurs vasculaires de la peau et des tissus sous-cutanés (Cockerell *et al.*, 1990 ; Tappero *et al.*, 1993). L'apparence clinique de ces lésions cutanées permet facilement de confondre cette maladie avec d'autres pathologies, notamment le sarcome de Kaposi et les lésions provoquées par la maladie de Carrion, due à *Bartonella bacilliformis* (Maurin *et Raoult*, 1996). Le nombre de ces tumeurs est proportionnel au degré d'immunodéficience du patient : il varie de un à plusieurs centaines et la taille des tumeurs de quelques millimètres à plusieurs centimètres (jusqu'à 10cm) (Edouard, & Raoult, 2009). Ces lésions se présentent sous des aspects très variés : papules, nodules, verrues, nodules sous cutanés et plaques hyper-kératosiques. Elles apparaissent sur tout le corps, parfois entourées d'une collerette qui varie entre l'incolore et le rouge foncé, pouvant s'ulcérer et saigner facilement. L'atteinte cutanée est la plus fréquente, mais de nombreux autres organes peuvent être touchés, avec un retentissement sérieux sur l'état général (**cf. figure 8**). L'atteinte hépatique peut

revêtir différents aspects : hépatomégalie avec aspect nodulaire du foie, abcès hépatiques (Perkocha *et al.*, 1990) et péliose hépatique.

Cette dernière est une affection très rare, le plus souvent asymptomatique. Elle se caractérise par une prolifération des capillaires sinusoides hépatiques, conduisant à une dilatation lacunaire allant de quelques microns à plusieurs millimètres ; leur distribution est aléatoire au sein du lobule hépatique. Cette maladie a été décrite pour la première fois par Wagner en 1861, et ce n'est qu'en 1916 que Schoenlack a utilisé le mot péliose en référence à l'aspect livide de la surface du foie que cette maladie induit. De nombreux facteurs, associés à une péliose hépatique, ont été répertoriés dans la littérature, parmi lesquels on peut citer des médicaments et toxiques (stéroïdes androgéniques anabolisants, contraceptifs oraux, arsenic, azathioprine, corticostéroïdes, chlorure de vinyle) ou des infections bactériennes dont celles à *B. henselae*. Les patients atteints de péliose hépatique peuvent présenter un amaigrissement, de la fièvre, de douleurs abdominales, une hépato- et/ou splénomégalie, des nausées, de diarrhée.

La rate (Daybell *et al.*, 2004), le cœur (Cockerell *et al.*, 1987), les nœuds lymphatiques (Chan *et al.*, 1991, la moelle osseuse hématopoïétique (Milam *et al.*, 1990), le cerveau (Spach *et al.*, 1992), les muscles, les os (Koehler *et al.*, 1992, Gomez-Jorge *et al.*, 1996, Baron *et al.*, 1990) et les muqueuses intestinales (Cockerell *et al.*, 1987, Koehler *et al.*, 1995) et respiratoires (Slater *et al.*, 1992) peuvent également être la cible de la maladie.



Figure 8: Photos illustrant quelques cas d'angiomatose bacillaire

E.1.4. Bactériémie fébrile, récurrente ou persistante :

La bactériémie fébrile, récurrente ou persistante à *Bartonella* est un syndrome fébrile rencontré chez les immunodéprimés, qui peut être dû à *B. quintana*, *B. elizabethae* et *B. henselae*. Selon Jacobs *et al.*, 1998, environ 5% des « fièvres d'origine inconnue » seraient consécutives à une infection par *B. henselae*. En outre, dans cette étude prospective de 146 enfants atteints de fièvre prolongée d'origine indéterminée, cette bactérie s'avère être la troisième étiologie infectieuse de bactériémie fébrile. L'amaigrissement, le malaise, la fatigue et l'anorexie sont également associés à la bactériémie.

D'autres travaux ont montré que *B. henselae* pouvait provoquer soit une bactériémie fébrile soit une fièvre d'origine inconnue à la fois chez des patients immunodéprimés et immunocompétents ne présentant ni adénopathie ni lésions hépatospléniques.

C'est pourquoi la possibilité d'une infection par cette bactérie doit être envisagée devant toute fièvre prolongée chez l'enfant (Lucey *et al.*, 1992, Welch *et al.*, 1992 ; Jacobs *et al.*, 1998 ; Tsujino *et al.*, 2004.).

E.2. Les pathologies animales:

B. henselae peut infecter quelques espèces animales en provoquant ou non des manifestations cliniques.

E.2.1.Chez le chat:

Le chat est reconnu comme étant le réservoir principal et naturel de *B. henselae*, sous la forme d'une bactériémie. Cette bactériémie semble être asymptomatique, que ce soit chez les chats domestiques (de compagnie ou errants) ou les chats sauvages. Dans de rares cas, des manifestations cliniques ont été observées au cours d'infections naturelles et expérimentales.

α -Infection naturelle :

Dans la plupart des cas étudiés, les chats infectés naturellement par *B. henselae* présentent une bactériémie asymptomatique, cyclique et de longue

durée (plusieurs mois) avec variation du niveau de bactériémie. Dans l'étude d'Abbott *et al.* (1996), une chatte infectée naturellement et suivie pendant 24 mois a présenté une bactériémie cyclique de longue durée avec variations d'un facteur 100 du niveau de bactériémie, malgré un titre stable en anticorps. Dans cette étude, aucun signe clinique ou modification hématologique ne furent observés durant les phases aiguës ou chroniques de la bactériémie. Cependant, quelques autres études ont montré l'existence d'un lien entre l'infection par *B. henselae* et certaines manifestations cliniques. En se basant sur des tests sérologiques, Ueno *et al.* (1996) ont conclu que les chats immunodéprimés (FIV) avaient un risque plus élevé de développer une lymphadénopathie et une gingivite suite à une infection par *B. henselae* par rapport aux chats séronégatifs pour *B. henselae*. *B. henselae* a été également associée à des cas de stomatite, à des atteintes du tractus urinaire, en particulier rénales (Glaus *et al.*, 1997). Une uvéite a été détectée chez un chat infecté naturellement par *B. henselae* (Lappin *et al.*, 1999).

β-Infection expérimentale :

De nombreux essais d'infection expérimentale par *B. henselae* ont été réalisés sur des chats. Outre l'induction d'infections asymptomatiques, certains chats infectés, particulièrement parmi ceux ayant été inoculés avec des souches d'origine féline, ont développé des signes cliniques variés. Des infections expérimentales ont été réalisées par Abbott *et al.* (1997). Une bactériémie a été détectée entre une et trois semaines après l'inoculation expérimentale et a duré de un à huit mois chez la plupart des chats. Ces mêmes auteurs ont suggéré la possibilité d'une réponse immunitaire protectrice chez les chats domestiques réinfectés expérimentalement par *B. henselae*, après être débarrassés de leur infection initiale, puisque ces derniers n'ont développé aucune bactériémie.

Yamamoto *et al.*, 2002 ont réalisé une étude comparative après infection expérimentale de 12 chats SPF avec, d'une part une souche féline de *B. henselae* de génotype I (6 chats recevant une dose de $4,8 \cdot 10^7$ colonies / ml) et d'autre part la souche de référence Houston I (6 chats recevant entre $6,6 \cdot 10^6$ et

$9,6.10^7$ colonies /ml). Seuls les six chats infectés par la souche féline développèrent de la fièvre 2 à 12 jours après l'inoculation et celle-ci dura 1 à 2 semaines. Cependant les 12 chats devinrent bactériémiques, mais avec une durée significativement plus longue chez les chats infectés par la souche féline (**cf. figure 9**). La majorité des chats (83%) inoculés avec cette dernière présentèrent des récurrences de bactériémie, alors que ce ne fut pas le cas pour aucun des chats inoculés par la souche humaine (Houston I). Par ailleurs, les chats infectés par la souche Houston I développèrent une réponse sérologique IgM et IgG significativement moins forte que les chats infectés par la souche féline de génotype I.

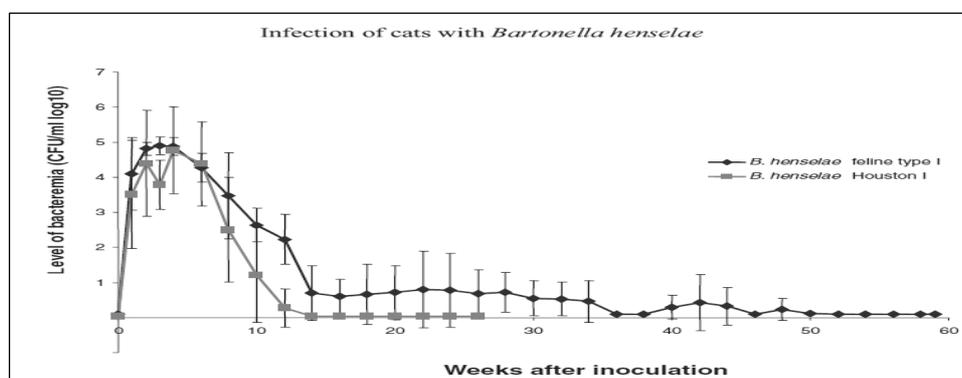


Figure 9 :Taux de bactériémie chez des chats SPF inoculés expérimentalement par une souche

féline de *B. henselae* de type I (n=6) et la souche Houston I (n=6) (Yamamoto *et al.*, 2002)

Dans une étude plus récente, Werner *et al.*, 2007 ont étudié l'infection expérimentale chez des chats domestiques par une souche féline de génotype I, F1, ayant subi plusieurs passages *in vitro* (N1, N20 et N 40). Les trois lots de chats infectés respectivement par la souche F1 (N1), F1 (N20) et F1 (N40) ont présenté le même niveau de bactériémie ainsi que la même réponse immunitaire (**cf. figure 10**).

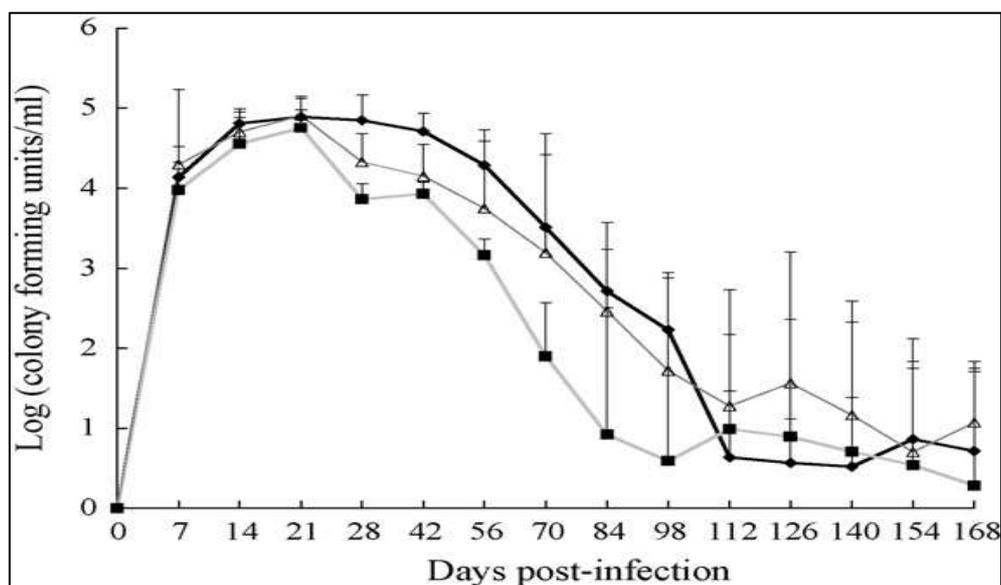


Figure 10 :Taux de bactériémie chez des groupes de chats inoculés par la souche,F1 après plusieurs passages (N1, N20 et N40) N1 (◆), N20 (Δ) or N40 (■) (Werner *et al.*, 2007).

Divers signes cliniques ont été observés chez des chats infectés par des souches de *B. henselae* de génotype II, la manifestation la plus fréquente étant la fièvre, dont la durée n'a pas dépassé une semaine. Une inflammation locale (érythème, oedème) au niveau de site d'inoculation ainsi que des lymphadénopathies locales ou générales ont été observées (Kordick *et al.*, 1999, Guptill *et al.*, 1997). En outre, des troubles de la reproduction ont été décrits chez des chattes gestantes après infection par *B. henselae* (Guptill *et al.*, 1998). Certains chats ont présenté des troubles neurologiques, de la léthargie, de l'anorexie ...

La présence ou l'absence de signes cliniques chez le chat pourrait être due à la variabilité de la virulence des souches de *B. henselae* (O'Reilly *et al.*, 1999 ; O'Reilly *et al.*, 2001).

E.2.2. Chez le chien :

Pour la première fois en 1993, une bartonelle, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffi*, a été isolée chez le chien (Breitschwerdt *et al.* 1998). Depuis, le nombre des espèces et sous-espèces de *Bartonella* responsables de manifestations cliniques chez le chien ne cesse d'augmenter (5 espèces et sous-espèces au total : *B. clarridgeia*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffi*, *B. elizabethae*, *B. henselae* et

B. washoensis. Le chien exprime un tableau clinique voisin de celui de l'homme et semble constituer un bon modèle animal de ces infections (**Tableau 1**).

Manifestations cliniques	Homme	Chien
Bactériémie chronique	<i>B. quintana</i> , <i>B. henselae</i>	<i>B. vinsonii berkhoffii</i>
Fièvre prolongée	<i>B. quintana</i> , <i>B. henselae</i>	<i>B. vinsonii berkhoffii</i>
Léthargie, perte du poids, anorexie	ND	<i>B. vinsonii berkhoffii</i>
Lymphadénite, rhinite, granulomateuses	<i>B. henselae</i>	<i>B. vinsonii berkhoffii</i>
Angiomatose bacillaire et péliose Endomyocardite, Arytmie	<i>B. quintana</i> , <i>B. henselae</i> , <i>B. vinsonii berkhoffii</i>	<i>B. henselae</i>
Symptômes neurologiques	<i>B. henselae</i> , <i>B. vinsonii arupensis</i>	<i>B. vinsonii berkhoffii</i>
Encéphalite	<i>B. henselae</i>	ND
Arthrite, douleurs articulaires	<i>B. henselae</i>	<i>B. henselae</i>
Uvéite et lésions oculaires	<i>B. henselae</i> , <i>B. grahamii</i>	<i>B. henselae</i>
Glomérulonéphrite	<i>B. henselae</i>	ND
Endo/Myocardite, arythmie	<i>B. henselae</i> , <i>B. vinsonii arupensis</i> , <i>B. quintana</i> , <i>B. elizabethae</i> , <i>B. koelherae</i> , <i>B. alsatica</i> , , <i>B. washoensis</i>	<i>B. henselae</i> , <i>B. clarridgeiae</i> , <i>B. quintana</i> , <i>B. vinsonii berkhoffii</i> , <i>B. washoensis</i>

Tableau 1: Aspects cliniques des infections à Bartonella chez l'Homme et le chien (Boulouis. *et al*, 2008)

α. Endocardites :

Les endocardites sont les premières manifestations cliniques des bartonelloses à avoir été décrites chez le chien (Breitschwerdt *et al.*, 1995). Selon des enquêtes rétrospectives ou prospectives, les bartonelles constituent environ 19 % (Sykes *et al.*, 2006) à 28% (MacDonald *et al.*, 2004) des causes d'endocardite chez cette espèce. Les espèces de bartonelles les plus souvent incriminées sont *B. vinsonii* sbp *berkhoffii*, *B. clarridgeiae* et *B. clarridgeiae-like* (Chomel *et al.*, 2001 ; Sykes *et al.*, 2006). Récemment, d'autres espèces de bartonelles ont été isolées et/ou détectées chez des chiens souffrant d'endocardite infectieuse telles que *B. washoensis*, *B. quintana* et *B. rochalimae* (Henn *et al.*, 2009, Kelly *et al.*, 2006).

Le premier cas d'infection d'une valve cardiaque chez l'espèce canine a été associé à *B. vinsonii berkhoffi* lors d'une étude réalisée sur 12 chiens dont 8 présentaient une endocardite valvulaire végétative (Breitschwerdt *et al.*, 1995, Breitschwerdt *et al.*, 1999) (**cf. figure 11**).

Les chiens affectés ont présenté des signes d'endocardite ou de myocardite, des arythmies, et des souffles cardiaques.

Des cas très rares d'infection liée à *B. henselae* ont été décrits dans la littérature. Dans une étude réalisée sur 31 chiens, 2 ont été révélés séropositifs par la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI). En revanche, la bactérie n'a pu être isolée du sang ni détectée par PCR (Demers *et al.*, 1995). Au Royaume-Uni, Barnes *et al.*, (2000) ont repéré 3 chiens séropositifs pour *B. henselae* parmi 100 testés. Au Japon, Tsukahara *et al* (1998) ont mis en évidence, d'une part, la présence de 4 chiens séropositifs parmi 52 par la technique (IFI) et d'autre part, la détection de l'ADN de *B. henselae* chez 3 chiens. Goodman et Breitschwerdt (2005) ont mis en évidence la production des anticorps chez 3 chiens parmi 4 ayant une endocardite infectieuse. L'endocarde de l'un de ces chiens a été utilisé dans notre étude expérimentale (cf. Chapitre 2). Dans une autre étude, plus récente, l'ADN de *B. henselae* et celui de *B. koehlerae* ont été détectés dans le tissu de la valve aortique chez un chien présentant une sténose aortique modérée (Ohad *et al.*, 2009).

Dans la plupart des cas, les symptômes apparaissent brusquement et la maladie qui en résulte nécessite souvent des soins intensifs ou une hospitalisation prolongée. Outre les lésions végétatives de l'endocarde, les auteurs ont noté la présence de foyers de myocardite associés à l'inflammation des artères coronaires et à des zones de nécrose fibrinoïde. Ces endocardites peuvent être accompagnées par de l'arythmie, une myocardite multifocale, des syncopes (Breitschwerdt *et al.*, 1999).

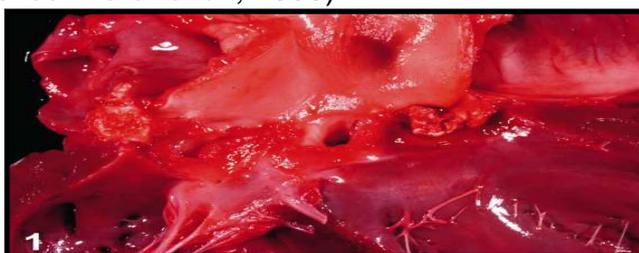


Figure 11 : Photo prise chez un chien souffrant d'endocardite (Breitschwerdt *et al.*, 1999)

β. Péliose hépatique :

Plusieurs cas de péliose hépatique à *B. henselae* ont été décrits chez des chiens (Gillespie *et al*, 2003). Les chiens affectés présentent des signes de faiblesse, une distension et un épanchement abdominaux accompagnés de troubles électrolytiques, hématologiques ainsi que d'une augmentation des phosphatases. L'atteinte du foie se manifeste par une hépatomégalie qui est due à la formation de kystes. L'observation microscopique et histologique du tissu hépatique révèle des lésions caractéristiques de péliose hépatique qui se traduisent par des kystes remplis de sang, entourés d'un stroma fibromyxoïde contenant des cellules inflammatoires et des capillaires dilatés.

γ. Autres manifestations liées à d'autres espèces de bartonelles :

Des études réalisées sur des chiens ont montré que *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* peut provoquer de lymphadénites granulomateuses et des rhinites granulomateuses (Pappalardo *et al*, 2000). L'infection par cette espèce peut entraîner d'autres symptômes tels que perte de poids, crises convulsives, épistaxis récurrents, tremblement des membres, ataxie, vomissements et diarrhée, infarctus rénal, thrombocytopénie.

En 2002 et pour la première fois, Mexas *et al.*, (2002) ont réussi à amplifier par PCR l'ADN de *Bartonella elizabethae* dans le sang d'un chien présentant un amaigrissement, une perte d'appétit et des anomalies hématologiques et biochimiques.

E.2.3. Infection à *B. henselae* chez d'autres espèces animales :

Récemment, cette bactérie a été isolée à partir du sang de deux chevaux dont l'un souffrait de coliques aiguës avec une anamnèse de fièvre et de maladie respiratoire non caractérisée, alors que le second présentait une baisse de performance, associée à une boiterie intermittente chronique passant d'un membre à un autre (Jones *et al.*, 2008). La contribution de *B. henselae* à ces présentations cliniques chez le cheval n'est pas déterminée. Une étude

récente a mis en évidence par des méthodes histologiques, immunohistologiques, ultra-structurales et moléculaires la présence de *B. henselae* chez un fœtus lors de l'avortement d'une poulinière. Etant donné l'association de cet agent à des lésions chez le fœtus, ceci a conduit Johnson et son équipe à conclure que l'infection par *B. henselae* était bien à l'origine de cet avortement (Johnson *et al.*, 2009).

B. henselae a été également isolée à partir du sang de grands félidés sauvages en liberté ou en captivité tels que des lions, des guépards, des lynx et des pumas (Chomel, communication personnelle, Molia *et al.*, 2004 ; Jacomo *et al.*, 2002). Aucune publication n'a encore fait état de l'existence des pathologies associées à l'infection par *B. henselae* chez les félidés sauvages.

F- Aspects épidémiologiques de l'infection par *B. henselae* :

F.1. Etude de prévalence de l'infection par *B. henselae* chez le chat par zone géographique :

B. henselae a une distribution géographique ubiquitaire chez son réservoir naturel principal, le chat domestique, ainsi que l'ont montré les nombreuses études sérologiques et bactériologiques qui ont été réalisées dans différents pays du monde dans le but d'étudier la prévalence de *B. henselae*. Les tableaux 2-8 englobent toutes les données bibliographiques disponibles relatives aux études de prévalence réalisées à ce jour dans différentes régions du monde. Ces études sont classées par zone géographique (Europe, Amérique, Afrique, Asie et Océanie). Nous avons essayé d'extraire le maximum d'informations liées à chaque étude telles que : la catégorie de population féline étudiée (chats domestiques vs chats sauvages ; chats errants/chats de compagnie/chat provenant d'une fourrière), le type d'étude (bactériologique vs sérologique), le génotype (I/II) et le taux de prévalence (**cf. Tableaux : 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8**).

Pays	Type d'étude	Catégorie de population féline	Taux de prévalence (%)	Références
Afrique du Sud	B	De compagnie	1/31 (3.2)	<i>Pretorius et al., 1999</i>
	S	De fourrière	11/52 (21)	<i>Kelly et al., 1996</i>
Algérie	B	De fourrière	27/185 (14.59)	N . Azzag, communication personnelle
Egypte	S	De compagnie	5/42 (12)	<i>Childs et al., 1995</i>
Zimbabwe	B	De compagnie	2/25 (8)	<i>Kelly et al., 1996</i>
	S	De compagnie &De fourrière	28/119 (24)	<i>Kelly et al., 1998</i>

Tableau 2: études de prévalence de l'infection féline par *B. henselae* en Afrique
B = Bactériologie ; **S** = Sérologie

Pays	Type d'étude	Catégorie de population féline	Taux de prévalence (%)	Références
Brésil	S	De compagnie		<i>Velho et al., 2003</i>
Chili	S	De compagnie	54/76 (71)	<i>Zaror et al., 2002</i>
Canada	S	De compagnie	43/242 (17.8)	<i>Leighton et al., 2001</i>
USA	S	De compagnie De fourrière	370/1314 (28.2)	<i>Childs et al., 1995</i>
USA Californie	B S	De compagnie De compagnie	81/205 (39.5) 165/205 (81)	<i>Chomel et al., 1995</i>
USA Caroline du Nord	S	De compagnie & Sauvages	57/76 (75) 93/100 (75)	<i>Nutter et al., 2004</i>
USA Baltimore	S	De compagnie & Errants	77/592 (13)	<i>Childs et al., 1994</i>
USA Floride	S	Errants Sauvages	186/553 (33.6)	<i>Luria et al., 2004</i>

Tableau 3: études de prévalence de l'infection féline par *B. henselae* en Amérique
B = Bactériologie ; **S** = Sérologie

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Pays	Type d'étude	Catégorie de population féline	Taux prévalence (%)	Génotype(s)	Références
Australie Sydney Melbourne	B B	De compagnie Sauvages	3/18 (16) 24/59 (40)	N.D	Branley <i>et al.</i> , 1996
Nie Zélande Auckland	B	De compagnie De compagnie	45/342 (13.2) 8/48 (17)	N.D N.D	Yates <i>et al.</i> , 1997 Joseph <i>et al.</i> , 1997
Corée du Sud	PCR nichée	De compagnie Sauvages	16/48 (33.3) 41/98 (41.8)	N.D	Kim <i>et al.</i> , 2009
Indonésie (Jakarta)	S	Errants	6/14 (43)		Marston <i>et al.</i> , 1999
Israël	B S	De compagnie Errants	45/114 (39.5) 40/48 (83)	N.D	Baneh <i>et al.</i> , 1996 Avidor <i>et al.</i> , 2004
Japon	S S S B B	De compagnie De compagnie De compagnie De compagnie De compagnie	30/199 (15.1) 43/471 (9.1) 128/ 1447 (8.8) 3/33 (9.1) 50/690 (7.2)	N.D Type I: 43/45 (95.5) Type II :1/45(2.2)	Ueno <i>et al.</i> , 1995 Maruyama <i>et al.</i> , 1998 Maruyama <i>et al.</i> , 2003 Maruyama <i>et al.</i> , 1996 Maruyama <i>et al.</i> , 2000
Jordanie	B	De compagnie	55/153 (32)	N.D	Al-Majali <i>et al.</i> , 2004
Philippines (Manilla)	B S	Errants Errants	19/31 (61%) 73/107(68)	Type I : 13/19 (68.4)	Chomel <i>et al.</i> , 1999
Singapore	S	Errants	38/80 (47.5)	N.D	Nasirudeen <i>et al.</i> , 1999
Thaïlande	B B	De compagnie Errants De compagnie Errants	0/24 (0) 45/288 (15.8)	Type I : 48/67 (71.6) Type II : 13/67 (19.4) Type I:40/45 (88.8) Type II: 4/45 (8.8) Type I+ II = (2.2)	Maruyama <i>et al.</i> , 2001 Inoue <i>et al.</i> , 2009
Taiwan	B S	De compagnie Errants Sauvages	25/131 (19.1) 31/131 (23.7)	Type I : 7/25 (29.1) Type II : 3/24 (12.5)	Chang <i>et al.</i> , 2006

Tableau 4 : études de prévalence de l'infection féline par *B. henselae* en Australie et en Asie
B = Bactériologie ; **S** = Sérologie

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Pays	Type d'étude	Catégorie de population féline	Taux prévalence (%)	Génotype (s)	Références
Danemark	B	De compagnie De fourrière	8/44(18.2) 13/49(26.5)	Type I : 1/21 (5) Type II : 20/21(95)	Chomel <i>et al.</i> ,2002
	S	De compagnie De fourrière	42/92(45.6)		
	B	Errants	11/25 (44)	Type II : 11/11 (100)	Engbaek <i>et al.</i> , 2004
Norvège	B	De compagnie	0/100 (0)	N.D	Bergh <i>et al.</i> , 2002
	S	De compagnie	1/100 (1)		
Suède	S	De compagnie	3/292 (1)		Hjlem <i>et al.</i> , 2002
	B	De compagnie	2/91 (2.2)	Type II : 2/2 (100)	Engval <i>et al.</i> ,2003

Tableau 5 : études de prévalence de l'infection féline par *B. henselae* en Europe du nord
B = bactériologie ; **S** = Sérologie

Pays	Type d'étude	Catégorie de Population féline	Taux de prévalence (%)	Génotype (s)	références
Allemagne	S	De compagnie	107/713 (5)		Haimerl <i>et al.</i> , 1999
	B	De compagnie	13/100 (13)	N.D	Sander <i>et al.</i> , 1997
	B	De compagnie Errants	1/97 (1) 19/96 (18.7)	Type I : 1/20 (5) Type II :18/20 (90)	Arvand <i>et al.</i> , 2001
Autriche	S	De compagnie	32/96 (33.3)		Allerberger <i>et al.</i> , 1995
Rép. Tchèque	B	De compagnie Errants De fourrière	0/34 (0) 4/6 (66.6) 1/21 (5)	Type II :5/5(100) (Type I : 0/5 (0))	Melter <i>et al.</i> , 2003

Tableau 6 : études de prévalence de l'infection féline par *B. henselae* en Europe centrale
B = bactériologie ; **S** = Sérologie

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Pays	Type d'étude	Catégorie de population féline	Taux de prévalence (%)	Génotype (s)	Références
Espagne	S	De propriétaire	34/115 (29.6)		Pons <i>et al.</i> , 2005
Italie	S	Errants	553/1416 (39)	N.D	Fabbi <i>et al.</i> , 2004
	B		361/1585 (23)		
	B	Errants	140/769 (18)	TypeI:27/131(20.6) TypeII:80/131(61.1)	Fabbi <i>et al.</i> , 2004
	S	Errants	207/540 (38)	N.D	Ebani <i>et al.</i> , 2002
	B	De propriétaire	0/28 (0)	N.D	
Emilie-Romagne	S	De propriétaire	98/427 (23)		Cabassi <i>et al.</i> , 2002
	B	De propriétaire	24/248 (9.7)		
Pologne	S	De fourrière	31/36 (86)		Podsiadly <i>et al.</i> , 2003
Portugal	S	De propriétaire	1/ 14 (6.7)		Childs <i>et al.</i> , 1995
Turquie	B	Errants	10/102 (9.8)	N.D	Celebi <i>et al.</i> , 2008
	S	De propriétaire	11/154 (7.1)		

Tableau 7 : études de prévalence de l'infection féline par *B. henselae* en Europe du sud
B = bactériologie ; **S** = Sérologie

Pays	Type d'étude	Catégorie de population féline	Taux de prévalence (%)	Génotype (s)	Références
France	B	De propriétaire	72/436 (16.5)	TypeI :11/72(15.3) Type II : 36/ 72(50)	Gurfield <i>et al.</i> , 2001
	B	De propriétaire	8/99 (8.1)	Type I : 6/8 (75) Type II : 0/8 (0)	Rolain <i>et al.</i> , 2004
Nancy	B	Errants	50/94 (53)	Type I : 17/ 50 (34) Type II : 18/ 50(36)	Heller <i>et al.</i> , 1997
Marseille	B	Errants	38/61 (62.3)	TypeI : 15/38(39.5) Type II : 7/38(18.4)	La Scola <i>et al.</i> , 2002
Grande Bretagne	S	De propriétaire	28/ 69 (40.6)		Barnes <i>et al.</i> , 2000
	S	Sauvages	33/79 (41.8)		
	B	De propriétaire	40/351 (11.4)	N.D	Laycock <i>et al.</i> , 2001
	B	De propriétaire	34/360 (9.4)	TypeI : 2/34 (6) Type II : 30/34 (88)	Birtles <i>et al.</i> , 2002
Pays Bas	B	De fourrière	25/113 (22)	Type I :6/25 (24) Type II : 10/25 (40)	Bergmans <i>et al.</i> , 1997
	S	De fourrière De propriétaire	56/113 (50) 28/50 (56%)		
Suisse	S	De propriétaire	60/728 (8.3)		Glaus <i>et al.</i> , 1997

Tableau 8 : études de prévalence de l'infection féline par *B. henselae* en Europe de l'ouest
B = bactériologie ; **S** = Sérologie

Au bilan, ces études de prévalence de l'infection féline par *B. henselae*, menées dans différentes régions du monde montrent que :

- dans tous les pays où l'infection à *B. henselae* est recherchée, elle est mise en évidence ;
- la fréquence d'infection semble plus élevée chez les chats errants et de fourrière que chez les chats de compagnie ;
- sauf en Asie du SE et en Algérie, les chats hébergent beaucoup plus souvent le génotype II que le génotype I.

F.2. Modes et voies de transmission:

F.2.1. Transmission de chat à chat:

F.2.1.1. Rôle central de la puce :

Au sein de la population, la transmission de *B. henselae* semble être assurée principalement par la puce du chat, *Ctenocephalides felis*.

Le rôle central de *Ctenocephalides felis* dans la transmission de *B. henselae* au sein des populations félines a été mis en évidence pour la première fois par Chomel *et al* en 1996. Des chats IOPS dépourvus de puces ont été mis en contact avec les puces gorgées sur les chats infectés. Une bactériémie asymptomatique a été mise en évidence chez les chats 2 à 6 semaines plus tard, qui pouvait durer 11 à 12 semaines et parfois plus d'un an, avec des phases d'intermittence. La charge bactérienne pourrait atteindre 10^4 à 10^6 bactéries /ml de sang. Dans la même étude, Chomel *et al* ont pu détecter également par PCR, l'ADN de *B. henselae* chez 34% des puces prélevées sur les 47 chats.

Ces expériences plaident en faveur d'une transmission arthropodienne par *Ctenocephalides felis*.

F.2.1.2. Autres sources et modes de transmission :

Outre les puces, Guptill n'exclut pas le fait que les chats puissent devenir bactériémiques après l'ingestion de petits rongeurs infectés par *B. henselae* (Guptill *et al.*, 1998).

Chomel *et al.* (1996) ont montré qu'en revanche aucune transmission horizontale (contact direct) de chat à chat n'est obtenue sans intervention des puces et n'ont pu mettre en évidence de transmission verticale (de la mère à son foetus).

Les études ultérieures (Abbott *et al.*, 1997 ; Chomel *et al.*, 2002 ; Rolain *et al.*, 2003 ; Kordick *et al.*, 1995) concordent avec ces conclusions.

F.2.2. Transmission Chat-Homme :

En ce qui concerne la transmission de *B. henselae* du chat vers l'homme, les auteurs s'accordent sur le fait que ce sont les contacts par griffures ou morsures qui sont en cause, les griffes ou la salive étant souillées lors de la toilette. Une éventuelle transmission à l'homme par piquûre de puce semble tout à fait anecdotique pour certains auteurs tels que Foley *et al.*, (1998). Toutefois, il faut signaler le fait que quelques patients atteints de MGC n'avaient pas été exposés à des chats ou d'autres animaux (Gieger *et al.*, 1998). Notons également que des cas de MGC ont été consécutifs à des griffures de chien et un cas à des griffures de singe (Gieger *et al.*, 1998).

F.3. Facteurs favorisant la transmission:

Il s'agit de facteurs intrinsèques et extrinsèques qui sont liés essentiellement à l'hôte réservoir (le chat), à son vecteur (la puce du chat) ainsi qu'aux conditions climatiques qui jouent un rôle dans l'abondance de ce dernier. En effet, l'existence d'une phase de bactériémie chez le chat est fortement associée à plusieurs facteurs :

- à l'âge du chat: de nombreuses études ont montré que les chatons et les chats âgés de moins de trois ans sont plus fréquemment bactériémiques que les chats plus âgés (Breitschwerdt *et al.*, 2000 ; Arvand *et al.*, 2001 ; Chomel *et al.*, 1995). La bactériémie chez les chats âgés de moins de 1 an en Espagne est de l'ordre de 12.1% (Pons *et al.*, 2005); 13% en Allemagne (Sander *et al.*, 1997) et 19% en France (Heller *et al.*, 1997).

- au mode de vie des chats : les chats errants et les chats provenant de fourrières sont plus susceptibles d'être bactériémiques que les chats domestiques vivant avec un propriétaire (Gieger *et al.*, 1998).

En effet, en Australie, 40% des chats errants testés sont bactériémiques contre 16% des chats domestiques (Chomel *et al.*, 1997 ; Gieger *et al.*, 1998). Une autre étude réalisée à Baltimore, sur une population de chats regroupant des chats sauvages, des chats domestiques et des chats malades de cliniques vétérinaires a montré que 14.7% des chats testés (592 chats) avaient des anticorps anti-*B. henselae* et/ou *B. quintana* et que les chats sauvages présentaient le taux de prévalence le plus élevé (Gieger *et al.*, 1998). En France, Heller *et al.*(1997) ont observé un taux de bactériémie à *B. henselae* de 53% chez les chats errants de la région parisienne. Les chats errants ainsi que les chats provenant de fourrières sont les plus exposés à l'infection, en lien avec un taux d'infestation plus élevé par des puces et/ou du fait de contacts plus nombreux avec d'autres chats eux-mêmes parasités. Cette relation entre la prévalence de l'infection par *B. henselae* (bactériémie et sérologie) et le mode de vie des chats a été également confirmée par d'autres études dans d'autres régions du monde (**Tableaux 4-8**).

- Les facteurs climatiques jouent aussi un rôle très important dans la transmission du pathogène. Une étude de prévalence basée sur la sérologie a été réalisée sur 628 chats domestiques par Jameson *et al.* en 1995 dans 33 régions géographiques des USA et dans plusieurs régions de l'Ouest du Canada. Cette étude a suggéré que la séroprévalence de l'infection à *B. henselae* serait influencée par le climat et qu'elle serait à la fois corrélée à la température et au niveau des précipitations annuelles. Ces variations de la prévalence en fonction du climat sont également corrélées à la répartition des arthropodes qui jouent le rôle de vecteur pour *B. henselae*. Le taux de prévalence globale est de l'ordre de 27.9% et si on s'intéresse au taux de prévalence par région, on obtient une grande disparité avec :

- d'une part, 54.6% dans le Sud-Est des Etats-Unis, à Hawaii, en Californie ; 47.4% dans des régions du Nord-Est ; 40.0% dans les régions du sud ; 34.3% dans le centre et 36.7% dans la zone Pacifique ;

- d'autre part, 3.7% en Alaska, 5.0% dans les grandes plaines des montagnes rocheuses et 6.7% dans le Middle West (**cf. figure 12**).

Une autre étude menée en Californie a établi que 40% des chats testés sont bactériémiques (Chomel *et al.*, 1995).

D'après ces études, les taux élevés de séroprévalence seraient donc associés à un climat chaud et humide (Jameson *et al.*, 1995). En outre, 60% des cas de MGC sont signalés entre les mois de septembre et janvier, période pendant laquelle les chats domestiques vivent davantage à l'intérieur et peuvent avoir plus de contacts avec leur maître (Gieger *et al.*, 1998).

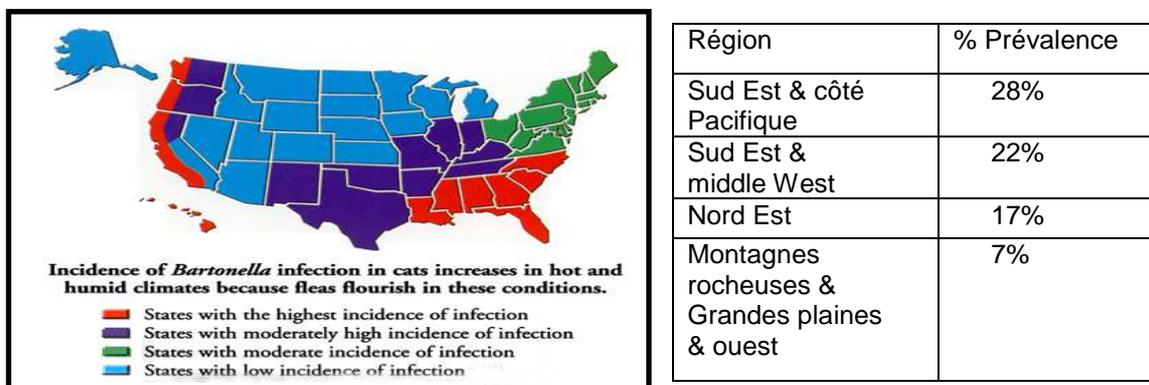


Figure 12 : Prévalence de l'infection humaine par *B. henselae* dans les différentes régions d'Amérique du nord

F.4. Facteurs de gravité de la maladie chez l'Homme :

Ces sont d'une part les facteurs qui favorisent l'expression clinique chez les hôtes sensibles, d'autre part des facteurs liés à la bactérie.

- Groupes à risque : les personnes à risque sont essentiellement les enfants, les personnes immunodéprimées et les personnes droguées par voie intraveineuse.

➤ Les enfants :

55 à 80% des cas de MGC diagnostiqués correspondent à des patients de moins de 10 ans (Hamilton *et al.*, 1995 ; Jackson *et al.*, 1993 ; Zangwill *et al.*, 1993 ; Ben-Ami *et al.*, 2005) (**cf. figure 13**).

Il faut signaler également que la MGC est la première cause d'adénite chronique bénigne chez les enfants et les jeunes adultes (Chomel *et al.*, 1997). Dans une étude récente, Asano *et al.* (2010) ont montré une prévalence élevée

des d'anticorps de classe IgG et IgM chez les enfants atteints de lymphadénite cervicale.

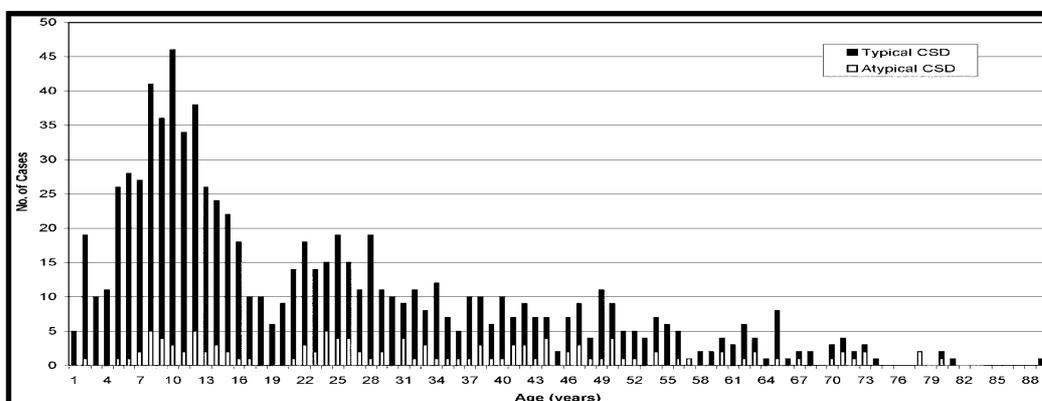


Figure 13: Distribution des formes typiques et atypiques de la MCG réalisée chez 846 patients en fonction de l'âge (Ben-Ami *et al.*, 2005)

➤ Les immunodéprimés :

Chez les personnes immunodéprimées, *B. henselae* peut provoquer une angiomatose bacillaire. Cette maladie a été décrite pour la première fois par Stoler *et al.*, en 1983 chez un sidéen.

Depuis, l'association entre cette maladie et le stade SIDA chez des immunodéprimés séropositifs pour *B. henselae* a été évoquée de multiples fois dans la littérature (Plettenberg *et al.*, 2000 ; Blanco *et al.*, 1999 ; Pape *et al.*, 2005 ; Mohle-Boetani *et al.*, 1996).

En outre, les personnes ayant subi une transplantation et suivant un traitement à base d'immunosuppresseurs sont particulièrement exposées aux maladies provoquées par *B. henselae* (Juskevicius *et al.*, 2004)

➤ Facteurs liés à la bactérie :

Deux génotypes, I et II, ont été identifiés chez *B. henselae*, sur la base de différences de séquence portant sur le gène codant pour l'ARN 16S (Bergmans *et al.*, 1996). Comme le montrent les études épidémiologiques réalisées à ce jour (**tableaux 2-8**), dans différents pays, le génotype II est prédominant chez le chat à quelques exceptions près (essentiellement l'Asie du SE). Cependant, le génotype I semble plus fréquent chez l'homme, par exemple aux Pays-Bas (Bergmans *et al.*, 1996), ou encore en Australie où 76.5% des isolats humains

étaient de type I dans l'étude de Fournier *et al.*, 2002. Outre les arguments épidémiologiques en faveur d'une dichotomie apparente de distribution chez l'Homme et le chat selon le génotype, certaines expérimentations tendent à renforcer l'hypothèse de différences fonctionnelles notables au sein même d'un génotype, si elles proviennent respectivement de l'homme et du chat. Ainsi, Yamamoto *et al.*, 2002 ont montré que l'inoculation de chats IOPS avec une souche de génotype I d'origine féline avait des retombées très différentes (sur les plans clinique, immunologique, et bactériologique) de celles induites par l'inoculation d'une souche de génotype I d'origine humaine. Même si cette association entre génotype et maladie humaine n'est pas toujours la règle (cas de la France, où le génotype II a été trouvé majoritaire, dans 61.2% des cas de MCG (Zeiter *et al.*, 2002), il est particulièrement intéressant de souligner que chez l'homme, c'est bien le génotype I qui a été rencontré à ce jour dans la quasi- totalité des cas d'angiomatose bacillaire (Chang *et al.*, 2002)

G. Aspects synthétiques : cycle de *B. henselae* (cf. figure 14)

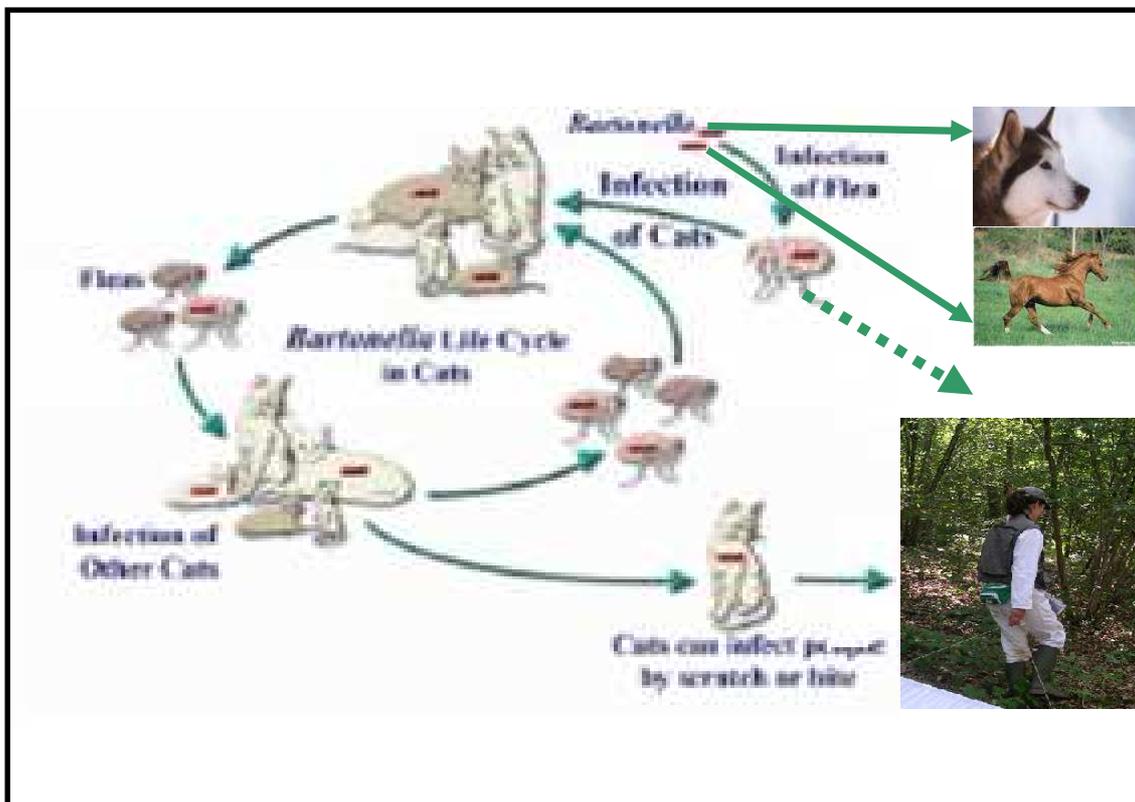


Figure14 : Cycle de transmission de *Bartonella henselae*

H. Diagnostic :

Le diagnostic des infections à *Bartonella* est complexe et s'est considérablement développé ces dernières années. L'approche diagnostique repose sur l'utilisation de plusieurs méthodes complémentaires. En effet, il n'existe pas de méthode qui soit à la fois assez sensible et spécifique et qui soit en même temps aisément accessible au diagnostic de routine.

Dans cette partie, je vais développer dans un premier temps le diagnostic épidémioclinique et dans un second temps le diagnostic de laboratoire qui repose sur des tests directs et indirects. La stratégie diagnostique sera fonction du contexte clinique et épidémiologique chez l'Homme et chez l'animal.

H.1. Diagnostic épidémioclinique:

Une MGC classique est relativement aisée à suspecter, sur la base des données cliniques et épidémiologiques. En revanche, dans les formes atypiques de MGC, à l'exception du syndrome de Parinaud, les manifestations de l'infection peuvent être très polymorphes et peu caractéristiques. Le contexte épidémiologique peut être particulièrement précieux pour conduire à une suspicion de bartonellose. Les critères de ce diagnostic, liés particulièrement à l'infection par *B. henselae*, seront évoqués à la fois pour l'Homme et pour l'animal :

H.1.1. Chez l'Homme :

Chez les patients jeunes et immunocompétents, un contact étroit avec un chaton (Karem *et al*, 2000), peut permettre à un clinicien d'établir un lien entre une forme classique de MGC et l'infection par *B. henselae*. L'association d'une papule et d'une adénopathie constitue un critère très fort permettant au clinicien de suspecter la maladie (Metzko-Cotter *et al*, 2003).

Chez les immunocompétents, le clinicien s'intéressera plus particulièrement aux atteintes du système nerveux central (méningites, encéphalites, méningo-encéphalites...) et aux troubles oculaires (rétinites, uvéites, syndrome oculoglandulaire de Parinaud).

Les patients atteints d'une valvulopathie, ou bien déjà porteur d'une prothèse valvulaire présentent un risque plus élevé d'endocardite provoqué par *B. henselae*. D'autres structures du cœur, comme le myocarde, peuvent également être atteintes (Brouqui *et al* 2001).

La péliose et/ou l'angiomatose bacillaires sont les manifestations cliniques les plus évocatrices d'une infection par *B. henselae* chez les immunodéprimés et permettent facilement à un clinicien d'émettre une suspicion de bartonellose à *B. henselae* (Karem *et al*, 2000).

H.1.2. Chez les animaux :

La suspicion clinique n'est envisageable que chez les espèces féline et surtout canine. Chez cette dernière, dans la plupart des cas, il s'agira d'atteinte cardiaque, oculaire voire hépatique (Chomel *et al*, 2003)

H.2. Sérologique :

La recherche des anticorps dirigés contre *B. henselae* fait appel soit à l'immunofluorescence indirecte (IFI), soit aux techniques immuno-enzymatiques représentées essentiellement par l'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), et le Western Blot (WB) (Barka *et al*, 1994; Maurin *et al*, 2002). Les antigènes utilisés peuvent être soit préparés par le laboratoire de diagnostic lui-même, de préférence sur culture cellulaire (cellules VERO ou cellules de lignée endothéliales humaines, infectées par *B. henselae*) (Zbinden *et al*, 1995), soit commercialisés sous forme de lames prêtes à l'emploi. L'IFI semble être la technique du choix (Sander *et al*, 2001). Cependant la sensibilité ainsi que la spécificité de ces différentes techniques sont variables selon les formes cliniques. Les patients manifestant des signes cliniques voient leurs taux d'Ig G et d'Ig M augmenter de façon significative, tandis que ceux souffrant d'une infection détectée un peu tardivement ou même d'une bactériémie prolongée mais asymptomatique ont des titres faibles ou nuls (Ueno *et al*, 1995 ; Nadal *et al*, 1995).

Le seuil de positivité pour les IgG, lors d'infection par *B. henselae*, est compris entre 1:64 et 1:256 selon les laboratoires, après au moins 2 à 3 semaines

d'infection. Un titre $\geq 1:20$ est considéré comme positif en Ig M. Actuellement, un titre d'IgG supérieur à 1:100 est considéré comme significatif d'une infection récente dans le diagnostic de la MGC alors qu'un titre supérieur ou égal à 1:800 est fortement corrélé à un diagnostic d'endocardite humaine ou animale. L'absence de réponse immunitaire humorale est notée chez environ 10% des patients atteints de MGC. C'est particulièrement le cas des personnes immunodéprimées atteintes d'angiomatose ou de péliose bacillaire.

La sensibilité de la technique ELISA est légèrement supérieure à celle de l'IFI (Barka *et al*, 1993).

La sérologie pose également un problème de spécificité puisqu'il existe des réactions croisées entre les espèces du genre *Bartonella* comme *B. henselae* et *B. quintana* (Jackson *et al*, 1996) et également entre le genre *Bartonella* et le genre *Chlamydia*, comme *C. pneumoniae* (Maurin *et al.*, 1997) ainsi qu'avec *Coxiella burnetii*, agent de la fièvre Q (La Scola *et al*, 1996).

La recherche des anticorps dirigés contre *B. henselae* est la méthode la plus fréquemment utilisée pour le diagnostic chez l'Homme. Ceci explique pourquoi si peu d'isolats d'origine humaine sont disponibles. Chez les espèces réservoirs, en particulier chez l'espèce féline, la sérologie est d'intérêt plus limité. En effet, on attend du laboratoire qu'il indique si le chat est bactériémique et, de ce fait, présente un risque pour son entourage, question à laquelle la sérologie ne pourra répondre.

Sur une base sérologique, Drancourt *et al.*, ont identifié en 1996 deux principaux sérotypes : *B. henselae* Houston 1 et *B. henselae* Marseille.

H.3. Diagnostic bactériologique

H.3.1. Isolement :

La culture de *B. henselae* peut être effectuée à partir du sang prélevé sur EDTA ou des tissus biologiques (ganglions lymphatiques, peau (pus), foie, moelle osseuse, valve) de patients infectés. L'isolement se fait soit par ensemencement sur milieux gélosés au sang soit en culture cellulaire (cellules endothéliales, Vero, HeLa, L 929, cellules de carcinomes humains) (Euzéby, 2002). La culture en milieu cellulaire reste toutefois d'usage moins répandu que

la culture sur gélose au sang (Welch *et al.*, 1999 ; Welch *et al.*, 1993). Une autre technique a été mise au point en 2005 par Maggi *et al.*, (2005) qui consiste en une pré-culture utilisant un milieu liquide relativement complexe.

La présence de sang frais dans le milieu de culture permet de l'enrichir en hème qui est nécessaire à la croissance des bartonelles. D'autres milieux ont été également proposés, comme les géloses de Mc Conkey ou les bouillons cœur-cerveau (Drancourt *et al.*, 1993).

L'isolement de *B. henselae* à partir des échantillons sanguins prélevés chez le chat réservoir est plus facile et satisfaisant que lorsqu'on cherche à isoler les bartonelles chez des hôtes accidentels, plus particulièrement chez l'homme (Brenner *et al.*, 1997).

La culture à partir d'autres prélèvements et notamment des ganglions est beaucoup moins efficace, car au moment de la ponction, le ganglion est en stade inflammatoire et les bactéries sont inhibées par les molécules toxiques présentes dans ce ganglion. La culture est aussi possible à partir des lésions d'angiomatose bacillaire, mais la contamination des milieux par la flore cutanée peut gêner voire compromettre la culture. Chez les personnes souffrant d'une endocardite et qui sont sous traitement antibiotique, la probabilité d'isolement est très faible : elle varie de 0% à 80% selon que la personne est sous traitement ou non (La Scola *et al.*, 1999).

La sensibilité des méthodes de culture reste inférieure à celle de la sérologie et de l'amplification génique chez l'homme, en revanche chez les félinés la culture est la méthode la plus sensible. Quelle que soit l'origine de prélèvements, la durée d'incubation des cultures est assez longue et incompatible avec l'urgence thérapeutique hospitalière. En outre, cet inconvénient expose les cultures à des contaminations fongiques et bactériennes masquant la présence des bartonelles.

L'identification de la bactérie est basée sur l'aspect macroscopique et microscopique et sur la biologie moléculaire, seule susceptible d'établir définitivement l'identité de l'espèce.

H.3.2. Méthodes moléculaires:

L'amplification directe par PCR est la méthode la plus efficace et la plus rapide pour la mise en évidence du genre *Bartonella* en raison des difficultés de la culture.

L'amplification de ce genre est réalisée soit par PCR simple soit par PCR nichée ou semi-nichée. Elle s'effectue sur l'ADN pur ou bien directement sur les échantillons (ganglions lymphatiques, valves cardiaques...).

L'amplification de divers gènes ou portions des gènes a été développée, ces segments étant spécifiques soit de genre soit d'espèce. Les gènes les plus souvent amplifiés sont : *gltA* (citrate synthase) (Rolain *et al.*, 2003 ; Joblet *et al.*, 1995 ; Holmberg *et al.*, 1999), *ITS* (spacer entre le 16S et le 23S) (Houpikian *et al.*, 2001 ; Roux *et al.*, 1995 ; Renesto *et al.*, 2001) *ribC* (Chaîne α riboflavine synthase) (Bereswill *et al.*, 1999 ; Johnson *et al.*, 2003), *groEL* (protéine de choc thermique) (Zeaiter *et al.*, 2002), *rpoB* (sous unité β de l'ARN polymérase) (Renesto *et al.*, 2001), *ftsZ* (protéine de division cellulaire) (Zeaiter *et al.*, 2002 ; Ehrenborg *et al.*, 2000), et le gène codant pour l'ARN 16S. La PCR quantitative en temps réel utilisant des sondes spécifiques est également utilisée.

I. Traitement :

De nombreux antibiotiques paraissent très actifs sur milieux gélosés vis-à-vis de *B. henselae* (Ives *et al.*, 1997 ; Rolain *et al.*, 2004).

In vivo, un traitement à base de tétracycline, de doxycycline et d'érythromycine semble réduire le nombre de bactéries circulant dans le sang d'un chat bactériémique.

Chez le sujet immunocompétent et présentant une MGC, les meilleurs traitements sont ceux à base de rifampicine, de ciprofloxacine, de cotrimoxazole, de gentamicine, d'érythromycine et de doxycycline. Les associations érythromycine-rifampicine ou doxycycline-rifampicine semblent également donner de bons résultats. Cependant, un traitement antibiotique n'est pas forcément préconisé dans ces cas bénins, qui se résolvent le plus souvent spontanément après quelques semaines.

En revanche, lors d'infections survenant chez un sujet immunodéprimé, le traitement est nécessaire et doit débiter par des injections intraveineuses. Les antibiotiques donnant les meilleurs résultats sont l'érythromycine et la doxycycline, éventuellement utilisées en association avec de la rifampicine ou de la gentamicine.

En cas d'endocardite, l'administration de doxycycline 200 mg/j par voie intraveineuse ou orale est préconisée pour une durée minimum de six semaines, en association à la gentamicine (1mg/Kg toutes les huit heures) pendant 14 jours. Une étude rétrospective sur 101 patients présentant une endocardite a montré un bénéfice certain de l'utilisation des aminosides (Raoult *et al.*, 2003).

J. Prévention :

Dans leur étude, Wise *et al.* (2002) ont montré que le nombre d'habitants vivant dans des pays industrialisés (plus particulièrement en Amérique) et possédant un chat comme un animal de compagnie, n'a pas cessé d'augmenter durant les deux dernières décennies et que ce nombre dépasse même actuellement celui des habitants possédant des chiens. D'après cette étude, 70 millions de chats de compagnie occupaient le tiers des habitations en Amérique. En Europe, le nombre de chats de compagnie est de l'ordre de 47 millions. Ceci reflète l'importance du réservoir de *Bartonella*. Eu égard aux pathologies provoquées par *B. henselae*, certaines mesures sont nécessaires pour lutter contre l'infection par ce pathogène, plus particulièrement, en ce qui concerne les personnes à risque (enfants, personnes âgées, immunodéprimés). La prévention de l'infection chez les réservoirs repose sur la lutte contre les vecteurs, particulièrement les puces dans le cas de l'infection par *B. henselae* grâce à l'emploi de pulicides. Ce traitement minimise le risque de transmission à l'Homme mais aussi les risques de transmission entre chats (et du chat au chien). La prévention de l'infection par *B. henselae* chez l'Homme concerne en premier lieu les personnes à risque et repose sur des conseils pour le choix d'un animal de compagnie (chat adulte, ne sortant pas, provenant d'un élevage sain et contrôlé si possible et soumis à un traitement

anti-puces régulier). Si des personnes immunodéprimées souhaitent adopter un chat, il est conseillé de n'acquérir que des chats séronégatifs. La prévention repose aussi sur une hygiène stricte des propriétaires de chats. Par exemple, il est recommandé de se laver les mains après avoir touché les animaux. En cas de griffure ou de morsure par un chat, Il est conseillé d'effectuer une consultation précoce afin d'éviter d'éventuelles complications cliniques.

Du fait de l'inefficacité relative de l'antibiothérapie pour tarir la bactériémie chez le chat, le développement d'un vaccin préventif semble être nécessaire pour éradiquer les bartonelles chez les réservoirs. Cependant la mise au point d'un vaccin félin reste encore difficile à réaliser à cause de la diversité des espèces infectant les chats, et des souches au sein d'une espèce, et de l'absence de protection croisée entre espèces voire entre types (Boulouis *et al.*, 2005).

II. Typage moléculaire des bactéries : Cas de *B. henselae*

Une fois la bactérie identifiée, le typage bactérien est possible qui vise à différencier les souches au sein d'une même espèce bactérienne. Face à une infection bactérienne, deux démarches sont essentielles à suivre ; la première consiste à identifier l'agent pathogène responsable de la maladie pour la prise en charge immédiate du patient (cas des infections nosocomiales) ; et la seconde permet de chercher son origine afin si c'est possible de comprendre la chaîne de transmission de ce dernier et d'identifier l'éventuelle source de contamination.

En général, les méthodes de typage sont essentielles pour comprendre l'épidémiologie des infections bactériennes dans le but de détecter les voies et la source de l'infection, connaître les souches épidémiques et endémiques et prévenir la transmission de l'infection entre les patients.

Des méthodes phénotypiques de typage ont été mises en œuvre dès le début de développement de la microbiologie. Elles sont encore utilisées, notamment le sérotypage (ex. *Salmonella*), le biotypage (ex. : *Brucella*), la détermination du profil de sensibilité aux bactériocines ou le lysotypage (ex. : *Brucella*). Pour *B. henselae*, le sérotypage a longtemps constitué la seule technique de typage

envisageable, mais elle n'a permis de caractériser que deux sérotypes, Houston 1 et Marseille. La mise à portée de nombreux laboratoires des outils de biologie moléculaire a ouvert la voie au développement des techniques dites de génotypage, y compris pour *B. henselae*. L'avènement de la PCR, ainsi que l'expansion rapide des données de séquençage des génomes complets depuis 1995, date de la publication de la première séquence complète d'un génome bactérien, celui de *H. influenzae*, ont contribué à l'accélération de cette tendance.

En outre, tous ces éléments ont permis d'ouvrir la voie à l'étude plus exhaustive des marqueurs polymorphes.

A. Critères de choix d'une technique de typage moléculaire :

Le choix d'une technique de typage moléculaire est basé sur plusieurs critères, dont les principaux sont :

- La typabilité :

La typabilité est la capacité à obtenir des résultats positifs non ambigus pour chaque souche analysée. Cette qualité, caractéristique d'une espèce bactérienne, est en rapport direct avec les possibilités de la technique étudiée. Pour qu'une technique d'épidémiologie moléculaire puisse être utilisable en routine, il faudra que le plus grand nombre possible d'espèces bactériennes soient typables par celle-ci.

$$T = N_t / N$$

Avec :
 T : Typabilité
 N_t : nombre d'isolats typés
 N : Nombre total d'isolats à typer

- La reproductibilité :

La reproductibilité est la capacité de la technique à produire le même résultat sur la même souche testée à plusieurs reprises. Ce caractère dépend des capacités de la méthode mais aussi beaucoup de la souche étudiée

puisque certaines souches peuvent présenter des variations génétiques rapides dans le temps, entraînant des modifications du profil obtenu. Ce critère est très important pour la comparaison des résultats entre laboratoires et pour la mise en place de bases des données qui doivent reposer sur des données solides.

$$R = N_r / N$$

Avec :

R : Reproductibilité

N_r : Nombre de bactéries testées deux fois et ayant fourni le même résultat

N : Nombre de souches testées deux fois.

- Le pouvoir discriminant :

Le pouvoir discriminant est la capacité de la méthode à différencier des souches non épidémiologiquement reliées. Il faut souligner là encore, que ce caractère dépend non seulement des possibilités de la méthode elle-même mais aussi de la diversité génétique de l'espèce. Idéalement, une méthode de typage identifiera chaque souche comme unique. Pratiquement, la méthode peut être prise en compte lorsque la probabilité que deux souches non apparentées appartiennent au même type est inférieure à 5%. Plus le pouvoir discriminant augmente, plus la méthode est capable, par définition, de détecter des variations minimales ou moins fréquentes. Pour étudier cette qualité, il est indispensable de comparer un nombre élevé d'isolats du terrain ainsi que des souches témoins ayant précédemment fait l'objet d'analyses. Certaines bactéries, notamment les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline ou les souches d'*Haemophilus influenzae* de type b sont dérivées d'un faible nombre de clones, rendant les souches responsables d'épidémie indifférenciables des souches sporadiques, quelle que soit la technique utilisée (Kreiswirth *et al.*, 1993), sauf par la méthode la plus récente de séquençage haut débit de l'ensemble du génome, récemment testée pour des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (Harris *et al.*, 2010). Le pouvoir discriminant est évalué par un index de diversité (I.D), connu initialement comme l'indice de Simpson établi dans le cadre de l'étude de l'écologie des

populations (Simpson, 1949) et ensuite repris par Hunter et Gaston (1988) en vue de son application à l'étude des populations microbiennes.

$$\text{I.D.} = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S nj(nj-1)$$

Avec :

N : Nombre total d'individus testés

n_j : Nombre n d'individus ayant l'allèle j

S : Nombre total d'allèles au sein de la population d'individus testés

L'évaluation d'une technique d'épidémiologie moléculaire selon ces différents critères nécessite des comparaisons avec des résultats obtenus par d'autres techniques. Mais il n'en existe pas qui possèdent l'ensemble de ces qualités et qui pourraient être utilisées comme technique de référence ou encore comme « Gold Standard » (Abreit, 1995). Enfin, la facilité d'interprétation des résultats obtenus, le coût, la rapidité et la facilité de la réalisation sont des éléments importants à considérer pour évaluer le développement possible de la technique dans des laboratoires d'analyses hospitaliers et pas uniquement dans un contexte de laboratoire de recherche.

Le principe des méthodes de génotypage consiste à détecter le polymorphisme qui peut être de nature et d'échelle variable, allant de grands réarrangements génomiques (exemple : séquences répétées dispersées et/ou localisées sur un locus) à la mutation ponctuelle en passant par des délétions, insertions ou inversions de courtes séquences. Selon le niveau de variabilité au sein d'une espèce bactérienne, différentes techniques ont été proposées afin de différencier les souches entre elles.

Dans la littérature, plusieurs méthodes de typage ont été décrites chez *B. henselae* dont principalement ERIC-PCR, AP-PCR, REP-PCR, ECP, MLST, MST.

B. Catégories de méthodes :

Ces méthodes peuvent être classées en deux classes :

B.1. Méthodes de première génération:

Cette catégorie des techniques vise le génome entier des bactéries tels que l'ECP, AFLP, AP-PCR ...La plupart de ces techniques ont été développées à partir de 1990. A l'exception de l'ECP, elles sont aujourd'hui abandonnées, et n'ont parfois été utilisées que par leurs propres concepteurs. Ces techniques sont les suivantes :

α. ECP= PFGE :

Cette technique a été développée par Schwartz et Cantor en 1984. Elle a longtemps été considérée comme la méthode de choix pour le typage moléculaire de nombreux pathogènes. Elle consiste à séparer les grandes molécules d'ADN (> 50 kb) que l'électrophorèse classique en gel d'agarose ne permet pas de résoudre, même en diminuant au maximum la concentration d'agarose. Il s'agit d'une technique de RFLP-ECP qui est basée essentiellement sur la digestion du génome bactérien entier par des enzymes de restriction coupeurs rares. Il en résulte un nombre limité de segments de grande taille, très difficiles à faire migrer, d'où le champ pulsé. Les bactéries sont enrobées dans l'agarose avant de subir une étape de lyse dans le but de préserver l'intégrité physique de l'ADN. Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel, augmentant ainsi la probabilité que la molécule d'ADN soit orientée de façon à passer à travers les mailles du gel. Cette probabilité dépend de la taille de la molécule et la vitesse de migration d'un fragment d'ADN varie dans le sens inverse de sa taille. Les profils de restriction des différents isolats sont comparés entre eux pour déterminer leur proximité. Des essais de standardisation et d'interprétation des profils ont été réalisés dans le but de déterminer la relation entre les souches étudiées (Tenover *et al.*, 1995) **(Tableau 9)**.

Catégorie de profil	différences entre deux souches		Interprétation épidémiologique
	Nombre de bandes différentes	Nombre d'événements génétiques	
Identiques	0	0	Même épisode infectieux
Très proches	2-3	1	Probablement impliquées dans le même épisode infectieux
« Assez » proches	4-6	2	Possiblement impliquées dans le même épisode infectieux
Différents	≥7	≥3	Ne fait pas partie de l'épidémie

Tableau 9 : Recommandations proposées pour l'interprétation épidémiologique des profils ECP (Tenover *et al*, 1995)

Chez *B. henselae*, la technique d'ECP a été utilisée fréquemment (Arvand *et al.*, 1998, 2001 ; Sander *et al.*, 1998 ; Maruyama *et al.*, 2001, 2004 ; Chang *et al.*, 2002 ; Arvand *et al.*, 2007). *SmaI* et *NotI* sont les endonucléases les plus souvent employées. La digestion par *NotI* a donné lieu à 4 à 6 bandes (Maruyama *et al.*, 2001 ; Kabeya *et al.*, 2002 ; Arvand *et al.*, 2006), alors que l'utilisation de *SmaI* a permis d'avoir 14 à 17 fragments.

Arvand *et al.* (2007) ont testé d'autres enzymes de restriction telles que *ApaI*, *Eco52I* et *XmaJI*. La digestion de 20 souches de *B. henselae* par ces trois enzymes a permis de distinguer 9 à 11 fragments avec *Apa I*, 12 à 14 fragments avec *Eco I* et 15 à 17 fragments avec *Xma JI*. La taille des bandes obtenues est variable selon les endonucléases. Elle varie de 50 à 650 Kb quand la digestion est effectuée par *NotI*. En revanche, celle réalisée par les autres enzymes donne des bandes ayant des tailles comprises entre 30 et 300 Kb. Dans cette étude, Arvand & Viezens (2007) ont pu identifier 13 types avec *NotI*, 6 types avec *SmaI*, 5 types avec *ApaI* et *XmaJI* et 4 types avec *Eco52I*. Ils ont également montré la corrélation entre les types obtenus par ECP et les génotypes I/II.

β. AP-PCR :

Cette technique a été décrite pour la première fois en 1990 par Williams. Elle permet d'amplifier par PCR différentes portions du génome d'une façon arbitraire. Le principe de cette technique est basé sur l'utilisation d'amorces

courtes et aléatoires, qui s'hybrident avec l'ADN chromosomique. Le nombre et la localisation des zones d'hybridation des amorces varient d'une souche à une autre au sein de la même espèce. Les fragments amplifiés sont séparés par électrophorèse et les profils obtenus analysés et comparés entre eux. Cette technique présente certaines limites dont les plus importantes sont la reproductibilité entre laboratoires et la standardisation (variation des conditions de la PCR).

Sander et al (1997) ont pu distinguer 4 différents profils sur un ensemble de 17 souches testées. Dans cette étude, une seule amorce a été utilisée, M13, qui a été décrite pour la première fois par Gräser *et al* (1993).

B. 2. Méthodes de deuxième génération :

Contrairement aux techniques de première génération, les techniques de deuxième génération s'intéressent à des zones limitées du génome. Elles peuvent ainsi être basées soit sur le séquençage de segments génomiques (gènes de ménage ou spacers) dans le but d'identifier des mutations ponctuelles, soit sur l'analyse de polymorphisme de répétitions en tandem. Dans cette partie, seront développées dans un premier temps les techniques MLST et MST puis dans un second temps la technique MLVA sur laquelle le travail de cette thèse est centré.

α. Amplification partielle de l'ADN codant pour l'ARN 16S:

Le gène 16S r RNA est utilisé comme marqueur phylogénique du fait de son universalité liée à son rôle clé dans la traduction de l'ARNm en protéine, de sa structure mosaïque incluant des régions conservées, variables et hypervariables, et de son abondance dans la cellule (Woese, 1987). L'amplification de ce gène a permis la détection et la reconnaissance fiable de certains agents non ou difficilement cultivables. Bergmans *et al.* (1996) ont décrit, dans une étude basée sur l'analyse de la séquence partielle du gène 16S rRNA, deux génotypes différents, I et II, qui diffèrent par trois nucléotides localisés entre 172 et 175 dans le gène 16S rRNA.

β. ERIC- PCR :

Ces catégories de séquences ont été décrites pour la première fois dans le génome d'*E. Coli*, de *S. Typhimurium* et d'autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae* (Sharples *et al*, 1990 ; Hulton *et al*, 1991). Ces sont des éléments de 126 pb, localisés dans des régions intergéniques et seulement dans des régions codantes. Le nombre de copies de ce type de séquence varie au sein de l'espèce. Ce nombre est estimé à environ 30 copies chez *E. coli* et à environ 150 copies chez *S. enterica* (Hulton *et al*, 1991). Elles permettent également la formation de structures secondaires stables de type tige–boucles (Hairpin). Versalovic *et al.* (1991) ont étudié la distribution de séquences de type REP et ERIC dans différents génomes bactériens et ils ont constaté que ces séquences sont suffisamment conservées et présentent des amorces consensus.

Des séquences de type ERIC ont été cherchées chez *B. henselae* (Sander *et al.* (1997). Dans cette étude, les auteurs ont pu identifier 4 profils différents (E1, E2, E3 et E4) sur un nombre total de 18 souches testées. Les profils obtenus présentent approximativement entre 7 et 11 bandes par souche.

γ. REP-PCR :

Les séquences de type REP sont appelées également PU pour Palindromic Units. Elles ont été découvertes en 1984 par Stern. Ces sont des séquences de 35 pb. Elles sont situées dans des séquences transcrites ainsi que dans des régions intergéniques d'un opéron (Higgins *et al*, 1982). Ces séquences pourraient avoir plusieurs rôles. Parmi eux, on peut citer leur rôle dans la terminaison de la transcription et la stabilisation du messager (Higgins *et al*, 1988). Dans le but de différencier des souches de *B. henselae* entre elles, deux principales études ont été réalisées (Sander *et al*, 1998 ; Rodriguez *et al*, 1995). Dans l'étude de Sander *et al*, les auteurs ont pu mettre en évidence la présence de 4 profils (R1, R2, R3 et R4) sur un nombre total de 18 souches testées. La deuxième étude a été réalisée sur 17 souches de *B. henselae* en combinant les résultats obtenus avec cette technique à ceux fournis par ERIC-PCR. Cette

combinaison a permis à Rodriguez *et al*, en 1995 d'identifier cinq profils différents.

δ. RFLP-SRFH :

Elle consiste en la comparaison des fragments d'ADN obtenus après digestion par des enzymes de restriction en ciblant un ou plusieurs gènes généralement assez conservés. Cette technique permet d'analyser le polymorphisme des fragments de restriction par hybridation sélective. Après restriction enzymatique de l'ADN, un élément répété du génome est choisi comme cible d'une sonde. Seuls les fragments possédant cette séquence seront donc visualisés. Le pouvoir discriminant de cette technique dépend de la séquence choisie comme étant reconnue par la sonde, déterminant ainsi le nombre de variabilités des fragments détectés. Parmi les gènes les plus fréquemment utilisés, figurent les opérons codant pour les ARN ribosomiaux (Engberg *et al.*, 1998), La conservation de ces gènes dans le monde microbien et leur présence en multiple copies chez la plupart des espèces bactériennes, notamment *E. coli*, *Klebsiella sp*, *Staphylococcus...* permet avec des profils d'une quinzaine de bandes, d'obtenir un bon pouvoir discriminant (Maslow *et al.*, 1993 ; Stull *et al.*, 1988). La reproductibilité de cette technique est excellente. Cependant, elle n'est pas utilisable lorsque ce gène est présent en faible nombre de copies comme c'est le cas chez les mycobactéries. Chez *B. henselae*, Matar *et al.* (1993) ont pu amplifier par PCR la séquence intergénique 16S-23S (ITS) de 10 isolats testés. Ensuite, les produits de PCR ont été digérés par deux enzymes de restriction (*AluI* et *HaeIII*) et séparés par électrophorèse. L'analyse des bandes a révélé la présence de 6 profils résultant de la digestion d'*AluI* et de 4 profils de celle de *HaeIII*.

ε. MLST :

Cette technique dérive de la technique MLEE (Multi-Locus Enzyme Electrophoresis) qui est basée sur l'analyse des différences de migration électrophorétique d'enzymes codées par différents allèles d'un gène donné.

Les gènes correspondants sont très conservés en situation clonale car la plupart codent pour des enzymes du métabolisme (gènes de ménage). L'analyse par MLST est basée sur le séquençage de fragments d'ADN appartenant à une série de portions internes de sept à neuf de ces gènes.

Il s'agit d'une technique récente, datant seulement d'une dizaine d'années (Maiden *et al.*, 1998).

Initialement, cette technique a été développée en bactériologie pour le typage de germes particulièrement virulents pour l'Homme tels que *Neisseria* (Maiden *et al.*, 1998), *Staphylococcus aureus* (Mark *et al.*, 2000) et caractérisés par une structure de population faiblement clonale, car dans ce contexte les échanges par recombinaison qui sont susceptibles de modifier les gènes à un ou deux loci dans certains clones instables n'empêchent pas à l'échelle de l'association de plusieurs gènes de ménage foncièrement stables de reconnaître les membres de ce clone (Spratt & Maiden, 1999). Elle a ensuite été étendue à des agents infectieux eucaryotes, haploïdes ou non, tels que *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus* (Davidson *et al.*, 2003 ;Bain *et al.*, 2007), ainsi qu'à de nombreuses autres bactéries.

La taille approximative de chaque segment de gène étudié est de l'ordre de 400 à 700 pb. Les séquences sont comparées aux séquences déjà rencontrées et les isolats sont classés en type de séquences ST (pour « Sequences types »). Cette technique est utilisée essentiellement pour des études de phylogénie (étude de la macro-évolution), vu la lenteur d'évolution des locus concernés. MLST est également employée pour des études épidémiologiques, dans le but de différencier les souches entre elles mais elle risque de ne pas être assez discriminante pour des études de traçabilité (micro-évolution), a fortiori s'il s'agit d'espèces à évolution essentiellement clonale chez qui ces gènes évoluent seulement ou presque dans le contexte de mutations neutres, pour les raisons évoquées ci-dessus. Par ailleurs, du fait de la nécessité de recourir au séquençage (2 fois 7/9 séquences à identifier pour chaque souche testée), cette technique reste encore trop coûteuse pour pouvoir être utilisée en routine dans des laboratoires d'analyse. La reproductibilité des résultats d'un

laboratoire à un autre représente un énorme avantage puisqu'il s'agit uniquement de classer les séquences. Les utilisateurs de cette technique ne rencontrent pas d'ambiguïté dans l'interprétation des résultats puisque ces derniers sont basés essentiellement sur la comparaison des séquences nucléotidiques et non sur le nombre ou la position des bandes comme avec les techniques présentant des profils de migration multibandes (cf. B. 2.b. REP-PCR).

Pour faciliter la comparaison des profils obtenus par MLST dans différents laboratoires pour différentes souches, des bases des données ont été développées (*Chang et al*, 2001). Actuellement, plus d'une trentaine de profils de souches sont regroupés dans des bases de données qui sont disponibles en ligne. On peut citer cinq principaux sites libres d'accès hébergeant dans telles bases de données: Pasteur MLST Databases, développée par l'institut de Pasteur à Paris (France) ; PubMLST développée par l'université d'Oxford au Royaume-Uni (l'Angleterre); MLST.net, développée au collège supérieur à Londres ; UCC MLST Database développée à l'institut de recherches environnemental (ERI) au collège (université) de Cork (Irlande) et EcMLST développée à l'université d'Etat du Michigan (Etats-Unis). « MLST Databases » qui est accessible sur le net à l'adresse suivante : www.mlst.net, est la base la plus ancienne. Elle a été créée initialement par Chan *et al* en 2001 et développée quatre ans plus tard par Aanensen et Spratt en 2005. Le concepteur de cette base offre aux utilisateurs la possibilité de soumettre leurs séquences et d'effectuer de nombreuses analyses tout en mettant à leur disposition divers logiciels.

Chez *B. henselae*, plusieurs études ont été réalisées par MLST dont la plus ancienne date de 2003, avec la mise au point de la technique par Iredell *et al*. Le nombre des gènes testés varie entre 7 et 9 chez cette espèce (Arvand *et al*, 2007). Lors du développement de la technique MLST chez *B. henselae*, neuf principaux gènes ont été testés: *16S rDNA*, *batR*, *eno*, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *nlpD*, *ribC* et *rpoB*. La plupart de ces gènes avaient déjà été utilisés pour la différenciation intra-espèce (*B. henselae*) ou inter-espèce (*Bartonella*) (Bereswill *et al.*, 1999 ; Birtles and Raoult, 1996 ; Zeaiter *et al.*, 2002a ; Zeaiter

et al., 2002b ; Zeaiter *et al.*, 2002c). La taille attendue des segments de gènes étudiés varie de 321pb à 522pb. La première étude a été réalisée sur un nombre total de 37 souches d'origine humaine (17 souches) et féline (20 souches), dont la majorité sont d'origine australienne. Les auteurs ont pu identifier sept profils différents en prenant en compte les neuf gènes cités ci-dessus. Comme on pouvait s'y attendre d'une espèce réputée avoir une évolution essentiellement clonale, les allèles étudiés ne présentaient pas un degré élevé de polymorphisme. En effet, le nombre d'allèles rencontré pour chaque locus varie entre 1 (*eno*) et 4 (*batR*).

Les variations nucléotidiques observées dans les fragments des gènes de 16S, *rDNA*, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *ribC* et *ropB* ont été identiques à celles identifiées dans des études antérieures. En se basant sur le calcul des distances entre les gènes, les auteurs ont pu définir trois « lignages » : Le premier (complexe ST1) est constitué d'un complexe clonal, contenant 5 différents STs (ST2, ST3, ST4 et ST5). La souche Houston I appartient à ce « lignage ». Le deuxième « lignage » englobe tous les isolats ayant le profil ST6 et est caractérisé essentiellement par la présence de la souche Marseille. Le troisième « lignage » est constitué par une souche unique, Berlin 2 correspondant à ST7. Parallèlement à cette étude, les mêmes auteurs ont comparé le schéma MLST obtenu avec les 37 souches de *B. henselae* testées à celui obtenu par ECP avec les mêmes souches mais sur un nombre total de 34 souches au lieu de 37. Les profils ECP obtenus sont issus de la digestion génomique d'ADN effectuée par *SmaI*. Le dendrogramme montre également que les souches se répartissent en trois lignages identiques à ceux déjà définis précédemment dans le schéma MLST.

Dans une autre étude, Arvand & Viezens (2007) ont analysé 20 isolats de *B. henselae* provenant de trois continents, européen (10), américain (4) et océanien (6). L'un des objectifs de ce travail était d'étudier la structure des populations de souches au sein de l'espèce *B. henselae* par la technique MLST, basée sur sept des gènes ci-dessus et de comparer (exclusion du 16S rDNA/et de *eno*) et de comparer ces résultats à ceux obtenus par ECP. L'ADN des souches testées a été soumis à l'action de cinq enzymes de restriction

(*SmaI*, *NotI*, *ApaI*, *Eco521* et *XmaJI*). *SmaI* et *NotI* sont fréquemment utilisées pour le typage moléculaire de *B. henselae*, lors de la digestion enzymatique.

En revanche, les trois autres endonucléases ont été évaluées pour la première fois lors de cette étude. L'analyse des profils électrophorétique obtenus après digestion par *SmaI*, *ApaI*, *Eco521* et *XmaJI* a révélé respectivement six, cinq, quatre et cinq types différents de profils ECP. La digestion avec *NotI* produisait à elle seule 13 différents types de profils. Cinq groupes clonaux ont été identifiés : Houston-1, CAL-1, I107, Berlin-2 et Marseille. Ces groupes résultent de la combinaison de *SmaI*, *Eco521*, *ApaI* et *XmaJI*. Ces cinq groupes ont été également validés par la technique MLST.

Parmi les cinq groupes, deux nouveaux groupes MLST ont été identifiés dans cette étude par rapport à l'étude initiale de Iredell *et al.* (2003) : les groupes CAL-1 et I107. Les souches appartenant au groupe CAL-1 correspondent au profil ST5 déjà identifié par Iredell *et al.* (2003). La souche I107 présente un nouveau et unique profil (ST8). Les trois autres groupes (Houston-1, Marseille et Berlin-2) correspondant respectivement aux ST1, 6 et 7, ont été déjà identifiés dans l'étude antérieure d'Iredell *et al.* (2003). Dans cette étude, les auteurs montrent bien que les cinq enzymes de restriction utilisées sont appropriées pour le typage de *B. henselae* par ECP à l'exception de *NotI* (absence de corrélation entre les profils ECP et les profils MLST des souches étudiées) et que la confrontation des données MLST et ECP a permis à l'équipe de séparer sans ambiguïté les souches de *B. henselae* en groupes ou « lignages » clonaux.

Un an plus tard, les mêmes auteurs ont mené une autre étude sur une large collection de 182 isolats de *B. henselae* d'origine féline (158) et humaine (24) et provenant de trois continents (Amérique, Europe et Australie) en se basant sur la technique MLST, dans le but d'étudier les liens possibles entre profils MLST, espèces hôtes et distribution géographique des souches ainsi que les relations phylogénétiques au sein de *B. henselae*. Les profils obtenus résultent de la combinaison de 8 segments de gène (*16S rRNA*, *batR*, *gltA*, *groEL*, *ftsZ*, *nlpD*, *ribC* et *ropB*). Un nombre total de 14 profils a été détecté (dont 6 nouvellement identifiés, ST9, 10, 11, 12, 13 et 14. 66% des isolats humains de cette étude,

associés à des cas cliniques, appartenaient au profil ST1 et ce type était présent sur les trois continents. En revanche, 27,2% des isolats félins correspondent au profil ST7 qui n'est observé que sur le continent européen et chez l'espèce féline. L'analyse de ces données réalisées avec le logiciel eBURST ont permis à Avand *et al* (2007) de classer les 14 STs en trois « lignages » clonaux contenant soit un, soit plus de deux STs. Ces auteurs pensent que les souches les plus virulentes sont associées au profil ST1 et que cette virulence est due au fait que ces souches possèdent d'avantage de facteurs de virulence qui pourraient intervenir dans le mécanisme de transmission de la bactérie du chat vers l'homme ou bien qui permettraient une meilleure survie du pathogène dans l'hôte humain.

En revanche, les souches associées au profil ST7 seraient moins virulentes, ce qui pourrait être expliqué par l'absence de ces déterminants chez les souches de ce groupe.

ζ. MST :

La technique MST est une technique récente de typage moléculaire. Elle a été développée pour la première fois chez *Yersinia pestis* (Drancourt *et al.*, 2004). Elle a été utilisée ensuite avec succès chez d'autres espèces pathogènes telles que *Rickettsia conorii* (Fournier *et al.*, 2004), *Rickettsia prowazekii* (Zhu *et al.*, 2005), *Coxiella burnetii* (Glazunova *et al.*, 2005) *Bartonella quintana* (Foucault *et al.*, 2005) et *Mycobacterium tuberculosis* (Djelouadji *et al.*, 2008). Cette technique est basée sur l'analyse de la séquence de plusieurs régions intergéniques choisies par comparaison à des séquences du génome complet de deux espèces très proches.

En 2006, Li *et al.* ont développé la technique MST chez *B. henselae*. Cette étude a été réalisée sur 126 isolats félins provenant de différentes régions (Europe, Asie et Amérique).

Ces auteurs ont pu sélectionner 1430 séquences intergéniques variables appelées « Spacers », qui sont très conservées entre *B. henselae* et *B. quintana*. Parmi ces séquences, 293 possédaient une taille variant entre 150 et

600 pb. L'équipe a testé sur 126 souches de *B. henselae* 20 séquences (S1-S20) supposées être les plus variables. Sur ces dernières, uniquement 9 ont été retenues (S1-S9): tRNA-Ala/GCA-tRNAIle/AUC (S1), BH2865724-*dut* (S2) ; *dnaJ* related protein-*cobS*(S3) ; *pssA*-oxidoreductase (S4) ; *carB*-cold shock protein (S5) ; *alr-gcvP* (S6) ; *ftsK* oxidoreductase (S7) ; BH2864883-BH2864884 (S8) ; *acpP2*-malateoxidoreductase (S9). Sur les 126 souches testées, 39 génotypes ont été obtenus. Le typage de *B. henselae* basé sur les neuf séquences intergéniques a montré que les souches testées sont classées en quatre groupes ou « Clusters ». Le premier n'est constitué que de souches asiatiques. Les souches européennes sont groupées essentiellement dans les clusters 2, 3 et 4. En revanche, les souches américaines sont dispersées dans tous les « clusters. En 2007, la même équipe (Li *et al.*, 2007) a identifié, en combinant toujours les 9 séquences intergéniques les plus variables, 11 nouveaux types caractérisant essentiellement des isolats humains obtenus à partir de 75 patients.

η. MLVA :

C'est une technique de typage basée sur des séquences répétées. Ces dernières sont rencontrées dans de nombreux génomes bactériens. Différents types de séquences répétées ont été découverts chez les bactéries. Ces structures répétées peuvent être soit dispersées dans le génome telles que les séquences d'insertion (IS), les séquences REP (Repetitive Extragenic Palindromic sequences) (Stern, 1998), les séquences ERIC (Enterobacterial repetition Intergenic Consensus) (Hulton *et al.*, 1991), les séquences BOX (Martin *et al.*, 1992) et les CRISPERs (Clustered Regularly interspaced Short Palindromic Repeats) (Mojica 2000), soit répétées en tandem dans un seul locus.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux séquences répétées en tandem et plus particulièrement aux séquences de type VNTR (variable Number Tandem Repeats). Le principe de la technique MLVA, qui est basée sur ces structures répétées de type VNTR ainsi que l'évolution de leur nombre d'unités de bases seront détaillés dans la dernière partie de cette bibliographie.

C. Comparaison des techniques :

Techniques de typage	Principe de la technique	Avantages	Inconvénients
ECP	- Coupure par des enzymes rares de restriction	- applicable à grand nombre d'espèce - Reproductibilité intra-laboratoire	- Lourde - Non standardisée - Exige des personnes qualifiées
MLST	- Séquençage de 7 à 9 gènes intragéniques	- Transférable - Normalisable	- Couteuse - Peu discriminante
MST	-Séquençage des fragments intergéniques	- transférable - Normalisable	- Couteuse
MLVA	- Amplification des séquences répétées en tandem	- Simple et conviviale - Rapide, Transférable - Discriminante, - Normalisable	- Difficile à appliquer sur les échantillons de terrain

Tableau 10 : Comparaison de performances de techniques de typage déjà développées

D. VNTR et leur évolution:

D.1. VNTR et la technique MLVA :

D.1.1. Définition :

Par opposition aux répétitions dont les unités répétées sont dispersées dans le génome, une répétition en tandem est une succession de motifs d'ADN répétés les uns derrière les autres et qui sont similaires en taille et en composition. Les différentes unités de base formant les répétitions en tandem ne sont pas toujours aussi simples et conservées. Le degré d'homologie au sein d'une répétition en tandem est très variable. En effet, des substitutions, délétions et insertions de copies

partielles des motifs peuvent modifier la séquence et provoquer une dégradation du motif. Ce type de problème rend l'identification des répétitions beaucoup plus

complexe. Les répétitions en tandem ont été en premier lieu étudiées chez les mammifères, plus particulièrement dans l'espèce humaine. Selon la nature et la taille des motifs, trois catégories de séquences sont distinguées : les ADN satellites, les minisatellites et les microsatellites. Les variations en nombre et

en longueur des répétitions en tandem rendent compte de l'essentiel des variations de taille du génome (Charlesworth *et al.*, 1994).

Chez les mammifères, les ADN satellites ont tout d'abord été isolés par centrifugation sur gradient de densité (Britten *et al.*, 1968).

Ce type d'ADN est caractérisé par des séquences de 100 et 3000 nucléotides répétées en tandem de 100 à plus de 1000 fois. Ces séquences sont localisées essentiellement dans l'hétérochromatine constitutive des centromères et télomères (Jones *et al.*, 1982). Les minisatellites sont constitués de motifs de 1 à 40 nucléotides, répétés entre 10 à 100 fois. Ils jouent probablement un rôle dans la liaison avec des protéines et dans la décondensation de la chromatine pour permettre l'expression des gènes (Singh, 1995). Chez l'homme, la plupart des locus minisatellites sont situés aux extrémités des chromosomes et dans les régions qui interviennent dans l'initiation de recombinaisons inégales (Crossing Overs) (Jeffreys, 1997). Les micosatellites nommés SSR pour « Simple Sequence Repeats » sont formés par la répétition de petites unités de 1 à 6 nucléotides. Ils ont été découverts dans le génome humain et depuis, le même type de structure a été trouvé chez les animaux et les végétaux. Selon les auteurs, le seuil de séparation entre micro et mini peut être variable.

Chez les bactéries, malgré la compacité du génome par rapport aux génomes eucaryotes qui a laissé penser que les séquences en tandem pourraient être très rares, ce type de séquence a été trouvé depuis chez de nombreuses espèces bactériennes. Avec la majorité des auteurs, nous considérons comme minisatellite chez les bactéries une répétition de 9 pb et plus. Lorsque ces répétitions en tandem se trouvent en nombre variable d'une souche à l'autre, elles sont qualifiées de VNTR pour « Variable Number Tandem Repeats ». Chez une espèce donnée, seule une fraction des répétitions en tandem présente un polymorphisme. Le caractère polymorphe est difficilement prévisible, et tout l'objet de développement d'une technique MLVA est d'identifier et de sélectionner parmi les nombreuses répétitions en tandem, celles qui sont variables (et qui constituent donc des VNTR) et de les exploiter pour différencier et typer les souches d'une même espèce, en mettant à profit

l'existence de déséquilibres de liaison qui caractérisent des clones. Cette méthode est donc *a priori* particulièrement adaptée, non seulement au typage à des fins de traçabilité (micro-évolution), y compris pour les espèces à haut taux de recombinaison, mais aussi aux études phylogénétiques (macro-évolution) au sein des espèces à structure réputée essentiellement clonale, comme cela est supposé être le cas pour *B. henselae*.

D.1.2. Principe de la technique MLVA :

Pour une séquence répétée en tandem donnée, positionnée en un locus donné sur le génome, le nombre N des répétitions dont elle se compose constitue un allèle. Deux individus différents peuvent, pour une même séquence répétée, posséder un nombre N différent correspondant donc à deux allèles distincts. Afin d'augmenter la probabilité de pouvoir distinguer deux souches proches, plusieurs locus associés correspondants à plusieurs séquences VNTR sont analysés en parallèle (MultiLocus VNTR Analysis). L'ensemble des bandes obtenues pour plusieurs VNTR constitue un profil VNTR (**cf. Figure 15**). Dans le but de comparer les souches entre elles, on construit une matrice de distance en comptant le nombre d'allèles différents obtenus entre isolats (pris 2 par 2). Par cette méthode, pour un VNTR donné, le même poids est donné à des grandes ou petites différences dans le nombre de duplications. L'accroissement du nombre de génomes séquencés ainsi que le développement des outils de recherche des séquences répétées à beaucoup facilité leur identification. Les outils utilisés pour la recherche des séquences répétées en tandem chez *B. henselae* seront présentés dans la partie expérimentale (**cf. Chapitre I, page 94**).

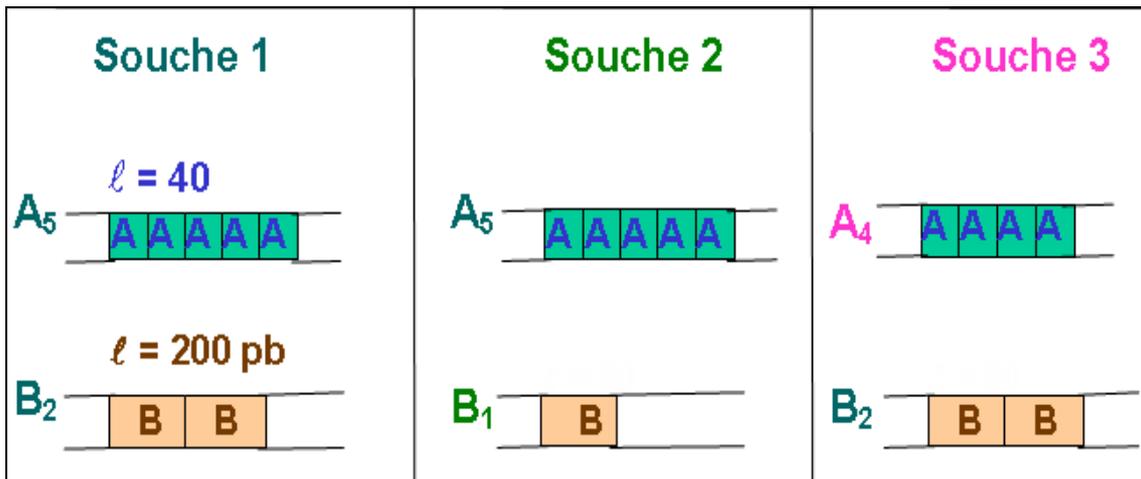


Figure 15. Principe de la technique MLVA (Association de plusieurs loci)

D.1.3. Typage des microorganismes pathogènes par MLVA:

Les deux premiers typages par la technique MLVA ont été réalisés en 1997 chez *Haemophilus influenzae* (van Belkum *et al.*, 1997) et *Bacillus anthracis* (Jackson *et al.*, 1997). Depuis cette date, le nombre d'espèces bactériennes typées par cette technique n'a pas cessé d'augmenter pour diverses raisons. En effet, cette technique présente des nombreux avantages tels que la mise en œuvre qui est facile, son pouvoir discriminant et sa reproductibilité élevés et son coût modeste par comparaison aux autres techniques communément utilisées dans le même but. Le tableau 2 présente la totalité des bactéries ayant été typées par la technique MLVA depuis 1996 jusqu'à l'heure actuelle.

A ce jour, une soixantaine d'espèces bactériennes ont été typées par la technique MLVA, dont les profils sont disponibles dans des bases de données soit publiques librement accessibles soit privées nécessitant une autorisation (identifiant-mot de passe) délivré par leur concepteur. En outre, la technique MLVA a été élargie à d'autres agents pathogènes, notamment aux agents de mycoses (**Tableau 11**).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Bactérie et autres organismes	Nb de marqueurs	Taille d'U.B	Nb d'isolats testés	Nb profils obtenus	Références
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	10 (4)	6-15	20	19	Kevin <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus fumigatus</i> ¹	9	NA	52	32	Vanhee <i>et al.</i> , 2009
<i>Bacillus anthracis</i>	8	2-36	426	89	Keim <i>et al.</i> , 2000
	24 (18)	9-78	32	27	Le Flèche <i>et al.</i> , 2001
	25	5-45	39	39	Ciammaruconi <i>et al.</i> , 2008
<i>Bordetella pertussis</i>	6	5-15	198	45	Schouls <i>et al.</i> , 2004
<i>Borrelia sp.</i>	10	2-21	41	30	Farlow <i>et al.</i> , 2002
<i>Brucella sp</i>	8	8	22	15	Bricker <i>et al.</i> , 2003
	18	6-134	236		Le Flèche <i>et al.</i> , 2006
	15		257	204	Le Flèche <i>et al.</i> , 2006
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	32	6-15	66	62	U' Ren <i>et al.</i> , 2007
	32	6-15	21	19	U' Ren <i>et al.</i> , 2007
<i>Burkholderia. mallei</i>					
<i>Candida albicans</i> ²	3	4	100	65	Botterel <i>et al.</i> , 2001
<i>Candida glabrata</i> ³	6	2-3	127	37	Grenouillet <i>et al.</i> , 2001)
<i>Clostridium difficile</i>	7	3-8	86 (29)	21	Van den Berg <i>et al.</i> , 2007
	7	6-17	86	71	Marsh <i>et al.</i> , 2006
<i>Clostridium perfringens</i>	5	6-21	112	ND	Swaires <i>et al.</i> , 2005
<i>Coxiella burnettii</i>	17	6-126	42	36	Arricau-Bouvery <i>et al.</i> , 2006
	7	6-21	21	9	svraka <i>et al.</i> , 2006
<i>Enterococcus faecalis</i>	7	141-393	83	37	Titze-de-Almeida <i>et al.</i> , 2004
<i>Enterococcus faecium</i>	6	121-279	392	127	Top <i>et al.</i> , 2004
<i>Escherchia coli O157</i>	7	6-18	81	64	Noller <i>et al.</i> , 2003
	7	6-30	73	47	Lindstedt <i>et al.</i> , 2003
<i>E.coli, Shigella</i>	7	6-39	72	63	Lindstedt <i>et al.</i> , 2007
<i>Enterobacter sakazakii</i>	4	7-15	112	49	Mullane <i>et al.</i> , 2008
<i>Francisella tularensis</i>	6	2-21	56	39	Farlow <i>et al.</i> , 2001
	25	2-23	192		Johansson <i>et al.</i> , 2004
<i>Haemophilus influenzae</i>	5	3-6	20	ND	Van Belkum <i>et al.</i> , 1997
<i>Lactobacillus casei</i>	9	6-24	52	ND	Diacourt <i>et al.</i> , 2007
<i>Legionnella pneumophila</i>	8	48-54	14	13	Pourcel <i>et al.</i> , 2003
	10(8)	7-125	79 (99)	35	Pourcel <i>et al.</i> , 2007
<i>Leptospira interrogans</i>	7	34-77	51	47	Majed <i>et al.</i> , 2005
	6	36-138	39	9	Slack <i>et al.</i> , 2005
<i>Leptospira interrogans</i>	5	34-77	243		Salaun <i>et al.</i> , 2006
<i>Listeria monocytogenes</i>	6	9-18	45	44	Murphy <i>et al.</i> , 2007
	5	6-15	140	70	Lindstedt <i>et al.</i> , 2008

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Bactérie et autres organismes	Nb marqueurs	Taille d'U.B	Nb d'isolats testés	Nb profils obtenus	Références
<i>Mycobacterium avium</i>	6	53	73		Bull <i>et al.</i> , 2003
	5	20-70	49	6	Overduin <i>et al.</i> , 2004
<i>Mycobacterium leprae</i>	5(4)	2-3	12 (29)	14	Truman <i>et al.</i> , 2004
	9	1-27	4	4	Groathouse <i>et al.</i> , 2004
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7	15-79	25	22	Frothingham <i>et al.</i> , 1998
	12 (10)	53	31	30	Supply <i>et al.</i> , 2000
	6	69	100	55	Skuce <i>et al.</i> , 2002
	21	9-58	90	84	Le Flèche <i>et al.</i> , 2002
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	12	53-71	29	14	Ablordey <i>et al.</i> , 2005
<i>M.ulcerans M. marinum</i>	7	53	66 (39 et 27)	11(7 et 4)	Stragier <i>et al.</i> , 2005
<i>Mycoplasma mycoides</i>	3	12-75	39	12	McAuliffe <i>et al.</i> , 2007
<i>Neisseria meningitidis</i>	12	4-30	100	93	Liao <i>et al.</i> , 2006
	12	4-21	92	60	Schouls <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	6-115	89	71	Onteniente <i>et al.</i> , 2003
	15	6-129	163	39	Vu-Tien <i>et al.</i> , 2007
<i>Rickettsiae.spp</i>	16	63-65	26	13	Vitorino <i>et al.</i> , 2005
<i>Salmonella enterica</i> (serovar Typhimurium)	8	6-189	102	54	Lindstedt <i>et al.</i> , 2003
	10 (7)	3-20	99	52	Ramisse <i>et al.</i> , 2004
	5	6-33	106	61	Lindstedt <i>et al.</i> , 2004
<i>Salmonella enterica</i> sérovat Typhimurium &Newport	10	6-232	50	ND	Witonski <i>et al.</i> , 2006
	10		99	52	Ramisse <i>et al.</i> , 2004
<i>Salmonella enterica</i>	7	6-30	34	13	Cho <i>et al.</i> , 2007
<i>Staphylococcus aureus</i>	7 SIRU	48-159	16	12	Hardy <i>et al.</i> , 2004
	5	9-81	34	26	Sabat <i>et al.</i> , 2003
	8	9-560	200	ND	François <i>et al.</i> , 2005
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	16	12-60	56	49	Koeck <i>et al.</i> , 2005
<i>Streptococcus uberis</i>	7	13-208	88	82	Gilbert <i>et al.</i> , 2006
<i>Shigella sonnei</i>	26	6-168	536	126	Liang <i>et al.</i> , 2007
<i>Shigella sp et E.coli</i>	15 (32)		88	82	Gorgé <i>et al.</i> , 2008
<i>Theileria parva</i>	60(11ms &49 MS)	3-21	20 (14)	13(17 VNTR)	Oura <i>et al.</i> , 2003
<i>Xylella fastidiosa</i>	7	7-9	27	ND	Coletta- Filho <i>et al.</i> , 2001
<i>Yersinia pestis</i>	25	9-60	3	3	Le Flèche <i>et al.</i> , 2001
	25	9-60	180	61	Pourcel <i>et al.</i> , 2004
	42 (26)	1-45	24	18	Klevytska <i>et al.</i> , 2001
			156 (104)	102/104	Achtman <i>et al.</i> , 2004
	25	7-60	10	10	Ciammaruconi <i>et al.</i> , 2008

Tableau 11: Tableau récapitulatif des μ-organismes(bactéries et agents de mycoses ^(1,2,3) typés par MLV A

Dans un contexte d'étude épidémiologique, le typage permet de déterminer la source de l'infection. Le typage est généralement basé sur des marqueurs génétiques suffisamment stables. Cependant, les structures génétiques, et notamment les VNTR, sont susceptibles d'évoluer.

D.2. Evolution des VNTR :

D.2.1. Structures des populations bactériennes et concept de clonalité:

Les populations bactériennes doivent répondre à deux enjeux vitaux et complémentaires, comme tous les êtres vivants : conserver l'information génétique tout en s'adaptant à des environnements changeants. La conception clonale a longtemps permis de comprendre comment se conservait et se pérennisait l'information génétique en l'absence de reproduction sexuée. La découverte des mécanismes horizontaux de transfert génétique (conjugaison, transformation et transduction) et de l'existence d'un métagénome bactérien (et phagique) a battu en brèche la conception d'une évolution strictement clonale. On sait aujourd'hui que les populations bactériennes ne sont pas homogènes, et que plusieurs structures coexistent au sein même d'une espèce, qui peuvent être identifiées en fonction de l'absence ou de la présence de déséquilibres de liaison. Celui-ci correspond à l'association non aléatoire des allèles à différents locus, en fonction de leur position physique sur le chromosome. En l'absence de recombinaison chromosomique, un déséquilibre de liaison est observé entre les marqueurs. Ce déséquilibre est très important chez les populations clonales. L'absence de recombinaison entre des populations peut être due à des barrières biologiques qui empêchent tout échange génétique entre elles et/ou au fait que ces populations sont isolées dans des zones géographiques ou écologiques très restreintes.

D'après Smith *et al.* (1993), trois structures possibles de populations peuvent exister allant d'une population strictement clonale à une population panmictique (**cf. figure 16**) :

- Population clonale : caractérisée par un fort déséquilibre de liaison. Dans cette structure, la recombinaison entre les isolats de la même branche ou

des branches différentes n'est pas possible. Exemple : genre *Salmonella* (Boyd *et al.*, 1996).

- Population épidémique : caractérisée par des recombinaisons au sein de branches majeures d'une espèce. Au moment du développement de l'épidémie, le génotype responsable de cette dernière est sur-représenté car clonal, cette sur-représentation pouvant perdurer ou non avec le temps, selon la nature des transferts horizontaux inter- et intra-espèces qui surviendront. Exemple : *Neisseria meningitidis*.

- Population panmictique : dans cette population, les allèles sont distribués aléatoirement (pas de déséquilibre de liaison). Cette population est caractérisée par des recombinaisons fréquentes entre les membres de la population au sein du genre bactérien considéré, voire au delà. Ainsi, des recombinaisons s'opèrent entre les souches épidémiques de *N. meningitidis* et des *Neisseria* commensales du rhinopharynx, dont la séquence diverge jusqu'à 25% (Feil *et al.*, 1996b, d'après Spratt et Maiden, 1999). L'acquisition de ces nouveaux allèles peut parfois aboutir à l'apparition d'un clone épidémique de *N. meningitidis*. Dans certaines espèces, ce caractère panmictique est dominant, par exemple *Neisseria gonorrhoeae* et *Helicobacter pylori* (Go *et al.*, 1996 ; Salaun *et al.*, 1998).

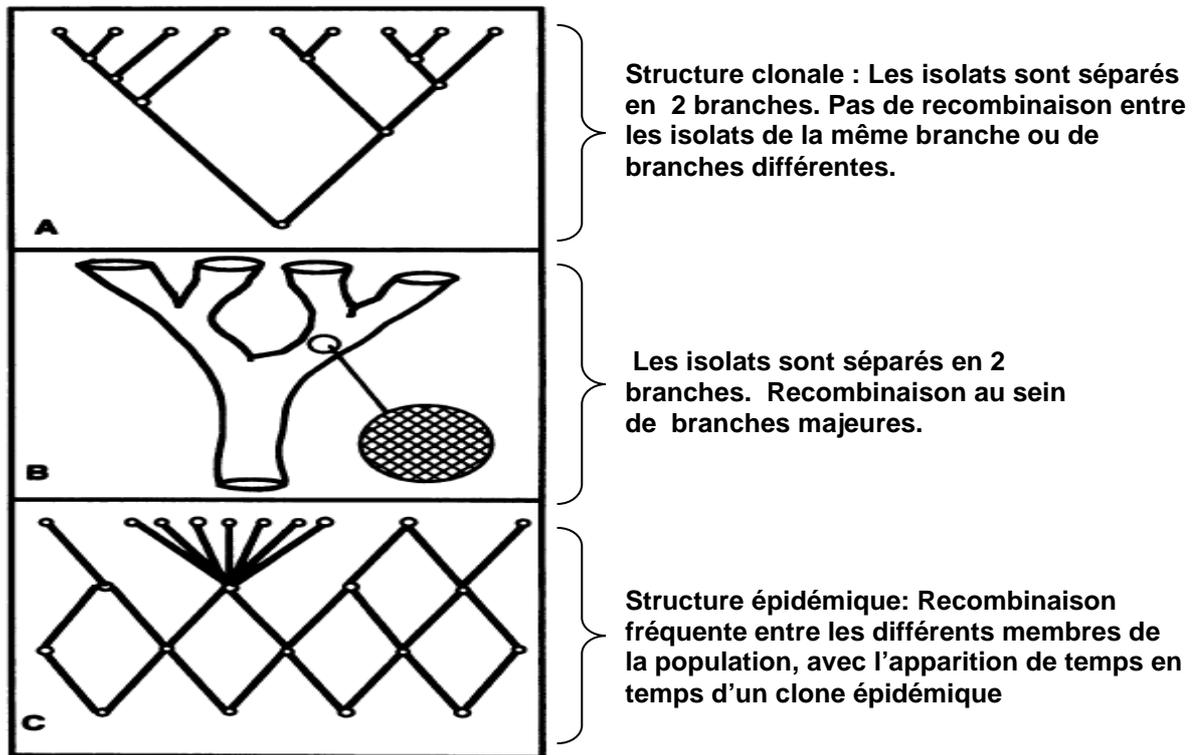


Figure 16 : Classification de la population bactérienne (D'après Smith *et al.*, 1993)

Au sein de toutes ces populations bactériennes, surtout pour celles qui sont peu ou pas aptes à bénéficier de transferts horizontaux, on peut observer une certaine diversité permettant de distinguer des isolats provenant de différentes régions géographiques et prélevés à différents moments, ce qui permet de les classer en souches. Cette diversité peut être induite par différents processus génétiques tels que la recombinaison chromosomique, la duplication de gènes, les mutations. Certaines espèces ou serovars pathogènes sont ainsi réputées pour la forte tendance au monomorphisme de leur structure de population, comme *M. tuberculosis*, *S. Typhi*, *Y. pestis*... (Achtmann, 2008). Cela semble être le cas pour certaines α -protéobactéries, notamment *B. henselae*, les populations étant considérées comme essentiellement clonales, en raison de la rareté des échanges génétiques et de la structure de population révélée par MLST (Iredell *et al.*, 2003). Cependant, les travaux plus récents de Arvand *et al.* (2007) suggèrent un niveau non négligeable de recombinaisons intra-spécifiques.

Dans le cas des populations clonales, la genèse de la diversité au sein d'une population doit se réaliser « en interne ». L'intervention des VNTR a été incriminée dans ce processus.

D.2.2. Mécanismes de changement du nombre de répétitions et conséquences :

Les séquences répétées ont été observées à la fois dans le génome eucaryote et dans le génome procaryote. Elles subissent des variations en produisant une instabilité génétique.

α. Chez les eucaryotes :

Le changement du nombre de répétitions pourrait être expliquée par des mécanismes de glissement, de recombinaison génétique inégale ou égale, de conversion génique (Charlesworth *et al.*, 1994 ; Jeffreys *et al.*, 1999). L'instabilité des séquences répétées, qui aboutit à la constitution de « points chauds » de recombinaison (Jeffreys *et al.*, 1999), peut toucher des régions non codantes ainsi que des régions codant pour des protéines.

La plupart des études sur les mécanismes d'évolution ont été réalisées sur des séquences répétées du génome humain. Chez les eucaryotes, certaines séquences répétées sont associées à des fonctions régulatrices, d'autres ayant une fonction inconnue. La variation du nombre de répétitions, particulièrement pour les séquences tri-nucléotidiques, a été associée à des maladies génétiques (Caskey *et al.*, 1992). Il a été également démontré que ces structures sont associées au développement de certaines tumeurs (Leach *et al.*, 1993 ; Rosche *et al.*, 1996) ainsi qu'à certaines maladies neuro-dégénératives (Mangiarini *et al.*, 1996). Dans le but d'étudier la corrélation entre le nombre des séquences répétées et le développement de la maladie de Huntington, Mangiarini *et al.* ont introduit chez un rat transgénique différent nombre de répétitions « CAG » dans l'extrémité 5' du génome et ils ont constaté que l'augmentation du nombre de ces structures, aboutissait à partir d'un certain seuil au développement progressif de la maladie.

β. Chez les bactéries :

Chez les bactéries, le mécanisme le plus étudié est celui de glissement lors de la réplication, aussi appelé en anglais SSM pour « Slipped Strand Mispairing ». Ce mécanisme concerne les séquences répétées à courts motifs et qui sont parfaitement conservées (Levinson *et al.*, 1987). Le mécanisme SSM intervient lors de la réplication, comme illustré dans **la figure 17**, ce mécanisme de SSM conduit soit à l'augmentation du nombre de copies par la formation d'une boucle sur le brin néo-synthétisé, soit à la réduction du nombre des séquences répétées par un phénomène de délétion qui est dû à la formation d'une boucle sur le brin matrice. Certaines de ces erreurs peuvent être corrigées par l'activité de relecture de l'exonucléase et aussi par le système de réparation des mésappariements. Mais certaines erreurs échappent à ce contrôle de réparation et deviennent des vraies mutations. Ceci conduit à la dégénérescence de la séquence et par suite à une perte de conservation des motifs. L'instabilité des répétitions en tandem correspondait à un équilibre entre la génération des erreurs de réplication par glissement et la performance de la relecture effectuée par l'exonucléase.

Dans le cas des minisatellites, caractérisés par des motifs de 9 pb et plus, les processus de modification du nombre de répétitions ont été très peu étudiés.

Selon Barros *et al.*, 2008, ils feraient, intervenir des glissements réplicatifs (SSM) et des crossing overs inégaux, qui représenteraient, pour les mini-comme pour les micro-satellites, les principaux mécanismes en jeu pour l'induction de modifications génomiques, par le biais de recombinaisons, de délétions et de mutations du génome du procaryote.

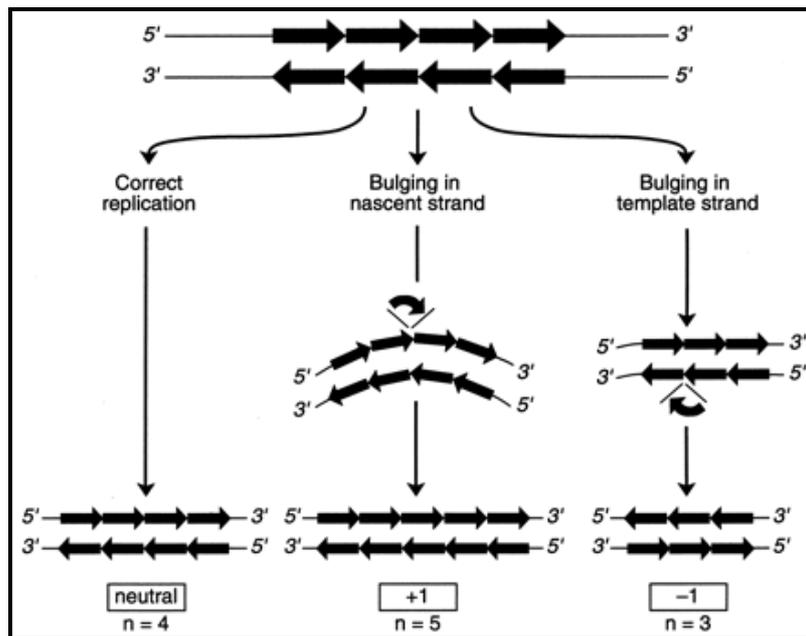


Figure 17 : Représentation schématique du mécanisme de glissement (SSM) lors de la réplication.

DD.2.3. Rôle des VNTR dans les phénomènes adaptatifs et dans la virulence bactérienne :

Depuis longtemps, des mécanismes de modification « interne » des gènes régulateurs ou des gènes de structure impliqués dans les phénomènes adaptatifs et dans la virulence bactérienne sont connus (Ziebuhr *et al*, 1999). Or, certaines séquences répétées en tandem sont localisées soit en amont soit dans des gènes codant pour des protéines, en particulier des protéines de surface qui peuvent jouer un rôle dans l'adaptation de la bactérie aux changements de conditions environnementales survenant au cours de l'infection de l'hôte.

Ces structures ont la particularité de pouvoir provoquer des variations de l'expression de gènes, ou des variations de la protéine elle-même, de façon réversible ou non.

Ainsi, parmi les premiers phénomènes connus chez les bactéries impliquant de telles variations liées aux VNTR, figurent des variations de phase qui réfèrent à un changement réversible de l'existence ou de l'absence (ON/OFF) d'une phase d'expression résultant du changement du taux d'expression d'une ou plusieurs protéines appartenant à une population clonale (Henderson *et al*,

1999 ; Woude et al, 2004), et des variations antigéniques, caractérisées par l'expression de différents phénotypes de surface. La variation antigénique a été observée chez les bactéries gram négatives, et concerne particulièrement les structures de surface telles que les fimbriae, les flagelles, les protéines de la membrane externe les protéines de la capsule, ainsi que les lipopolysaccharides (LPS) (Henderson *et al.*, 1999). Les auteurs supposent que ces mécanismes permettent aux bactéries d'échapper au système immunitaire tout en modifiant les protéines de surface, sans perte de patrimoine génétique (Henderson *et al.*, 1999). A partir d'observations, il a été proposé que les VNTRs polymorphes confèrent plus largement des avantages sélectifs sur le plan évolutif au travers de l'expression ou non des gènes dans l'environnement desquels ils se trouvent (Van Belkum, 2007), les rendant notamment capables d'occasionner des maladies chez leurs hôtes eucaryotes. Il a été notamment montré que les îlots de pathogénicité sont flanqués par des séquences particulières d'ADN, qui peuvent être des séquences d'insertion mais aussi des séquences répétées directes de type VNTR (Ziebuhr *et al.*, 1999). Le lien entre VNTR polymorphes, virulence et adaptation à différents environnements a été conforté, à partir de l'analyse de souches isolées des cas cliniques, chez divers pathogènes comme *Haemophilus influenzae* (Van Belkum *et al.*, 1997 ; Hood *et al.*, 1996 ; Weiser *et al.*, 1989 ; Jarosik *et al.*, 1994 ; High *et al.*, 1993 ; Van Ham *et al.*, 1993 ; Van Alphen *et al.*, 1991), *Legionella pneumophila* (Newton *et al.*, 2007 ; D'Aurica *et al.*, 2008 ; Coil *et al.*, 2008), *Staphylococcus aureus* (Frenay *et al.*, 1994, Patti *et al.*, 1994 ; Patti *et al.*, 1992 ; Goh *et al.*, 1992 ; McDevitt *et al.*, 1995 ; McDevitt *et al.*, 1994), *Streptococcus pneumoniae* (Koeck *et al.*, 2005) et les streptocoques du groupe B (Gravekamp *et al.*, 1996 ; Gravekamp *et al.*, 1997), *Bacillus anthracis* et *Yersinia pestis* (Jackson *et al.*, 1997 ; Ciammaruconi *et al.*, 2008) et le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (Frothingham *et al.*, 1998 ; Supply *et al.*, 2000, 2001 ; Le Flèche *et al.*, 2002 ; Spurgiesz *et al.*, 2003 ; Mazars *et al.*, 2001).

L'étude du rôle que les séquences répétées pourraient jouer a débuté après le séquençage complet du premier génome bactérien séquencé, celui d'*Haemophilus influenzae* en 1995 (Hood *et al.*, 1996). Chez cette bactérie, qui

colonise les voies respiratoires et qui est responsable de pneumonies et de meningites, neuf locus comportant des motifs de 4 pb ont été identifiés. Ces séquences répétées sont localisées dans des gènes impliqués dans la synthèse des pili et du LPS, dans la fixation du fer, ou dans l'adhérence. Des séquences homologues à ces gènes ont été également trouvées chez d'autres microorganismes comme *Neisseria* spp et *Yersinia*. Par exemple, une répétition de deux nucléotides « TA » est localisée entre les gènes *hifA* et *hifB* qui codent pour la synthèse des sous-unités de pili. La variation de phase est due au changement du nombre d'unités répétées qui sont insérées dans la région promotrice entre les boîtes -35 et -10. En effet, il a été démontré que chez les souches possédant 9 unités de répétitions, l'espacement entre les deux boîtes est de 14 bases, ce qui empêche la transcription des deux gènes. En revanche, les souches ayant 10, 11 ou 12 répétitions et présentant un espacement de 16, 18 et 16 bases permettent facilement la transcription de ces gènes. D'autres répétitions en tandem (tetranucléotides), identifiées également chez *H. influenzae* ont un effet au niveau de la traduction des gènes *lic1-lic3* codant pour des enzymes de biosynthèse de LPS. Ces VNTR sont localisés dans des séquences codantes, ce qui peut entraîner un décalage ou bien un changement du cadre de lecture (Weiser *et al.*, 1990).

Chez les *Neisseraceae*, des structures répétées ont été détectées dans des gènes codant pour des protéines impliqués dans la biosynthèse de LPS, des protéines d'opacité et des protéines de membrane externe (Burch *et al.*, 1997 ; Meyer *et al.*, 1990 ; Van der Ende *et al.*, 1995). La variation de phase liée au LPS fonctionne comme un mécanisme d'adaptation permettant aux bactéries d'échapper au système immunitaire de l'hôte tout en favorisant le franchissement des barrières physiques (Putten *et al.*, 1993). La nature et le type de la variabilité identifiés chez *N. gonorrhoeae* affectant les gènes codants pour les LPS sont similaires à ceux décrits chez *H. influenzae* (Virji *et al.*, 1990). Burch *et al.*, (1997) ont mis en évidence la répétition d'une polyguanine, située dans le gène *Isi2* codant pour la biosynthèse de LPS et jouant un rôle important dans le décalage du cadre de lecture. Selon le nombre de répétitions, plusieurs structures lipooligosaccharides ont été observées.

D'autres séquences répétées en tandem appartenant à des phases ouvertes de lecture codant pour des protéines polymorphes et qui sont supposées être à l'origine d'une variation antigénique ont été décrites chez des bactéries :

- Chez les streptocoques de groupe B, les souches cliniques dont le VNTR présent dans le gène *bca* codant pour la protéine de surface alpha C (Madoff *et al.*, 1996 ; Michel *et al.*, 1992), contient un nombre élevé de répétitions (9 répétitions) sont moins immunogènes que les souches dont ce VNTR intragénique ne contient qu'un ou deux répétitions (Gravekamp *et al.*, 1996, Madoff *et al.*, 1996). Les auteurs de l'article ont expliqué cette différence par l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte, la diminution des séquences répétées au décours de l'infection induisant selon eux un changement de conformation des épitopes et par suite l'échappement aux anticorps. Gravekamp *et al.* (1996) ont également montré que la réponse immunitaire chez les rats à la protéine alpha C est inversement proportionnelle au nombre de séquences répétées. En effet, l'immunisation passive de rats avec l'antisérum de lapin produit à partir de protéine alpha C dont le gène héberge une région VNTR de 1 ou 2 répétitions, induit un niveau élevé de protection de l'ordre de 76% et 75%, contrairement aux protéines alpha C dont le gène héberge 9 ou 16 répétitions (41% et 48%). Selon Gravekamp, cette différence d'immunogénicité pourrait être expliquée par le fait que les bactéries ayant 1 à 2 répétitions induisent une réponse de type T-dépendant, alors que les souches hébergeant 9 ou 16 répétitions ont plutôt provoqué une réponse de type B-dépendant. Cependant, aucune étude ultérieure n'a permis de valider cette hypothèse.

- Chez *Staphylococcus aureus*, de nombreuses séquences répétées, localisées dans des gènes codant pour des protéines de surface, ont été étudiées. Ces dernières sont impliquées la plupart du temps dans la reconnaissance de molécules d'adhérence de la matrice extracellulaire de la cellule hôte (Uhlen *et al.*, 1984)

-Chez *Treponema pallidum*, bactérie responsable de la syphilis chez l'homme, les résultats obtenus par Harper *et al.* (2008) les incitent à conclure que la capacité à induire une syphilis tertiaire est associée à une variation du nombre de séquences répétées situées dans le gène codant pour la protéine Arp (Acidic repeat protein). Par ailleurs, les personnes infectées par *T. pallidum* produisent de façon prédominante des anticorps dirigés spécifiquement contre la région dans laquelle sont situées les séquences répétées mais pas contre les régions N et C terminales de la protéine Arp. Ces observations leur ont permis d'affirmer que cette zone est très immunogène et contient un domaine potentiel correspondant au site de la fixation de la fibronectine. D'après ces auteurs, la variation du nombre de motifs observée chez les souches testées issues de différents cas cliniques, serait due à la pression du système immunitaire de l'hôte et aurait un effet d'échappement (Harper *et al.*, 2008).

Chez *B. henselae*, plusieurs protéines impliquées de façon avérée ou supposée dans la virulence contiennent des VNTR. C'est notamment le cas des protéines BadA et Arp (cf. facteurs de virulence). Mais la variabilité du nombre de répétitions et son impact possible sur la fonctionnalité de ces protéines n'a encore pas été recherchée.

Les tableaux 12 et 13 font la synthèse des principales données publiées sur l'impact avéré ou potentiel de VNTR sur la fonction de certains gènes. Le tableau 11 est relatif aux minisatellites (> 9 pb) et le tableau 12 aux microsatellites. Il est à noter qu'en règle générale, les structures de type minisatellites semblent plus souvent affecter la fonction de protéines de surface que les structures de type microsatellite.

Espèce	Motif répété (pb)	Gène	Fonction de la protéine codée par le gène	Références
<i>Anaplasma marginale</i>	87	Msp 1a	Protéine majeure de surface	Allred <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus anthracis</i>	12	vvrA	Protéine homologue à la protéine de la gaine (shp2) de <i>Litomosoides carinii</i>	Jackson <i>et al.</i> , 1997
<i>Listeria monocytogenes</i>	66	prfA	Homologue à l'internaline riche en leucine	Domann <i>et al.</i> , 1997
<i>Mycobacterium bovis</i>	24	vspA	Lipoprotéine de la surface membranaire	Lysnyansky <i>et al.</i> , 1996
<i>Streptococcus spp</i>	60	Psp A	Protéine de surface des pneumocoques	Yother <i>et al.</i> , 1992
	69	Emm	Protéine de résistance à la phagocytose	Bessen <i>et al.</i> , 1989
	246	aC	Protéine alpha C	Gravekamp <i>et al.</i> , 1997
<i>Staphylococcus aureus</i>	93	Fnb	Protéine se liant à la fibronectine	Patti <i>et al.</i> , 1994 Patti <i>et al.</i> , 1992
	561	Cna	Adhésine de collagène	Goh <i>et al.</i> , 1992
	81	Coa	Coagulase	Schwarzkoft <i>et al.</i> , 1994
	24	Spa	Protéine A	Clewell <i>et al.</i> , 1999
	18	clf	Récepteur du fibrinogène	McDevitt <i>et al.</i> , 1995
<i>Treponema pallidum</i>	60	arp	Protéine immunodominante	Harper <i>et al.</i> , 2008
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	18	MB	Antigène MB (multiple banded)	(Zheng <i>et al.</i> , 1995)

Tableau 12 : Séquences répétées de type **minisatellites** codant pour des protéines à fonction connue

Espèce	Motif répété	Gène	Fonction du gène	Références
<i>Haemophilus influenzae</i>	CAAT	<i>Lic1- lic3</i>	Biosynthese du LPS	Hood <i>et al.</i> 1996
	GCAA	<i>yad</i>	Adhésine	Hood <i>et al.</i> 1996
	GACA	<i>IgtC</i>	Glycosyltransférase	Hood <i>et al.</i> 1996
	TTGG	ND	Protéine liant le fer	Hood <i>et al.</i> 1996
	AGTC	ND	Méthyltransférase	Hood <i>et al.</i> 1996
	TTTA	ND	Homologue d'une protéine de Bacillus	Hood <i>et al.</i> , 1996
	TA	<i>HifA/B</i>	Synthèse de fimbriae	Van Ham <i>et al.</i> 1993
<i>Neisseria meningitidis</i>	G	<i>Isi2</i>	Biosynthèse du LPS	Burch <i>et al.</i> 1997
	CTCTT	<i>Opa</i>	Protéine d'opacité	Meyer <i>et al.</i> 1990
	A	<i>Opa</i>	Protéine d'opacité	Meyer <i>et al.</i> 1990
	G	<i>Por A</i>	Protéine de la membrane externe	Van der Ende <i>et al.</i> 1995
<i>Enterococcus faecalis</i>	TAGTA	<i>Rep1 et rep2</i>	Itéron: régule la replication et le transfert des plasmides	Heath <i>et al.</i> 1995
<i>Mycoplasma hyorhinus</i>	A	<i>Vlp</i>	Protéine membranaire	Yogev <i>et al.</i> , 1991
<i>Mycoplasma fermentans</i>	A	<i>P78</i>	Lipoprotéine du transporteur ABC	Theiss & wise 1997
<i>Escherichia.coli</i>	A et C	<i>lac</i>	B- galactosidase	Foster <i>et al.</i> 1994
				Rosenberg <i>et al.</i> 1994

Tableau 13 : Séquences répétées de type **microsatellites** codant pour des protéines à fonction connue

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : DEVELOPPEMENT DE LA TECHNIQUE MLVA.

Pour prouver que les chats vivant avec des humains malades ou ayant été en contact avec eux sont la source incontestable de la souche de *B. henselae* responsable de leur maladie, nous avons développé un outil fin et simple de typage permettant d'atteindre un bon niveau de polymorphisme et suffisamment convivial. Il s'agit d'une technique MLVA (Multiple Locus VNTR Analysis), permettant de différencier les souches entre elles en combinant plusieurs séquences répétées polymorphes.

Le développement et la mise au point de la technique ont été faits en deux étapes. La première correspond au développement initial qui nous a permis de sélectionner 30 séquences candidates parmi des centaines. 11 séquences ont été retenues dont 5 principales ont servi pour les études épidémiologiques. La deuxième est une étape complémentaire et plus ciblée puisqu'elle a consisté à tester d'autres séquences candidates en fonction de leur position dans le génome tout en étant en mesure de nous affranchir de certaines contraintes techniques présentes lors la première étape.

Dans tous les cas, la méthode de typage utilisée est la même : MLVA.

Mais aussi bien les matériels biologiques que certains critères et modalités techniques ont évolué en fonction des étapes.

I. Etape I : Développement initial :

Le but de cette étape est de chercher des séquences répétées polymorphes dans le génome de *B. henselae*, susceptibles de servir d'outil de différenciation au sein de cette espèce. De nombreuses informations relatives aux matériels et méthodes ne figurant pas dans l'article de Monteil *et al.* (2007), nous avons choisi de détailler ici cette partie, en renvoyant à l'article lorsque les informations y sont disponibles.

A. Matériel biologique :

La mise au point de la technique a été faite sur un ensemble de 5 souches/isolats de *B. henselae* et une souche de *B. bovis* (**Tableau 1**). Ces souches ont été choisies en fonction de leur origine géographique, de leur hôte (chats/hommes) et de leur génotype (I/II) ainsi que de leur disponibilité (au début de l'étude, nous ne disposions pas de beaucoup des souches).

Souches/ Isolats	Origine géographique	Hôte	Génotype
121	France	Chat	II
128	France	Chat	II
140	France	Chat	I
733	Danemark	Chat	II
759 (Houston I)	Houston (USA)	Homme	I

Tableau 1 : Caractéristiques des 6 souches utilisées pour la mise au point de la technique

B. Méthodes :

B.1. Identification des répétitions en tandem :

α. Logiciel de recherche de séquences répétées :

Pour la recherche de nos séquences répétées, nous nous sommes appuyés sur la base de données, disponible en ligne sur <http://minisatellites.u-psud.fr> et développée par une équipe de Paris XI en utilisant le logiciel « Tandem Repeats Finder » (TRF) mis au point initialement par Gary Benson (Benson, 1999). Ce logiciel permet de détecter des séquences répétées en tandem similaires mais pas forcément parfaitement identiques par rapport aux séquences consensus. Cette base de données renferme des génomes entièrement ou partiellement séquencés et qui sont accessibles à la communauté scientifique. Ces génomes sont classés en quatre catégories : les archées (46 génomes), les bactéries (763 génomes), les virus (2355 génomes) et l'Homme (Chromosomes 21 et 22).

En ce qui concerne *Bartonella*, actuellement, cinq génomes sont disponibles en ligne dans cette base de données (*B. henselae*, *B. quintana*, *B. bacilliformis*,

B. tribocorum & *B. grahimi*). Le génome de *B. birtelsii* est en cours de séquençage.

Dans notre étude, nous nous sommes servis du génome de *B. henselae* que nous avons utilisé pour la recherche des séquences candidates. Après avoir sélectionné le génome d'intérêt, ce logiciel propose aux utilisateurs un formulaire afin de saisir un certain nombre de critères tels que :

L : Longueur de la séquence répétée

U : Taille du motif répété

N : Nombre de copies

V : Pourcentage de conservation par rapport à la séquence consensus

Pos : Position dans le génome

%CG : Pourcentage de C+ G

B : Biais entre les brins

La **figure 1** présente l'interface du logiciel illustrant les différents critères cités ci-dessus. Pour chaque critère, l'utilisateur doit fixer une valeur minimale et une valeur maximale afin de bien affiner la recherche de séquences répétées.

2. Select a criterion :

L = total length Pos = physical position: kb
 U = unit length %GC = percent G+C
 N = copy number B = bias between strands
 V = percent matches

L	U	N	V	Pos	%GC	B
min : 50	min : 0	min : 0	min : 80	min : 0	min : 0	min : 0
max : 100000	max : 2000	max : 6000	max : 100	max : 62900	max : 100	max : 1

To ask for a strict value, write it twice (in "min" and "max")

Select bias:
 ex: GC -> B = $|\%G-\%C| / \%(G+C)$ GC

Figure 1 : interface du logiciel montrant le formulaire de choix des critères

Les résultats de la requête sont fournis sous forme de tableau avec les caractéristiques détaillées de chaque séquence répétée (position sur le génome, taille du motif, nombre de copies, pourcentage de conservation, pourcentage de chaque nucléotide, pourcentage en CG) et un lien hypertexte permettant d'accéder aux deux zones flanquantes droite (F) et gauche (R)

entourant les séquences répétées. Ce logiciel permet d'afficher toutes les séquences possibles ayant les critères choisis.

Lorsque la base de données rencontre plusieurs séquences répétées ayant des tailles différentes sur un même locus donné, le logiciel affiche un seul résultat, celui correspondant à la répétition la plus longue et présentant le meilleur taux de conservation. Le tableau de **figure 2** est un exemple de résultats d'une requête regroupant les séquences identifiées par le logiciel selon les critères choisis au départ.

Physical position (kb)	Contig name	Unit length	Copy number	Total length	Percent matches	%C	%G	%T	%A	GC bias	Sequence	TR of the family	Name
43	B_henselae_Houston1	16	2.1	33	82%	12%	6%	48%	33%	0.33	alignment / linear seq	Group	
50	B_henselae_Houston1	20	2.0	40	80%	25%	27%	27%	20%	0.03	alignment / linear seq	Group	
57	B_henselae_Houston1	16	2.1	33	83%	6%	36%	27%	30%	0.71	alignment / linear seq	Group	
69	B_henselae_Houston1	16	2.1	33	83%	6%	36%	27%	30%	0.71	alignment / linear seq	Group	
74	B_henselae_Houston1	13	2.1	30	82%	26%	20%	30%	23%	0.13	alignment / linear seq	Group	

Figure 2 : Exemple de résultats montrant les caractéristiques des séquences répétées selon les critères choisis

β. Critères de recherche des répétitions en tandem chez *B. henselae* :

***henselae* :**

Pendant le développement initial de la technique, nous avons recherché des répétitions en tandem dans le chromosome bactérien. Les critères de recherche ont été les suivants :

- La longueur d'unité de base (U.B) est comprise entre 30 et 300 nucléotides
- Le nombre de copies est au moins égal à 2.
- La position physique des séquences répétées est si possible dispersée dans le génome.
- La longueur totale des séquences répétées amplifiées ne dépasse pas 3kb.
- Le pourcentage de conservation est compris entre 80 et 100%.

Ces critères ont été choisis d'une part, de manière à ne pas sélectionner de motifs de taille trop petite afin d'éviter des locus de type microsatellites considérés souvent comme instables et d'autre part pour tenir compte des outils qui étaient alors à notre disposition, lors du développement initial de la technique. Or, les outils dont nous disposions à l'époque ne permettaient pas de séparer visuellement sur gel d'agarose des produits PCR différant par une seule U.B. pour des tailles d'U.B. inférieures à 30 pb. En effet, au début du développement initial de la technique, le laboratoire ne disposait que d'une cuve d'électrophorèse ayant des dimensions moyennes (30 cm x 22 cm) ne permettant pas la séparation facile des bandes des produits PCR sur le gel d'agarose surtout pour les bandes de haut poids moléculaire. En outre, le générateur utilisé à l'époque n'était pas performant et exigeait un temps de migration énorme qui pouvait même parfois atteindre voire dépasser 30 heures de migration.

B. 2. Recherche des amorces :

Lors du développement initial, nous avons recouru au logiciel OLIGO 4.0 pour le choix des amorces, permettant l'amplification des séquences répétées candidates. Ces amorces ont été choisies en fonction de plusieurs critères :

- 1) elles correspondaient à des séquences flanquantes, en amont et en aval, de la séquence candidate, mais sans la recouper afin de ne pas tronquer les limites du VNTR.
- 2) elles ne devaient pas amplifier de séquences spécifiques d'autres bactéries que *B. henselae*.
- 3) elles devaient être courtes : une vingtaine de paires de bases.
- 4) elles ne devaient pas permettre d'autohybridation par la formation de boucles (hair pins) du côté 3', susceptibles d'empêcher les amorces de se fixer sur les séquences à amplifier.
- 5) la température d'hybridation de l'amorce « sens= Forward » et de l'amorce « anti-sens = Reverse » devait être assez proche .

- 6) la distance entre les points d'accrochage des 2 amorces devait être telle que le produit d'amplification soit lisible sur gel d'agarose de 1 à 2 % (taille de l'amplicon comprise entre 100 à 2000 nucléotides).
- 7) Il était préférable que le côté 3' soit un G ou un C pour permettre une liaison plus solide des amorces sur l'ADN à amplifier.

B. 3. Culture des souches et extraction d'ADN : (cf article 1 : Monteil *et al.*, 2007)

B. 4. Amplification des répétitions en tandem par PCR :

Des réactions de PCR ont été réalisées sous un volume de 25µl en présence d'1µl d'ADN purifié ou de 5µl de lysat. **Cinq** enzymes (Taq) polymérase (Taq Takara, Taq Eppendorf, Taq Triple Master , Polymérase Q Biogen : *Isis Pyrococcus*, Taq Invitrogen Pfx *Platinum*) ont été testées sur les 6 souches. Ces Taq polymérase ont été choisies essentiellement pour leur fidélité et leur capacité à corriger les erreurs.

Les caractéristiques des Taq testées ainsi que leurs protocoles correspondants sont détaillés par les **annexes 2 et 3**.

B. 5. Electrophorèse et révélation :

Les produits de PCR sont migrés dans une grande cuve (30cm x 22cm) et sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose de 1% à 2% en tampon TBE (P/V). Les dépôts sont organisés de façon à assurer une alternance entre les marqueurs, les échantillons à analyser et la/les souche(s) utilisée(s) comme référence pour faciliter la lecture des bandes. Les bandes sont détectées par un analyseur d'image (Gel DOC Biorad) qui se base sur l'utilisation d'un logiciel (Quantity One, Biorad) (cf.article : Monteil *et al.*, 2007).

B. 6. Stabilité de la méthode :

Afin de valider cette technique et permettre son utilisation dans d'autres laboratoires, elle doit être d'abord testée sur un grand nombre de souches mais elle doit aussi faire l'objet de tests de reproductibilité et de stabilité.

En effet, il est important de savoir si les marqueurs proposés dans cette étude sont stables au cours du temps, en particulier en ce qui concerne les petits locus. Afin d'évaluer la stabilité de la technique MLVA et notamment celle des marqueurs retenus, une souche d'origine féline F1 a été repiquée successivement une quarantaine de fois sur un milieu gélosé. Les passages intermédiaires (2, 21 et 41) ont été testés par la technique MLVA.

B. 7. Calcul du nombre d'U.B :

Les bandes sur les gels sont lues à l'œil, grâce aux échelles de poids moléculaire et aux bandes correspondant à des tailles connues (souches utilisées comme référence).

La taille des allèles est convertie en nombre de motifs (copies) selon la formule suivante :

$$\text{Nombre de copies} = (\text{Taille de la bande obtenue sur gel} - \Delta) / (\text{Taille d'U.B})$$

Avec :

Δ : Taille des deux amorces plus la taille de zones flanquantes

Taille de l'U.B : Taille du motif.

C. Résultats :

C.1. Sélection des amorces (BHV) :

Le logiciel OLIGO 4.0 nous a permis de sélectionner 30 couples d'amorces selon les critères cités ci-dessus (cf. méthodes). Nous les avons testés sur les 6 souches que nous avons initialement sélectionnées selon leur génotype, leur origine géographique et l'espèce animale d'origine. Nous les avons nommées BHV 1 à BHV 30 pour 'Bartonella Henselae VNTR'.

Les amorces ont été dessinées dans le but d'obtenir une température d'hybridation si possible unique et de l'ordre de 50°C. Le tableau 2 montre que nous avons pu obtenir 23 séquences ayant des amorces amplifiables à 50°C et uniquement 7 qui exigent une T° de 53°C (**Tableau 2**). Nous visions l'unification de la température d'hybridation pour simplifier la technique et faciliter son utilisation par les laboratoires souhaitant l'utiliser en routine.

C.2. Choix de la Taq polymérase :

Après avoir choisi les amorces spécifiques pour l'amplification des séquences candidates sélectionnées en nous basant sur le logiciel de Le Flèche, des essais préliminaires ont été réalisés sur les 6 souches (**Tableau 1**) dans le but de choisir la ou les Taq polymérases susceptibles de nous permettre d'obtenir les résultats attendus pour la souche de la référence. Parmi les 5 Taq polymérases (Taq Eppendorf, Taq Takara, Triple master Eppendorf, Paq Isis et Pfx *Platinum* (Invitrogen)) testées avec les 30 séquences retenues, seule la Taq polymérase Pfx *Platinum* (Invitrogen) nous a donné des résultats satisfaisants et répétables (**cf. Figure 3**).

C.3. Choix du programme de PCR :

Plusieurs programmes ont été testés afin de choisir le programme adéquat permettant de bien amplifier les séquences candidates (**cf. annexe 3**). Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la température d'hybridation des amorces et nous avons essayé de standardiser le programme pour tous les BHV (1 à 30). Ainsi que précisé en C.1, nous avons essayé d'unifier le plus possible le programme de PCR. Au final, le programme que nous avons appliqué pendant notre étude est le suivant :

- 1) dénaturation initiale pendant 5 minutes à 94°C
- 2) 35 cycles comportant : une dénaturation pendant 30 secondes à 94°C, une hybridation pendant 30 secondes à 50°C ou 53°C selon le BHV et une première extension pendant 1 minute à 72°C
- 3) extension finale pendant 7 minutes à 72°C

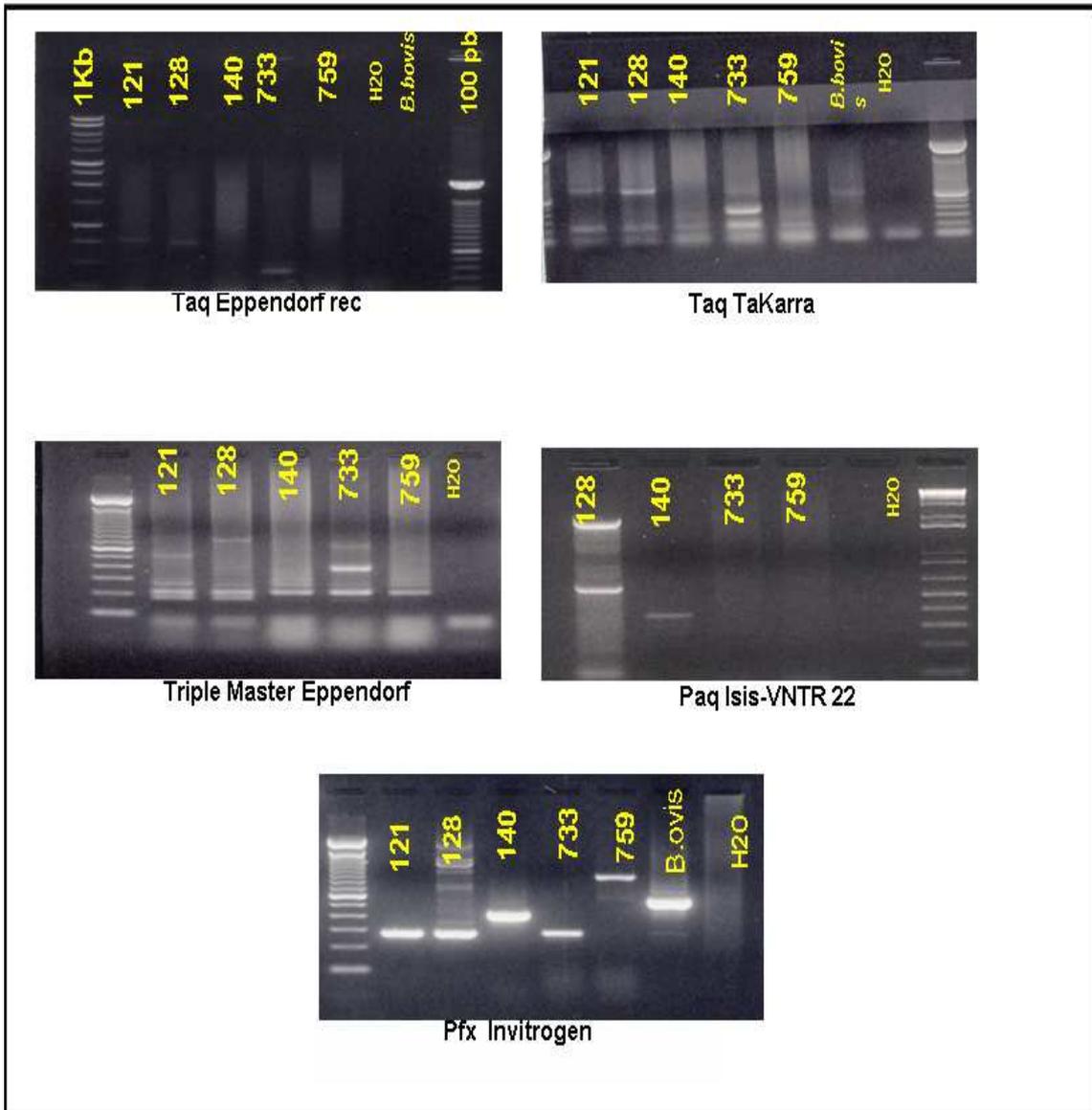


Figure 3: Choix de la Taq Polymérase : Exemple : VNTR 10 et 22

Nom du VNTR	Taille d'U.B (pb)	Nombre de copies	Séquences des amorces (5'→3')	T° d'hybridation	Δ°C	Taille du produit PCR
BHV-1	13	11	F : AGAGTGGTTCGCAAGTGTATGTA R : AGCAAGCAA TA CA ACAA GCAA AA	50.4	2.8	443
BHV-2	15	4.9	F : CGAAA CA GCAA GAA TA ATACC R : GAGAA TGTA AAA AGA TTGTA GCG	48.4	2.2	269
BHV-3	16	5.7	F : GGAGAACCTGATTTACTGCGTG R : TGATCGACGAAAATAA GTGA GAGC	48.8	1.4	282
BHV-4	21	7.1	F : AAATGCTTA TGA TGCTGGTC R : CATAACAGGCTCACTCGGAT	50.4	2.3	247
BHV-5	23	2.7	F : TTGAGTGTGGATTA TGGAAA R : CACCTTATCA TTTCTTTGC	48.5	0.8	312
BHV-6	33	2.4	F : A AAGTGGGGAGGGGAA GAT R : GCTGTCTGGGTTCTGA TGC	51.5	1.1	190
BHV-7	34	1.9	F : GGTTTTACAGGA GGATTCATAGG R : CGAAAAACCTCAATAA TAA GAA CAG	48.3	1.6	359
BHV-8	40	2	F : GCTCTTTT CGT TTAGTGGTGTCT R : AAGCGCAAA TA AAAA TGGCAA	50	2	406
BHV-9	45	13.8	F : AATCA AACTCTCAA AA ACACAA G R : TGCTCTGCTTCGTTGCTCA	51.7	3	336
BHV-10	45	19.8	F : AGGACGCTCTTA CGA ACTT R : AAAA TA CTCGGAGGA GGGT	51.3	1.1	181
BHV-11	60	3.9	F : CCATCTGTGTTTT GTTATT R : ACCA CCAATCTTTACAA TA 317	50.4	2.1	299
BHV-12	66	2	F : GTTCAA AA GACATAA AGGTAGA GCA GG R : GCGCAAA TA AAAA TGGCAA GA	49.5	1.4	317
BHV-13	84	5.3	F : CCTTCTCCA CA ACAA TCAGT R : TTCAAGCAA TAAGTT CGTT	50.8	1.4	149
BHV-14	108	1.9	F : CCATCCTTCCACATCT R : GTTGTGTGGAAGA GGTG	50.6	1.4	248
BHV-15	126	4.1	F : ACTTCTTTA CCAGCACTGT R : GTTCCTTCTACTTTA CCTGA	51.3	2.9	411
BHV-16	277	2	F : TTCCTGTCTTTATTGGTCAT R : AGGAAA TA CA GCA GCA TA AG	50.6	0.6	361
BHV-17	29	2.8	F : ACATCCGTCTCCCTCTTG R : TATGTTGGTGGGTA TGGGA A	51.6	1	194
BHV-18	33	3.2	F : ATGGTCGCTTA TGGA GTTT R : GTAATCGGGTTCAA AA TCCT	50.6	1.4	504
BHV-19	33	6.7	F : CACCACGCCA TA AA GTA R : AAAGAGTCGTAATAA TCCTGG	53.4	1.4	399
BHV-20	56	2.8	F : CTATGACGGCTATCCTGAAA R : ACATCAGTGGGTTCA TTTTA	50.6	0.7	283
BHV-21	108	2.3	F : A ACAA CTGCTCCCTA ACA R : TCTTGGTTGA TGTGTTGCT	53.7	1.1	392
BHV-22	132	3.1	F : CCCTCAACGCAA AA ATAGA A R : TGAAA ACCCTAAA TA CCGTG	50.7	0.8	331
BHV-23	141	2.3	F : TGATGA CAATGAA ACACAA AC R : GCGGTCCAGTTTGA TAA	49.7	0.1	230
BHV-24	141	7	F : ATTCCTGAGA CCTAGTGATT R : GGTGATAAA GCA TTCATAA	50.5	0.6	281
BHV-25	144	7.2	F : GGGAAAGCGAGTATTGA G R : CCACTCTTTTGTATCTC	50.3	0.9	376
BHV-26	146	5.3	F : CCCACAAA GCAATAA TC R : TGCTGATAGTGCGGTTTC	53.9	1.4	235
BHV-27	225	4	F : AAACCAACAGCAGCACA R : GAAACCGCTGGATA ACC	53.2	0.3	370
BHV-28	252	2.1	F : GCAATATCGCAGTGTGAAA R : TGGTTTGTGGA GGAGGA	53.7	1.2	462
BHV-29	282	2.5	F : CTTCAACGCCTTCAA R : CCATCTTTGTCCATTTGT	53.7	0.5	567
BHV-30	379	2.8	F : ACTTCTCACTA TGCCA CA R : GTGTGTTCTGTTGTGCTAAA T	53.4	0.4	516

Tableau 2 : Caractéristiques des 30 séquences répétées retenues ainsi que des amorces correspondantes lors du développement initial

En fonction de ces BHV, nous avons obtenu des profils monomorphes, dimorphes ou polymorphes (cf. **Figure 4**):

- Monomorphes : BHV 1, 2,3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 16, 17, 20, 27, 29 et 30.
- Dimorphes : BHV 13, 18, 19, 21, 22 et 28.
- Polymorphes : BHV 9, 10, 24, 25 et 26.

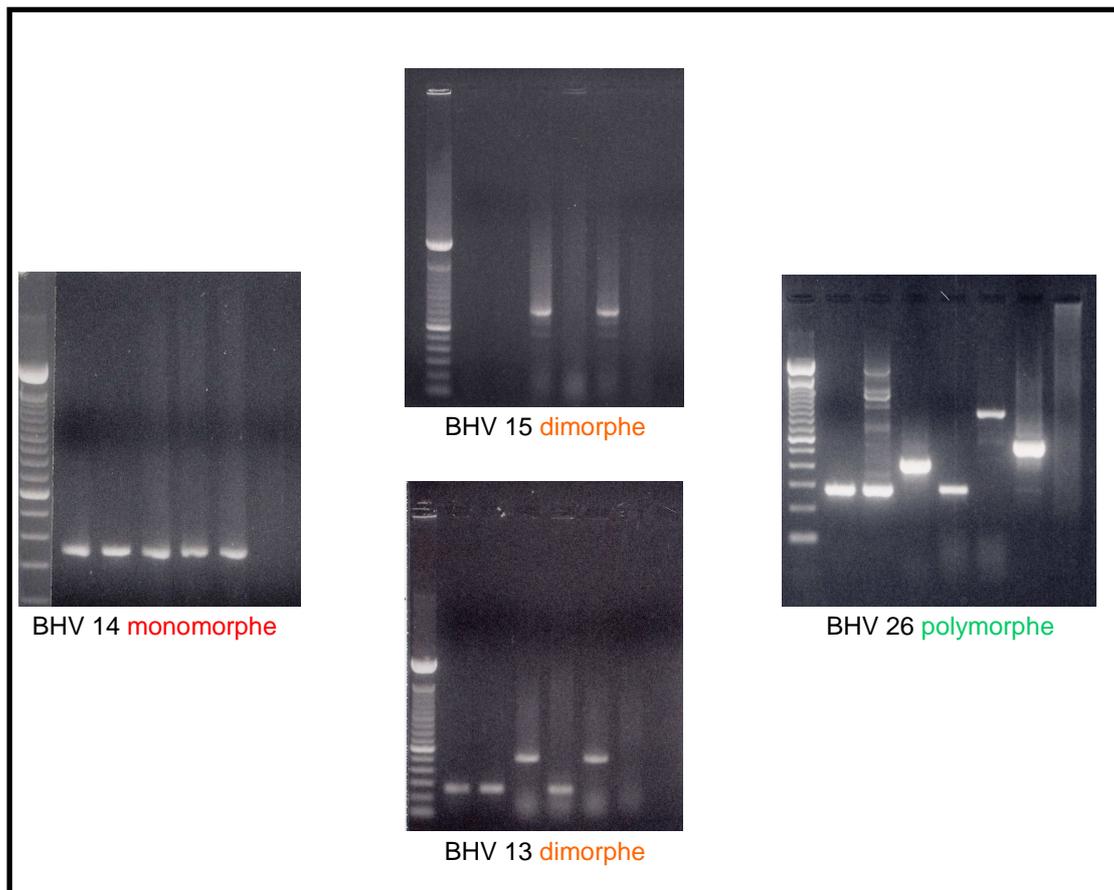


Figure 4 : Exemples de BHV monomorphe (BHV14), dimorphes (BHV 15 & 13) et polymorphe (BHV26)

Parmi les 30 BHV testés, nous n'avons retenu que les 11 qui étaient dimorphes ou polymorphes pour les 6 souches testées (**Tableau 3**).

Nom du VNTR	Taille du VNTR (pb)	Nb de copies (souche H1)	Séquences des amorces 5' ? 3'	T° d'hybridation	Taille du produit
BHV 9	45	13.8	F : AAA TCAA CACTCTCAA AA ACACAA G R : TGCTCTGCTTCGTTTGCTCA	51.7	336
BHV10	45	19.8	F : A GGAA CGCTCTTA CGA ACTT R : AA AATACTTCGGAGGA GGGT	51.3	181
BHV24	141	7	F : ATTCTGAGA CCTTAGTGATT R : GGTGATAA AGCATTCCATAA	50.5	281
BHV25	144	7.2	F : GGGAAA GCGAGTATTGA G R : CCCACTCTTTTGTATCTTC	50.3	376
BHV26	146	5.3	F : CCCA CA AAA GAA ATAA TC R : TGCTGATAGTCCGGTTTC	53.9	235
BHV18	33	3,2	F : ATGGTCGCTTATGGA GTTT R : GTAA TCGGGTCAAAA TCCT	50,6	504
BHV13	84	5,3	F : CTTCTCCACAA CAATCA GT R : TTCAA GCA ATAAGTTTCGTT	50,8	149
BHV19	33	6,7	F : CACCA CCGCCA TAAA GTA R : AAA GAGTCGTAATAA TCCTGG	53,4	399
BHV21	108	2,3	F : AACAAA ACTGCTCCCTA ACA R : TCTGGTTTGATGTGTTGCT	53,7	392
BHV22	132	3,1	F : CCTCAA CGCA AA ATAGAA R : TGAAA CCCTAAA TA CCGTG	50,7	331
BHV28	252	2,1	F : GCAATATCGCAGTGTGAAA R : TGGTTTGTGGAGGA	53,7	462

Tableau 3: Caractéristiques des 11 BHV retenus

Ces 11 BHV ont été ensuite testés sur 44 souches et isolats (**cf. article : Monteil et al., 2007**). Pour quelques BHV tels que BHV 13, 18 et 22, nous n'avons pu mettre en évidence d'amplification pour certaines des souches et isolats étudiés malgré plusieurs essais, ou bien nous avons obtenu des amplifications partielles difficilement interprétables par exemple pour BHV 21. Sur les 11 BHV, cinq se sont avérés être polymorphes : BHV-A (9), BHV-B (10), BHV-C (24), BHV-D (25) et BHV-E (26). Ces derniers ont servi à l'étude du pouvoir discriminant sur 44 échantillons, qui s'est avéré satisfaisant (**cf. article : Monteil et al., 2007**).

C.4. Etude de la stabilité :

Les trois souches F2, F21 et F41 issues respectivement du 2^{ème}, 21^{ème} et 41^{ème} passage de la souche F1 présentent toutes le même profil avec les 5 principaux BHV (A-E).

C.5. Localisation des séquences sélectionnées sur le génome :

Après la sélection des séquences répétées selon les critères définis précédemment, nous avons localisé ces séquences sur le génome de *B. henselae*.

Comme le montre la **figure 5**, les 2/3 des séquences (20 /30 au total) sont localisées dans le dernier quart du génome.

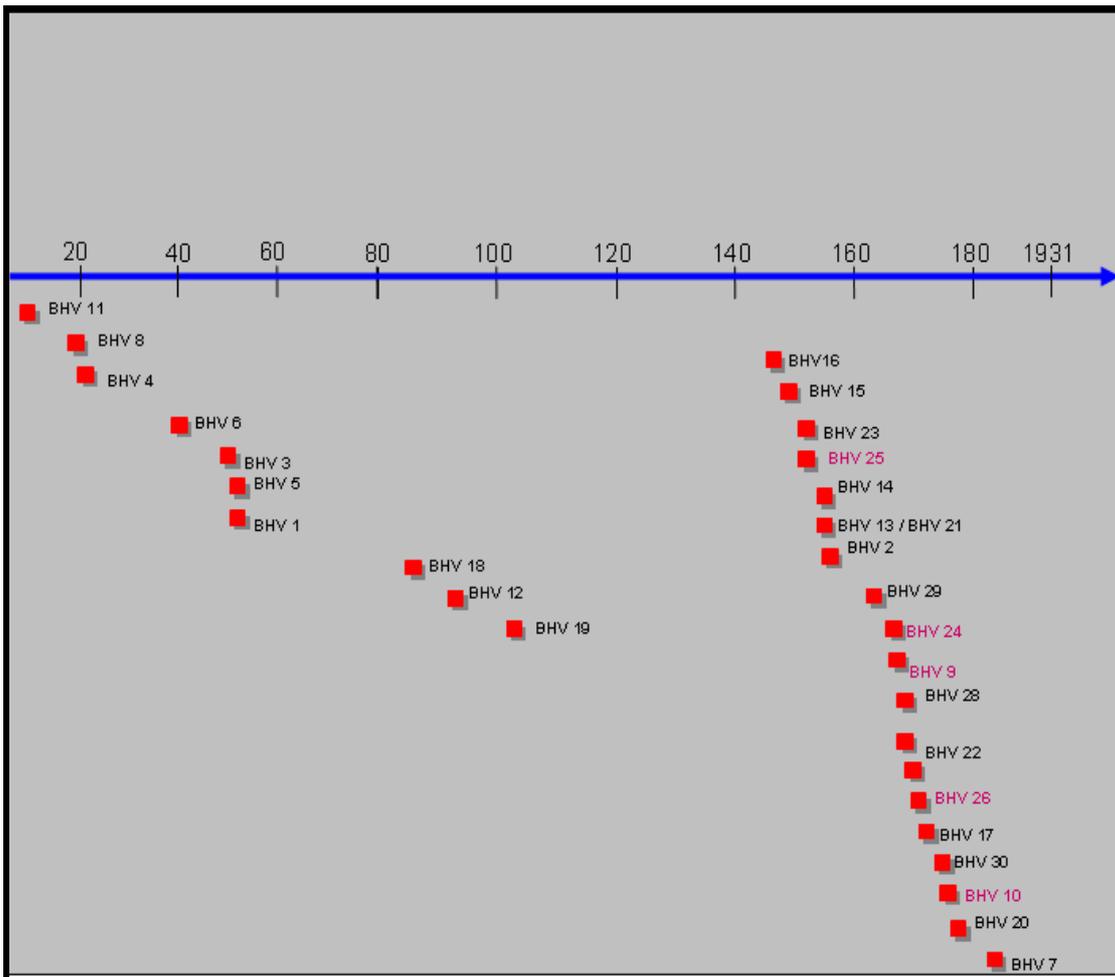


Figure 5 : Localisation génomique des 30 premiers VNTR chez *B.henselae*

D. Discussion et conclusion :

Au cours du développement initial, la mise au point de la technique a nécessité de nombreux ajustements. Le choix de la Taq polymérase a été un élément important en raison des exigences de performances (amplification de segments de tailles très différentes), de fidélité et de spécificité que nous nous imposons. La standardisation et l'uniformisation des conditions de PCR étaient

souhaitables et recherchées afin du pouvoir disposer d'un outil simple. Cette exigence a influencé le choix des amorces ; par ce biais nous sommes parvenus à ce que seules deux températures d'hybridation (50°C et 53°C) soient nécessaires pour les 30 couples d'amorces sélectionnés au départ (BHV-1 à BHV-30). Pour les 5 VNTR principaux retenus, 4 ont été amplifiés à 50°C et seul BHV-26 (BHV-A) a nécessité une température de 53°C. L'hybridation à 50°C de ce couple d'amorces n'était pas efficace parce qu'elle a entraîné des amplifications non spécifiques. Notre intérêt s'est également porté sur les conditions d'électrophorèse, et il s'est avéré nécessaire dans certains cas de réaliser des migrations très longues en distance (jusqu'à 30 cm) et en durée (jusqu'à 34 heures) lorsqu'il a fallu séparer des fragments de taille très voisines (qui diffèrent par 1 seule U.B ou une ½ U.B). Les difficultés rencontrées lors de la mise au point de la technique ont été amplifiées par le manque dans notre laboratoire du matériel permettant de visualiser des U.B inférieures à 30 pb et de distinguer 2 souches différant par une ½ U.B ou 1 U.B. A part les 5 BHV les plus polymorphes, d'autres outils complémentaires ont été utilisés, tels que les valeurs intermédiaires pour BHV-A et BHV-B (prise en compte des ½ U.B.) et les BHV additionnels dimorphes. L'approche la plus pragmatique nous semble donc d'utiliser d'abord les 5 principaux BHV en premier intention et de limiter l'utilisation des autres BHV dans le cas où les souches étudiées présentent un profil identique avec les 5 principaux.

La position de la majorité des séquences candidates sélectionnées (20 séquences/30 au total, soit 2/3) sur le génome est cependant problématique parce qu'elle ne semble pas refléter le polymorphisme qui pourrait exister dans la région située en amont de cette zone, c'est-à-dire dans les trois premiers quarts, entre l'origine et 1400 Kb.

L'article publié en 2007 dans le journal « Microbiology » (Monteil *et al.*, 2007) a notamment été consacré à cette première étape. Cet article évoque également la validation de la technique en utilisant 44 isolats et souches. Cette technique a permis de séparer les isolats et/ou souches testés en 2 groupes (G1 & G2) (31 profils) et ayant globalement un index de diversité de 0.98.

Development of discriminatory multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Bartonella henselae*

Martine Monteil,¹ Benoît Durand,² Rim Bouchouicha,¹ Elisabeth Petit,¹ Bruno Chomel,³ Mardjan Arvand,⁴ Henri-Jean Boulouis^{1†} and Nadia Haddad¹

Correspondence
Henri-Jean Boulouis
hjboulouis@vet-alfort.fr

¹UMR BIPAR/AFSSA/INRA/ENVA/UVPM, 94703 Maisons-Alfort, France

²AFSSA/LERPAZ Unité d'épidémiologie, 94703 Maisons-Alfort, France

³Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA 95616, USA

⁴Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universität Rostock, Rostock, Germany

Received 11 August 2006
Revised 23 November 2006
Accepted 29 November 2006

Bartonella henselae is a zoonotic bacterium that infects cats and humans. Several attempts have been made to develop typing techniques for epidemiological purposes; however, most of the techniques developed do not appear to be sufficiently discriminatory or easy to use. In order to develop multilocus variable number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) for *B. henselae*, 30 VNTR candidates were selected from the genome sequence of the reference strain Houston 1 (H1). The VNTR candidates were initially tested by PCR on six *B. henselae* isolates from different geographical areas. Five VNTRs were selected from those that showed two or more alleles. These five *B. henselae* VNTRs (BHV) were tested on 42 feline *B. henselae* isolates and strains from France (23 isolates), Denmark (17 isolates), the Philippines (one isolate) and the USA (F1 strain), on one human isolate from Germany, and on the H1 reference strain. These BHVs were sufficiently discriminatory to obtain 31 different profiles (corresponding to two different groups) among the 44 isolates and strains of *B. henselae* tested. Thirty-five profiles were obtained using these BHVs and two variant alleles. The combination of the five markers led to a diversity index of 0.98. The stability of the five BHVs was demonstrated on the feline F1 strain, with no change in stability observed after 2, 21 and 41 passages. This is believed to be the first study conducted on *B. henselae* typing using MLVA, and it demonstrates the high quality of this technique for discriminating between *B. henselae* isolates.

INTRODUCTION

Bartonella are fastidious haemotropic Gram-negative bacteria that are isolated from a wide range of mammals, including humans (Boulouis *et al.*, 2005). The species *Bartonella henselae* is well recognized as a zoonotic agent, and several diseases have been associated with this species in humans and carnivores. Cat-scratch disease is the most benign clinical form of human infection (Chomel *et al.*, 2004). Less-frequently occurring forms of infection have

been described in immunocompromised patients; these infections include bacillary angiomatosis and parenchymal bacillary peliosis (Koehler, 1995), endocarditis (Bookman *et al.*, 2004) and neuroretinitis (Depeyre *et al.*, 2005). Several cases of *B. henselae* encephalopathy have been described in immunocompetent patients (Boulouis *et al.*, 2005). Some of these human diseases have also been described in dogs (Kitchell *et al.*, 2000; Pesavento *et al.*, 2005) and cats (Chomel *et al.*, 2003). On a yearly basis, about 22 000 cases of human infection occur in the USA (Jackson *et al.*, 1993), and 2000 cases per year in the Netherlands (Bergmans *et al.*, 1997); these prevalences are considered to be underestimated. Cats are the main reservoir of *B. henselae*, as they can remain bacteraemic for months. Depending on the cat category and the country of origin of the cat, prevalence of feline *B. henselae* infection varies from 1% (Arvand *et al.*, 2001) to 56% (Chomel *et al.*, 1999).

†Present address: Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94704, Maisons-Alfort, Cedex, France.

Abbreviations: BHV, *Bartonella henselae* variable number tandem repeat; DI, discrimination index; MLST, multilocus sequence technique; MLVA, multilocus variable-number tandem repeat analysis; MST, multispacer typing technique; NJ, neighbour joining; VNTR, variable-number tandem repeat.

To date, there have been several attempts to develop molecular typing techniques for *B. henselae*. The first investigations led to the identification of two so-called 'genotypes' within the species *B. henselae*: genotype I (*B. henselae* Houston-1 strain belongs to this genotype), and genotype II (Marseilles-like isolates) (Bergmans *et al.*, 1996; Drancourt *et al.*, 1996; La Scola *et al.*, 2002). Even when the difference between genotypes I and II is based solely on one nucleotide difference in the 16S rRNA sequence, studies have suggested that *B. henselae* genotypes may induce different pathological features in HIV-infected patients (Chang *et al.*, 2002). The two genotypes are not equally distributed in feline and human populations (Bergmans *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2002). Other attempts to develop more discriminatory typing techniques have been undertaken. Until recently, PFGE appeared to be the most discriminatory technique when compared with those developed earlier (Matar *et al.*, 1993; Rodriguez-Barradas *et al.*, 1995; Koehler *et al.*, 1997; Sander *et al.*, 1998; Handley & Regnery, 2000; Maruyama *et al.*, 2001; Arvand *et al.*, 2001; Dillon *et al.*, 2002).

More recently, two techniques based on the sequencing of selected genomic areas have been developed. The multilocus sequence technique (MLST) (Iredell *et al.*, 2003) has a discriminatory power equivalent to that of PFGE. The multispacer typing technique (MST) (Li *et al.*, 2006) appears to be a highly efficient method for genotyping *B. henselae* (39 profiles for 126 isolates). As these two techniques are based on sequencing, they are easily transferable; nevertheless, the necessity to sequence up to nine DNA regions (sometimes in both senses) for each isolate to be tested makes them costly, and not easily accessible for routine typing, for many potential users.

Variable number tandem repeats (VNTRs) represent good candidates for the development of a discriminatory, more user-friendly and less costly typing technique. VNTRs are microsatellite- or minisatellite-like structures initially described in eukaryotic cells. The combination of different VNTRs can lead to a good level of polymorphism (Vergnaud & Denoëud, 2000). This principle has been the basis for the development of multilocus VNTR analysis (MLVA). In a growing number of prokaryotes, including those displaying low genetic heterogeneity when using other techniques, VNTR typing has proved to be discriminatory, simple and transferable, with an excellent level of stability for the markers (Lindstedt, 2005). This type of epidemiological marker has been used for many pathogenic bacteria, such as *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Leptospira interrogans* and *Mycobacterium tuberculosis* (Keim *et al.*, 2000; Le Flèche *et al.*, 2001; Mazars *et al.*, 2001; Majed *et al.*, 2005; Slack *et al.*, 2005).

Despite the availability of *B. henselae*-typing techniques, several epidemiological issues have not yet been fully investigated. For example, it is important to link a human infection to a specific infection of a given potential animal carrier. One such study has been initiated by Chang *et al.*

(2002), using the PFGE technique; however, a more user-friendly technique could help to investigate this link more easily. Comparison of isolates from different countries would help to establish their biodiversity and to determine whether some geographic markers can be identified, as suggested by the recent results of Li *et al.* (2006). Also, we would look for the presence of dominant isolates or clusters with potential epidemic significance, which has not been described to date (Li *et al.*, 2006). Furthermore, the role of fleas as selective carriers of *B. henselae* isolates remains unknown. In order to investigate these issues, new epidemiological markers are needed. The aim of this study was to establish the discriminatory power of 30 VNTR candidates. These potential VNTRs were selected from the sequence genome of the reference strain *B. henselae* H1, and they were tested on 44 isolates or strains of *B. henselae*, including *B. henselae* H1.

METHODS

Isolates and DNA isolation. Forty-four *B. henselae* isolates and strains were used: 23 isolates from French cats [belonging to the series studied by Gurfield *et al.* (2001)], 17 isolates from Danish cats (Chomel *et al.*, 2002), one isolate from a Philippino cat (Chomel *et al.*, 1999), one human isolate from Germany (Arvand *et al.*, 2001), the *B. henselae* reference strain Houston 1 (ATCC 49882), and the American feline type I strain F1 297172 (Yamamoto *et al.*, 2002). The characteristics of these isolates or strains according to their geographic origin and genotype are summarized in Table 1. All of the French isolates originated from the same region (Ile de France), whereas the Danish isolates were chosen because they had been collected from various areas in Denmark. The two single isolates, one from Germany, and one from the Philippines, were included to enlarge the geographical diversity of the tested isolates. The genotypes indicated in Table 1 are those that have been identified by the laboratories that provided the isolates, either using RFLP techniques (Chomel *et al.*, 2002), or 16S rRNA gene typing by PCR (Maruyama *et al.*, 2000). For the stability assay, we used the American feline type I strain F1 297172, which was passed 2, 21 and 41 times on rabbit blood agar medium (Gurfield *et al.*, 2001). All isolates and strains were cultivated on sheep blood agar medium (BioMérieux) for 4–5 days at 35 °C, with 5% CO₂. All samples were prepared as DNA extracts, except those from the German isolate.

Table 1. Geographical origin and 16S rRNA genotype of the *B. henselae* isolates and strains used for the evaluation of the 11 BHV candidates (BHV-A to -K)

Geographical origin	Host*	No. of isolates/strains		
		Genotype I	Genotype II	Total
Denmark	F	1	16	17
France	F	7	16	23
Germany	H	1	0	1
The Philippines	F	1	0	1
USA (reference strain)	H	1	0	1
USA (passed strain)	F	1	0	1
Total	–	12	32	44

*F, feline isolate; H, human isolate or strain.

For DNA extraction, bacteria were scraped from the agar, and suspended in 500 µl sterile distilled water. These suspensions were boiled for 10 min, and centrifuged at 3000 g for 15 min. Nucleo Spin Tissue kit (Macherey-Nagel) was used for the purified DNA preparation, according to the manufacturer's instructions. The German isolate was used as a cell lysate supernatant, after the lysate had been boiled and resuspended in distilled water. The DNA solutions and the cell lysate supernatant were stored at -20 °C before testing.

Computer analysis of repetitive DNA sequences for use as VNTR candidates. The genomic DNA sequence of the *B. henselae* reference strain ATCC 49882 (available from NCBI) was screened for repetitive DNA sequences with the tandem repeats database developed by Le Flèche *et al.* (2001); the database is freely available at <http://minisatellites.u-psud.fr>. The following criteria were considered for application to the selection of VNTR candidates: (i) the absence of homology of a candidate sequence and of its flanking regions with sequences belonging to other genera; (ii) the length of the basic repetitive unit had to be between 30 and 400 bp. Predicted PCR product sizes for the *B. henselae* reference strain were also deduced using the minisatellite website (<http://minisatellites.u-psud.fr>). BLASTN analysis of the repeat sequences allowed exclusion of the repeats present in other bacterial genomes. The percentage values for the conservation of the repeated units present in the reference strain ATCC 49882 were also provided by the database developed by Le Flèche *et al.* (2001).

Primer design, and VNTR candidate amplification, analysis and final selection. The tandem repeats database described by Le Flèche *et al.* (2001) also provides the sequences flanking the VNTR candidate, both 450 bp upstream and 450 bp downstream of the repeat motif. BLASTN analysis of these flanking sequences was used for designing the forward and reverse primers. The VNTR candidates were known as BHVs (*B. henselae* VNTRs), and each selected VNTR was designated BHV followed by an alphabetic letter. The location of each BHV in the *Bartonella* genome is described as the 'locus'. An 'allele' corresponds to a given number of repeated units for a given BHV or locus.

Amplification of VNTRs was conducted in a volume of 25 µl containing 1 µl purified DNA or 5 µl cell lysate, 1 × Pfx amplification buffer, 0.4 mM of each dNTP, 1 mM MgSO₄, 0.8 µM of each primer, 1 × PCR enhancer solution, and 1 unit Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen). An initial denaturation step at 94 °C for 5 min was followed by the following amplification programme: DNA was denatured for 30 s at 94 °C, and primers were annealed for 30 s at the optimal temperature (50 °C for BHV-A, BHV-B, BHV-C and BHV-D, and 53 °C for BHV-E), and extended at 72 °C for 1 min. After 40 cycles, there was a final extension programme at 72 °C for 7 min.

PCR products were separated by gel electrophoresis in 1–2% agarose gels, and stained with ethidium bromide. Long gels (30 cm), long migration times (up to 27 h), and a combination of different molecular markers (from 100 bp to 1 kb), including ΦX174 *Hae*II fragments (Invitrogen), were used for BHV-A and -B. These procedures allowed us to distinguish between two alleles, which could differ by as little as 22 bp (corresponding to 0.5 repeated unit for these two BHVs) even when these alleles were more than 1000 bp in length. For a given BHV, the expected PCR product length for the *B. henselae* H1 strain took into account the unit length, the number of units in the *B. henselae* H1 strain locus, and the length of the flanking sequences separating primer binding sites from BHV regions. The estimated size range for the different alleles was deduced from the allele size range, and from the basic unit length. For incomplete units, the calculated values were rounded up or down to the closest whole number; for instance, 13.5 or 13.8 units were considered to be 14 units, and 5.3 units was considered to be 5 units. In a second step, variant alleles (i.e. containing half-length

units) that were initially rounded up (e.g. 14.5 units, which were rounded up to 15) were individualized when they provided additional information.

The final selection of BHVs was based on the following criteria: (i) candidate loci with less than two different alleles were excluded; (ii) when two BHV candidates were isomorphic, one was excluded; and (iii) the band patterns were fully readable.

Data analysis. For the evaluation of the discriminatory power of the selected BHVs, the Hunter and Gaston discrimination index (DI) was used (Hunter & Gaston, 1988), as recommended by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group on Epidemiological Markers (Struelens, 1996). This index measures the probability that two isolates or strains, randomly chosen among the 44 isolates or strains selected, will have different types. It is defined by:

$$DI = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S nj(nj-1)$$

where N is the number of isolates or strains, S is the total number of alleles, and n_j is the number of isolates or strains with the allele j (Hunter & Gaston, 1988). Polymorphism is considered high when this index is higher than 95% (Struelens, 1996).

Clustering analysis was done using a phenetic approach, since the comparison of isolates and strains was based on small genomic sequences. The distance matrix was constructed by counting the number of different loci between isolates. With this method, the character states are considered to be unordered and, for a given BHV, the same weight is given to a small or a large difference of the number of repeats. Neighbour-joining (NJ) cluster analysis was then performed using PHYLIP (Felsenstein, 1989), with the isolate from the Philippines used as an outgroup.

RESULTS

Selection of BHV candidates

From the sequence of the reference strain *B. henselae* H1, 30 BHV candidates that fitted the selection criteria were identified. The percentage matches of tandem repeats varied from 57 to 97%. These 30 BHV candidates were further tested for evaluation of their polymorphism.

Using a first series of six isolates [three genotype I isolates (one French isolate, the Philippino isolate, and *B. henselae* H1) and three genotype II isolates (two French isolates, and one Danish isolate)], 11 out of 30 BHVs were found to be at least dimorphic and were considered for further testing.

All isolates or strains of *B. henselae*, with the exception of the American passed strain F1 297172 (Table 1), were tested with these 11 BHVs. Five BHVs (A–E) were finally selected based on the three criteria described above. BHV-D was located inside a gene, whereas the other four interfered with the beginning of coding sequences. The characteristics of the five selected BHVs are described in Table 2. For all isolates that were tested twice (more than 50% of our isolates), we obtained results that were 100% identical. In addition, in order to test the stability of our markers, the American feline strain F1 297172 was submitted to MLVA after 2, 21 and 41

Table 2. Characteristics of the repeat motifs of the selected BHV and the corresponding forward and reverse primers

Potential VNTR name*	Unit length (bp)	GC content (%)	Conservation (%)	Primers sequences for VNTR (5'→3')	Expected PCR product length in H1 strain (bp)	No. of units in H1 strain	Estimated allele size range	Number of alleles/loci‡	Allele size range (units)‡
BHV-A (1698439)	45	52	95	F: AAATCAACACTCTCAAAAACACAAG R: TGCTCTGCTTC TTTGCTCA	912	14	741–1011	7 [9]	10–16 [9.5–15.5]
BHV-B (1651759)	45	59	84	F: AGGAACGCTCTTAGCAACTT R: AAAATACCTTCGGAGGAGGGT	1027	20	406–1666	9 [10]	6–34 [6–33.5]
BHV-C (1644993)	141	45	97	F: ATTCTGAGACCTTAGTGATT R: GGTGATAAAGCAATCCATAA	1127	10	422–1550	7	2–10
BHV-D (1482978)	144	38	97	F: GGGAAAGCGAGTATTGAG R: CCCACTCTTTTGTATCTTC	1269	7	376–1960	7	1–12
BHV-E (1678645)	146	51	96	F: CCCACAAAAGCAATAAC R: TGCTGATAGTGGGGTTTC	863	5	235–965	6	1–6

*The position of the BHV first base in the *B. henselae* reference strain Houston 1 (ATCC 49882) is given in parentheses.

†F, forward; R, reverse.

‡Values in square brackets correspond to the allele sizes when variant alleles for BHV-A and BHV-B are not rounded up to the next whole number.

passages, and the marker profiles were found to be the same as before for the five selected BHVs (A–E).

BHV analysis

Genetic diversity. A minimum of three, and a maximum of nine alleles per locus were observed with the five selected BHVs, generating a high level of polymorphism (Table 2). The discriminatory power of each BHV locus was estimated from the genetic DI values based on the number of alleles and their frequency. The high values for these individual DIs reflects their good potential as genetic diversity markers: 0.83 for BHV-A, 0.78 for BHV-B, 0.67 for BHV-C, 0.81 for BHV-D, and 0.72 for BHV-E. Moreover, the global DI value, when combining the five BHVs for the French and Danish isolates, was 0.98.

With the five BHVs, 29 different profiles were obtained for the 40 French and Danish isolates of *B. henselae* tested, corresponding to two different groups: group 1 and group 2 (Fig. 1). These two groups were distinguished at the level of the first bifurcation of the tree, which was just beyond the outgroup.

In addition, for BHV-A and BHV-B, we observed variant alleles (Fig. 2). Such variant alleles were not taken into account at the first screening level, which is reflected in the phenogram (Fig. 1).

Comparison of isolates from different origins. Eighteen BHV profiles were observed among the 23 French isolates, and 15 BHV profiles were observed among the 17 Danish isolates, of which four shared identical profiles. By comparison with the European isolates, the Philippino isolate was the only one that presented an original profile characterized by the presence of alleles at two different loci which were not observed in any of the other tested isolates (Fig. 1).

The Berlin isolate could not be distinguished from *B. henselae* H1 (reference strain) with the five BHV markers used (Fig. 1), or when using six additional BHVs (data not shown).

Additional markers. Within group 2 (Fig. 1), some isolates originating from France and Denmark looked identical when they were compared using the five BHVs, with rounded-up or -down values. However, when using the complementary tool represented by the variant alleles defined for BHV-A and -B, the group of four isolates was resolved into two groups of two isolates. In the same way, the two groups of three isolates were resolved into two groups of two isolates and two single isolates. Eventually, one pair was resolved into two different isolates (FR97 and FR123). Only seven identical pairs remained. Except for one pair (FR963 and DK229), all remaining pairs comprised isolates from the same country (French/French or Danish/Danish). In one of these four pairs the isolates (FR 74 and FR 76; Fig. 1) were from the same cat.

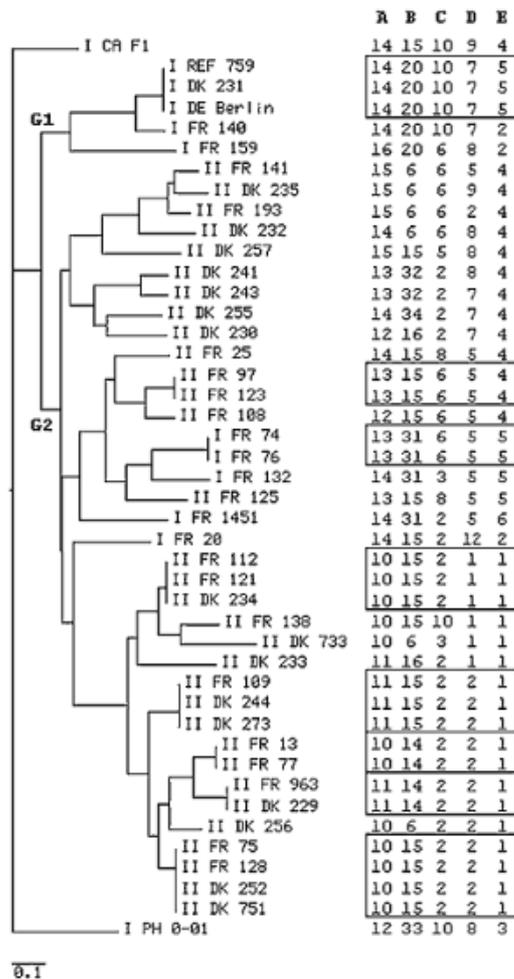


Fig. 1. Clustering analysis of 44 *B. henselae* isolates by MLVA using five markers. G1 and G2, group 1 and group 2. The data are expressed as numbers of repeats for each of the five BHVs (BHV-A to -E). The dendrogram leaves indicate the genotype (I or II), the country of origin (FR, France; DK, Denmark; DE, Germany; PH, the Philippines). Strain I REF 759 is the reference strain Houston 1 (ATCC 49882). Groups of identical isolates are boxed.

Comparison of genotypes I and II. In the phenogram, the smallest group (5 out of 44) was completely composed of strains and isolates belonging to genotype I, i.e. 45% of the isolates and strains harbouring this genotype. The five other genotype I French isolates did not appear to be randomly scattered, but formed two small subgroups within the second group, which included all the isolates belonging to genotype II. The American type I feline strain F1 (297172) was totally out of the tree.

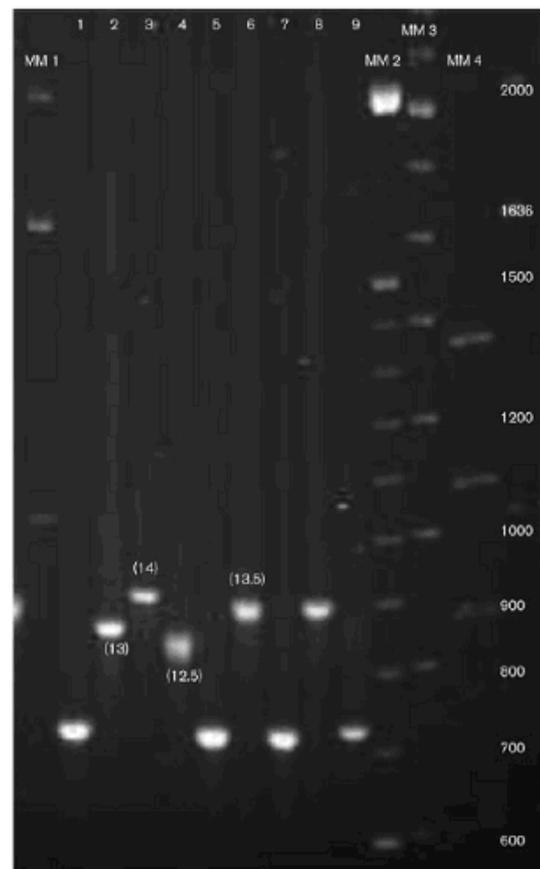


Fig. 2. DNA amplification of eight *B. henselae* isolates and one reference strain showing variant alleles for the BHV-A locus. Markers: MM1, 1000 bp ladder; MM2, 100 bp ladder; MM3, 200 bp ladder; MM4, Φ X174 *Hae* III ladder. Alleles: 1, FR77; 2, FR97; 3, reference strain H1; 4, FR108; 5, FR112; 6, FR123; 7, FR13; 8, FR125; 9, FR138.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study of *B. henselae* VNTR typing. Thirty BHV candidates were tested. As few as five BHVs were sufficient to obtain a very high level of polymorphism. Of the 44 isolates and strains tested, including the ATCC 49882 human strain Houston 1, a human isolate from Germany, a feline Philippino isolate, and an American feline strain, 31 different profiles were obtained (35 profiles were obtained with variant alleles). The Hunter and Gaston DI was always higher than 98%, i.e. clearly above the cut-off of 95%, either when considering all isolates together, or when considering isolates from one country only (France or Denmark, data not shown). The limited number of BHVs needed, and the standardized PCR conditions, in association with the very good reproducibility, made this technique accurate, very user friendly, and

easily transferable. In terms of allelic stability, limited indication was provided by the observation that two isolates from a same cat (FR74 and FR76) displayed the same MLVA type with the five markers. Stability was further demonstrated by the fact that for the strain F1 297172 all the alleles remained unchanged for the five BHVs after 21 and 41 passages.

The discriminatory power of this MLVA technique, using only five BHVs, appears to be high in comparison with the results obtained with the majority of the typing techniques proposed for *B. henselae*. The performance of MLST has been convincingly demonstrated to be comparable with that of PFGE by Iredell *et al.* (2003), using the same isolates for testing both techniques. In their study, Li *et al.* (2006) conclude that MST is more discriminatory than MLST. Some findings of our study suggest that MLVA is even more discriminatory than MST, at least when considering French isolates: Li *et al.* (2006) tested 28 French isolates, and obtained five different profiles using MST; in our study, 23 French isolates from the same area (Ile de France) were tested using MLVA, and we obtained 18 different profiles. Since Li *et al.* (2006) reported more heterogeneity among their Asian isolates than among their European isolates, it would be interesting to check if the apparent superiority of MLVA is confirmed when testing isolates from locations other than France and Denmark.

Furthermore, the present technique is even more discriminatory when using variant alleles for BHV-A and -B as complementary tools. Other authors, such as Farlow *et al.* (2002), Pourcel *et al.* (2003), and Johansson *et al.* (2004), have described the presence of variant alleles for *Borrelia*, *Legionella* and *Francisella*, respectively. These complementary tools have been useful in a few cases, when more accurate discrimination between isolates, especially French versus Danish isolates, was required.

Using an isolate from the Philippines – which had MLVA patterns very different from the European isolates – as an outgroup, two main groups were detected in the NJ tree. Isolates from France and Denmark grouped together in the majority of the cases; this is not surprising, as they belong to the same continent. A similar trend has already been observed with other bacterial species, e.g. *Mycobacterium bovis*, when using MLVA (Skuce *et al.*, 2002) and spoligotyping (Haddad *et al.*, 2001).

When compared with the European isolates, the isolate from the Philippines, and the American feline strain F1 297172, presented original profiles. This suggests that new groups could emerge from BHV typing of non-European isolates, as observed by Li *et al.* (2006) using MST. In contrast, the human isolate from Berlin was identical to *B. henselae* H1 strain (human ATCC 49882 strain), despite their very different geographic origins, suggesting a possible common origin. Such a similarity between these two human isolates/strains has been described by Arvand *et al.* (2001) using the PFGE technique.

There was no clear cut-off between the two *B. henselae* genotypes in terms of BHV patterns. Similar observations have been made with techniques used by others (Chang *et al.*, 2002; Dillon *et al.*, 2002). The absence of a correlation between genotypes I and II, and the distribution of the isolates according to their MLVA profiles, is not surprising. First, discrimination between genotypes I and II is based on a unique difference of one nucleotide in the sequence of the 16S rRNA gene; thus, the phylogenetic meaning of the discrimination is questionable. Second, phenograms are based on only a few informative characters, and, therefore, a difference at a single locus can change the positioning of isolates in the phenogram. Third, for a given allele, even if it is stable in a given period, a reduction or an increase in the numbers of repeated units can occur with time. This makes it possible that two isolates harbouring different I/II genotypes can evolve to closer or even identical BHV profiles, and become included in the same group (homoplasy); this could be the case for the genotype I isolates located within the group that almost otherwise consists of genotype II isolates (Fig. 1). Eventually, some modifications of BHV profiles may be linked to horizontal transfer, the occurrence of which in *B. henselae* has been suspected by other authors (Dillon *et al.*, 2002; Iredell *et al.*, 2003). Nevertheless, 5 of the 12 isolates belonging to genotype I form a clearly individualized group (group 1). Such a distribution needs to be further confirmed using a larger collection of isolates belonging to genotype I.

In conclusion, despite the small size of the genome of *B. henselae*, 11 BHV candidates revealed some degree of polymorphism. Among them, five BHVs were selected because their combination provided a high level of polymorphism, both at the level of all the 44 *B. henselae* isolates tested (DI 0.98), and at the level of French or Danish isolates measured separately. Compared with the majority of the other techniques developed for *B. henselae* typing, MLVA appears to be very discriminatory. However, this needs to be confirmed by comparing the levels of heterogeneity obtained for the same isolates using MLVA and other techniques, especially PFGE, MLST and/or MST.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Hans Petersen (Hinnerup Animal Hospital, Dyr-laegegruppen Frijsenborg, Vestergade 3, 8382 Hinnerup, Denmark) for providing the isolates from Denmark, Rick Kasten (Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA 95616, USA) for providing the American passed strain F1 297172, and Corinne Bouillan and Christelle Gandoin for their technical assistance.

REFERENCES

- Arvand, M., Klose, A. J., Schwartz-Porsche, D., Hahn, H. & Wendt, C. (2001). Genetic variability and prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Berlin, Germany, and analysis of its genetic relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic for humans. *J Clin Microbiol* 39, 743–746.

- Bergmans, A. M., Schellekens, J., van Embden, J. & Schouls, L. M. (1996). Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 34, 254–260.
- Bergmans, A. M., de Jong, C. M., van Amerongen, G., Schot, C. S. & Schouls, L. M. (1997). Prevalence of *Bartonella* species in domestic cats in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 35, 2256–2261.
- Bookman, I., Scholey, J. W., Jassal, S. V., Lajoie, G. & Herzenberg, A. M. (2004). Necrotizing glomerulonephritis caused by *Bartonella henselae* endocarditis. *Am J Kidney Dis* 43, 25–30.
- Boulouis, H. J., Chang, C. C., Henn, J. B., Kasten, R. W. & Chomel, B. B. (2005). Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res* 36, 383–410.
- Chang, C. C., Chomel, B. B., Kasten, R. W., Tappero, J. W., Sanchez, M. A. & Koehler, J. E. (2002). Molecular epidemiology of *Bartonella henselae* infection in human immunodeficiency virus-infected patients and their cat contacts, using pulsed-field gel electrophoresis and genotyping. *J Infect Dis* 186, 1733–1739.
- Chomel, B. B., Carlos, E. T., Kasten, R. W., Yamamoto, K., Chang, C. C., Carlos, R. S., Abenes, M. V. & Pajares, C. M. (1999). *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from the Philippines. *Am J Trop Med Hyg* 60, 593–597.
- Chomel, B. B., Boulouis, H. J., Petersen, H., Kasten, R. W., Yamamoto, K., Chang, C. C., Gandoin, C., Bouillin, C. & Hew, C. M. (2002). Prevalence of *Bartonella* infection in domestic cats in Denmark. *Vet Res* 33, 205–213.
- Chomel, B. B., Wey, A. C., Kasten, R. W., Stacy, B. A. & Labelle, P. (2003). Fatal case of endocarditis associated with *Bartonella henselae* type I infection in a domestic cat. *J Clin Microbiol* 41, 5337–5339.
- Chomel, B. B., Boulouis, H. J. & Breitschwerdt, E. B. (2004). Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. *J Am Vet Med Assoc* 224, 1270–1279.
- Depeyre, C., Mancel, E., Besson-Leaud, L. & Goursaud, R. (2005). Abrupt visual loss in children. Three case studies of ocular bartonellosis. *J Fr Ophthalmol* 28, 968–975.
- Dillon, B., Valenzuela, J., Don, R., Blanckenberg, D., Wigney, D. I., Malik, R., Morris, A. J., Robson, J. M. & Iredell, J. (2002). Limited diversity among human isolates of *Bartonella henselae*. *J Clin Microbiol* 40, 4691–4699.
- Drancourt, M., Birtles, R., Chaumentin, G., Vandenesch, F., Etienne, J. & Raoult, D. (1996). New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. *Lancet* 347, 441–443.
- Farlow, J., Postic, D., Smith, K. L., Jay, Z., Baranton, G. & Keim, P. (2002). Strain typing of *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia garinii* by using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol* 40, 4612–4618.
- Felsenstein, J. (1989). PHYLIP – phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5, 164–166.
- Gurfield, A. N., Boulouis, H. J., Chomel, B. B., Kasten, R. W., Heller, R., Bouillin, C., Gandoin, C., Thibault, D., Chang, C. C. & other authors (2001). Epidemiology of *Bartonella* infection in domestic cats in France. *Vet Microbiol* 21, 185–198.
- Haddad, N., Ostyn, A., Karoui, C., Masselot, M., Thorel, M. F., Hughes, S. L., Inwald, J., Hewinson, R. G. & Durand, B. (2001). Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J Clin Microbiol* 39, 3623–3632.
- Handley, S. A. & Regnery, R. L. (2000). Differentiation of pathogenic *Bartonella* species by infrequent restriction site PCR. *J Clin Microbiol* 38, 3010–3015.
- 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.
- Iredell, J., Blanckenberg, D., Arvand, M., Grauling, S., Feil, E. J. & Birtles, R. J. (2003). Characterization of the natural population of *Bartonella henselae* by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 41, 5071–5079.
- Jackson, L. A., Perkins, B. A. & Wenger, J. D. (1993). Cat scratch disease in the United States: an analysis of three national databases. *Am J Public Health* 83, 1707–1711.
- Johansson, A., Farlow, J., Larsson, P., Dukerich, M., Chambers, E., Bystrom, M., Fox, J., Chu, M., Forsman, M. & other authors (2004). Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J Bacteriol* 186, 5808–5818.
- Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J. & Hugh-Jones, M. E. (2000). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 182, 2928–2936.
- Kitchell, B. E., Fan, T. M., Kordick, D., Breitschwerdt, E. B., Wollenberg, G. & Lichtensteiger, C. A. (2000). Peliosis hepatis in a dog infected with *Bartonella henselae*. *J Am Vet Med Assoc* 216, 519–523.
- Koehler, J. E. (1995). *Bartonella*-associated infections in HIV-infected patients. *AIDS Clin Care* 7, 97–102.
- Koehler, J. E., Sanchez, M. A., Garrido, C. S., Whitfield, M. J., Chen, F. M., Berger, T. G., Rodriguez-Barradas, M. C., LeBoit, P. E. & Tappero, J. W. (1997). Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N Engl J Med* 337, 1876–1883.
- La Scola, B., Liang, Z., Zeaiter, Z., Houpiqian, P., Grimont, P. A. & Raoult, D. (2002). Genotypic characteristics of two serotypes of *Bartonella henselae*. *J Clin Microbiol* 40, 2002–2008.
- Le Flèche, P., Hauck, Y., Onteniente, L., Prieur, A., Denoed, F., Ramière, V., Sylvestre, P., Benson, G., Ramière, F. & Vergnaud, G. (2001). A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol* 1, 2–15.
- Li, W., Chomel, B. B., Maruyama, S., Guptill, L., Sander, A., Raoult, D. & Fournier, P. E. (2006). Multispacer typing to study the genotypic distribution of *Bartonella henselae* populations. *J Clin Microbiol* 44, 2499–2506.
- Lindstedt, B. A. (2005). Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 26, 2567–2582.
- Majed, Z., Bellenger, E., Postic, D., Pourcel, C., Baranton, G. & Picardeau, M. (2005). Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto*. *J Clin Microbiol* 43, 539–545.
- Maruyama, S., Nakamura, Y., Kabeya, H., Tanaka, S., Sakai, T. & Katsube, Y. (2000). Prevalence of *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* and the 16S rRNA gene types of *Bartonella henselae* among pet cats in Japan. *J Vet Med Sci* 62, 273–279.
- Maruyama, S., Kasten, R. W., Boulouis, H. J., Gurfield, N. A., Katsube, Y. & Chomel, B. B. (2001). Genomic diversity of *Bartonella henselae* isolates from domestic cats from Japan, the USA and France by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol* 79, 337–349.
- Matar, G. M., Swaminathan, B., Hunter, S. B., Slater, L. N. & Welch, D. F. (1993). Polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis of a fragment of the ribosomal operon from *Rochalimaea* species for subtyping. *J Clin Microbiol* 31, 1730–1734.
- Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A. L., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B., Tibayrenc, M., Loch, C. & Supply, P. (2001). High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global

M. Monteil and others

analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1901–1906.

Pesavento, P. A., Chomel, B. B., Kasten, R. W., McDonald, K. A. & Mohr, F. C. (2005). Pathology of *Bartonella endocarditis* in six dogs. *Vet Pathol* 42, 370–373.

Pourcel, C., Vidgop, Y., Ramisse, F., Vergnaud, G. & Tram, C. (2003). Characterization of a tandem repeat polymorphism in *Legionella pneumophila* and its use for genotyping. *J Clin Microbiol* 41, 1819–1826.

Rodriguez-Barradas, M. C., Hamill, R. J., Houston, E. D., Georghiou, P. R., Clarridge, J. E., Regnery, R. L. & Koehler, J. E. (1995). Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. *J Clin Microbiol* 33, 1089–1093.

Sander, A., Ruess, M., Bereswill, M. S., Schuppler, M. & Steinbrueckner, B. (1998). Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. *J Clin Microbiol* 36, 2973–2981.

Skuce, R. A., McCorry, T. P., McCarroll, J. F., Roring, S. M., Scott, A. N., Brittain, D., Hughes, S. L., Hewinson, R. G. & Neill, S. D.

(2002). Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* 148, 519–528.

Slack, A. T., Dohnt, M. F., Symonds, M. L. & Smythe, L. D. (2005). Development of a multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 30, 1–10.

Struelens, M. J. (1996). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* 2, 2–11.

Vergnaud, G. & Denoeud, F. (2000). Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Res* 10, 899–907.

Yamamoto, K., Chomel, B. B., Kasten, R. W., Hew, C. M., Weber, D. K. & Lee, W. I. (2002). Experimental infection of specific pathogen free (SPF) cats with two different strains of *Bartonella henselae* type I: a comparative study. *Vet Res* 3, 669–684.

Edited by: W. B. van Leeuwen

II. Etape II : Développement complémentaire :

Ce développement avait pour objectif d'étudier le polymorphisme des isolats et souches de *B. henselae* sur la base de séquences répétées réparties sur l'ensemble du génome. Pour atteindre cet objectif, nous avons modifié un certain nombre de critères de sélection en nous focalisant plus particulièrement sur la position des séquences sur le génome et sur la taille de l'unité de base.

A. Matériel biologique :

Cette étape du développement a été réalisée sur 7 souches/isolats choisis selon leur disponibilité, dont une souche humaine (Houston I) (génotype I) et 6 isolats/souches félines (génotype II) issus de 3 origines géographiques différentes (France, Danemark et USA) (**Tableau 4**). Surtout, ces isolats/souches ont été choisis parce que leurs profils MLVA obtenus avec les 5 VNTR déjà sélectionnés étaient très différents, et avaient permis de les classer dans les différents groupes et sous-groupes déjà identifiés (**cf. chapitre III**).

Nom de souche	Origine géographique	Génotype	Espèce hôte
H1	USA	I	Humain
F1	USA	I	Chat
108	France	II	Chat
112	France	II	Chat
234	Danemark	II	Chat
241	Danemark	II	Chat
252	Danemark	II	Chat

Tableau 4 : Liste des isolats et/ou souches utilisés lors du développement complémentaire

B. Méthodes :

B.1. Changement de critères de sélection :

Nous avons choisi une taille d'U.B comprise entre **9** et 300 nucléotides au lieu de **30** à 300 nucléotides lors du développement initial. Ce choix a donné lieu à 722 séquences réparties sur tout le génome. Le choix de la taille d'U.B. (9 pb) a été rendu possible par l'acquisition, d'une part d'une nouvelle cuve

d'électrophorèse (Modèle :SGU-2640T-02, C.B.S. SCIENTIFIC COMPANY, INC) dont les dimensions du gel sont de 26cm X 40 cm, permettant de bien séparer les bandes ayant de hauts poids moléculaires, et d'autre part d'un générateur électrique caractérisé par un voltage très puissant (500-600 V ; 20 W ; 90 mA et 55°C à la température ambiante) qui permet de différencier les bandes ayant des tailles très proches en réduisant le temps de migration (4 à 5 heures au lieu de 34 heures, durée nécessaire lors du développement initial pour certaines séquences).

34 nouvelles séquences (vertes) ont été présélectionnées. Sur la **figure 6** est présentée la localisation de l'ensemble des séquences retenues lors des développements initial (en rouge) et complémentaire (en vert).

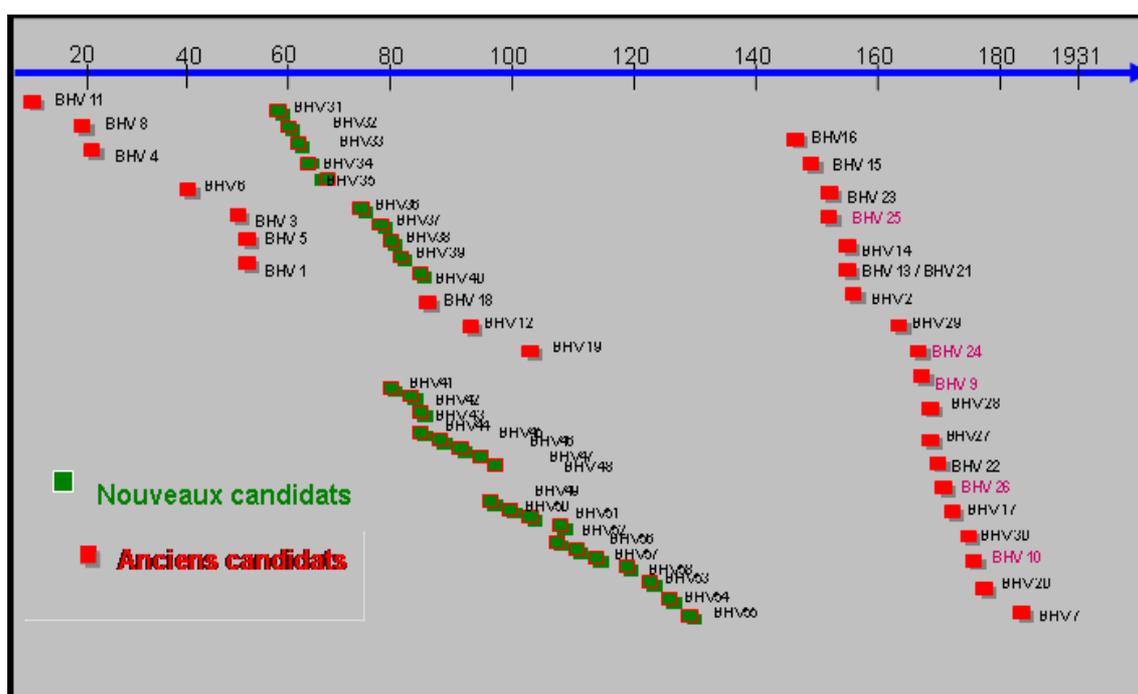


Figure 6 : Localisation des séquences retenues lors des développements initial (en rouge) et complémentaire (en vert).

B.2. Sélection des amorces et du programme PCR :

La recherche des couples d'amorces a été faite à la main selon les critères cités précédemment. Ces couples d'amorces ont été vérifiés par le logiciel OPERON (<http://www.operon.com>) qui permet de détecter les boucles pouvant se former entre elles et empêcher l'amplification des séquences.

Au cours de ce développement, nous avons redessiné des nouvelles amorces pour certaines séquences déjà sélectionnées lors du développement initial dans le but de standardiser le programme de PCR (**Tableau 5**).

Nom VNTR	Taille de VNTR (pb)	NB de copies	Séquences des amorces	T°C d'hybridation	Taille du produit (pb)
BHV 31	9	3.2	F : ATTGTCAGATACAGTCCG R : GCTCCATACGAA GTAAGC	58°C/57.62°C	182.8
BHV 32	13	2	F : CTTTGTCTGTGCCTTCTG R : GTCTTGCTA CTATCCAA CA C	58°C/58.35°C	372
BHV33	18	2.1	F : GGTATCGTTA TCTGCTGG R : GCACATACCA CCA TCAT	58.35°C/57.62°C	339.8
BHV34	19	2	F : GATGCTTACCTGTTA TCG R : GGGAA CCGTA CTACCG	58.35°C/59.26°C	295
295BHV 35	14	2	F : CGTATCTCTA CA CCAA TGTTG R : CTAA AGTCGTA ACCTCCTG	58.66°C/58°C	265
BHV 36	9	3.1	F : TCAA ACA GCGTTCACAA GC R : CGTCTAAA AA CA GGGCA G	58°C/57.62°C	151.9
BHV 37	15	2	F : CCATTGTCTTA CCA TTAC R : CCATTTCTTA CCCTGACG	58,3°C/58°C	155
BHV 38	22	2.1	F : GATGTAGAGGAGCAA AA TCC R : ATAA AGGTGCGGGAA TA GG	58.35°C/58°C	202.2
BHV 39	15	2.1	F : GCAATAAA AGCACCTCCTG R : GAAA CTCTCGCTGA AAATGG	58°C/58.3°C	283.5
BHV 40	17	2.2	F : CTCTGCGTCAA TAATAA CCC R : AAATACCTCATTCATAAAGTGCTGT	58.3°C/58°C	238.4
BHV 41	65	2	F : GTGGTTTA TCAA TA CGCC R : CGGTAAGTGCCTTCA TTTG	58°C/58°C	235
BHV 42	12	2.3	F : CCCATCACTA CAAA CTCATC R : GGGAACTA TTACATTTTCATACT	58.6°C/58°C	184.6
BHV 43	15	2.3	F : CTACAGTGGAAA TCTAATCGG R : GGTCAATAATGCGTTGCACT	58.6°C/58°C	304.5
BHV 44	10	2.9	F : ATCTTGGCTATTT CCTGTTTTG R : TTCTCTGCCCTCTCC	57.42°C/58.45°C	466
BHV 45	21	2	F : GTAACGCAA CCTTTA GTGG R : CATTCACCGATACACAA GAG	58°C/58.66°C	305
BHV 46	21	2	F : TTTCTT TAGTAAGTCTTCA CCA G R : GTCCAA CCGATTTTCAA CG	58°C/58°C	315
BHV 47	9	3.2	F : ATGTTGGTGGGGGAAA G R : GCGTATCACTGA GAAATGC	57.62°C/58°C	225.8
BHV 48	12	3.5	F : A GAGAA AGCAGA GAGA GTG R : TCACAGACTA GCA GC	58°C/57.2°C	320
BHV 49	9	2.9	F : CAACACTCGCCGTA TCTAA R : AGGGGAATGA GCA CCTATT	58°C/58.35°C	168.1
BHV 50	21	2.1	F : ATAAGCCCCCGTTCTTCTT R : CAAGGTGCTCAA GCGA G	58°C/59.6	339.1
BHV 51	13	2	F : CAAAAGCGTGAGGCAATA AA C R : A ACATCCAAGCCCAA GG	58.66°C/57.19°C	289
BHV 52	13	2	F : GCTGTCTTAGCA GGA CTAT R : CTTTCTTTTGTGGGTA TCG	58°C/ 58.6°C	378
BHV 53	12	2.4	F : TCTGGGCTTGCTTCACC R : GCCGAGTAA CATCATCA C	59,6°C/57,6°C	22.8
BHV 54	18	2.1	F : A CCGCAA ACTA AA GCGTTG R : GTAAGGCA CAAGCATATGG	58°C/58°C	250.8
BHV 55	11	2.7	F : AGCAGCCATAGCCA TTTCT R : CTTCCGCAAGA GCCATTT	58°C/ 57.62°C	210.7
BHV 56	15	2.4	F : GAA GTTCCGTATGAA GTCC R : GAGGATTTGATGTGTAGGG	58°C/58°C	290
BHV 57	15	2	F : AA GAGA A CCA CA CCTGC R : GTTGGTCTGTTATGCTTG	57,7°C/58°C	228
BHV 58	9	2.6	F : CA GAACGAA GACGAA TA ACTA C R : GTGCTGCGAA TGTTGC	58.9/ 59.6	191.4

Tableau 5 : Caractéristiques des nouvelles séquences ainsi que des amorces correspondante

Toutes les nouvelles séquences sélectionnées, selon les nouveaux critères, ainsi que les anciennes antérieurement retenues et dont pour certaines les amorces correspondantes ont été remaniées, ont été amplifiées en introduisant les modifications suivantes dans le programme PCR déjà décrit : température

unique d'hybridation de 53°C pour tous les BHV et durée de la phase d'extension au cours des cycles portée à 1 minute, toujours à 72°C.

C. Résultats :

Sur les 34 séquences nouvellement testées sur les sept souches/isolats, 32 séquences répétées se sont avérées monomorphes (1 seul allèle) alors que deux seulement, BHV-11 et BHV-38 apparaissaient dimorphes (présence de 2 allèles). Elles n'ont pas été retenues pour les raisons suivantes :

- leur inclusion ne permet pas d'augmenter le pouvoir discriminant ni de changer la distribution des groupes (données non montrées) tout en imposant de tester 2 nouveaux VNTR/isolat ou souche ;

- pour BHV-38, sa petite taille nous a contraints au séquençage dans certains cas, malgré l'acquisition de matériel plus performant. Ceci nous a conduits à découvrir que ce VNTR avait été dupliqué et que dans certains cas la variabilité entre isolats/souches était liée, non pas à des répétitions en tandem, mais à des répétitions dispersées sur le génome et pouvait conduire à un polymorphisme.

D. Discussion et conclusion:

Le développement complémentaire nous a permis d'améliorer et de standardiser la technique en la rendant plus simple et plus facile par l'utilisation d'une seule température d'hybridation pour toutes les séquences de BHV sélectionnés. En termes de polymorphisme, nous n'avons pas réussi à trouver de nouvelles séquences apportant un bénéfice supplémentaire, même en essayant de modifier nos critères de sélection (taille d'U.B et position dans le génome). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que d'une part les séquences répétées chez *B. henselae* ne sont pas très abondantes par rapport à d'autres α -protéobactéries, et d'autre part parce que la zone terminale du génome dans laquelle sont localisés les 5 BHV antérieurement sélectionnés pourrait être dotée d'une plus grande plasticité que le reste du génome.

E. Bilan et conclusion sur la mise au point de la technique MLVA :

Le développement de la technique (développement initial + développement complémentaire) a permis de mettre en place une technique de typage moléculaire (MLVA) très simple et très facile à transférer dans d'autres laboratoires. La technique est basée sur une réaction de PCR qui nous a permis d'amplifier des séquences candidates (VNTR) en présence de la Taq polymérase Pfx *Platinum* (Invitrogen) et des amorces sélectionnées pour amplifier les différents VNTR à la même température. A partir des 60 BHV sélectionnés, nous en avons retenu 13 (11+ 2) sur la base de leur dimorphisme ou polymorphisme, observés pour les 6 souches/ isolats testés dans nos essais préliminaires. Parmi ces 11 séquences retenues, 5 sont polymorphes et 6 sont dimorphes.

Les 5 BHV polymorphes ont été utilisés en première intention dans la suite de l'étude et ont servi pour les études épidémiologiques que nous avons réalisées chez *B. henselae*.

CHAPITRE II : COMPARAISON DE LA TECHNIQUE MLVA vs ECP, MLST et MST

Après avoir montré l'efficacité de l'outil MLVA pour le typage moléculaire de *B.henselae*, nous avons voulu d'une part, comparer les performances de cette technique (nombre total de profils obtenus, nombre de profils uniques rencontrés et valeur de l'index de diversité) par rapport aux autres techniques déjà développées pour le typage de cet organisme et les plus utilisées actuellement, soit les techniques ECP, MLST et MST, et d'autre part, valider (ou non) les groupes et sous-groupes obtenus par MLVA par rapport à ceux obtenus par les autres techniques déjà citées. La validation des groupes MLVA par les autres techniques et notamment par la technique MLST nous a ensuite permis de conforter certaines hypothèses d'ordre phylogénétique.

Dans la première partie de l'étude, nous nous sommes basés sur 5 sources bibliographiques disponibles relatives au typage de *B. henselae* par ECP, MLST et/ ou MST (Chang *et al.*, 2002; Arvand *et al.*, 2001; Iredell *et al.*, 2003; Maryuama *et al.*, 2001 et Li *et al.*, 2006) en incluant des isolats communs par rapport à ceux que nous avons nous-mêmes typés par la technique MLVA.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons choisi des isolats en fonction de leur appartenance aux différents groupes et sous-groupes établis par le dendrogramme afin de les typer, par la technique MLST selon le protocole élaboré par Iredell *et al.* en 2003 avec pour objectif de vérifier la validité des groupes MLVA à l'aide de la technique MLST, qui est considérée comme la technique de référence pour les études phylogénétiques.

I. Comparaison des performances de MLVA vs ECP, MLST et MST

A. Matériel Biologique :

A.1. Isolats de *B. henselae* ayant servi à la comparaison des performances de la technique MLVA versus celles des autres techniques :

Pour comparer les performances de la technique MLVA par rapport aux autres techniques, nous avons cherché dans la littérature si parmi les souches communes testées par MLVA certaines avaient précédemment déjà été typées par ECP, MLST et/ou MST. Ces isolats communs ont servi également à valider les groupes obtenus par ces techniques de typage (**Tableau 1**).

Les caractéristiques de ces souches sont détaillées dans le tableau 1.

Nombre d'isolats communs	Origine géographique	Génotype 16S DNA		Technique de typage	Références
		I	II		
22	- Allemagne (21) - USA (1)	3	19	ECP	Arvand <i>et al.</i> , 2001
17	- USA (17)	2	15	ECP	Chang <i>et al.</i> , 2002
20	- Australie (20) - Allemagne (1) - USA (1)	13	7	ECP	Iredell <i>et al.</i> , 2003
5	-USA (4) -Japon (1)	3	2	ECP	Maruyama <i>et al.</i> , 2001
22	- Australie (20) - Allemagne (1) - USA (1)	14	8	MLST	Iredell <i>et al.</i> , 2003
17	- USA (10) -Philippines (7)	13	4	MST	Li <i>et al.</i> , 2006
11	- Pologne	1	10	ECP	Podsiadly : communication personnelle

Tableau 1 : caractéristiques de souches communes à comparer avec la technique MLVA

A.2. Isolats de *B. henselae* ayant servi à la validation des groupes MLVA à l'aide de la technique MLST :

Afin de pouvoir valider les groupes et les sous-groupes MLVA identifiés dans le dendrogramme à l'aide de la technique MLST, nous avons sélectionné 14 isolats et souches à partir du dendrogramme (cf article N°2 : Bouchouicha *et al.*, 2009). Le choix des isolats n'était pas arbitraire : en effet, nous avons voulu, d'une part, que les souches soient assez nombreuses pour consolider cette validation des groupes et d'autre part, qu'elles soient réparties sur l'ensemble du dendrogramme et appartiennent de ce fait aux différents groupes et sous-groupes. Cependant, pour les souches Ba, nous avons été limités par la disponibilité en ADN (**Tableau 2**).

Isolats	Génotype 16S DNA	Origine géographique	Hôte	Profils MLVA					Groupe MLVA
				A	B	C	D	E	
256	II	Danemark	Chat	9	6	2	2	1	A
733	II	Danemark	Chat	9	6	3	1	1	A
G472	II	Angleterre	Chat	9	11	2	1	1	A
G628	II	Angleterre	Chat	9	15	6	1	1	A
233	II	Danemark	Chat	10	15	2	1	1	A
BK123	II	Allemagne	Chat	10	15	10	1	2	A
1 59	I	France	Chat	15	20	6	8	2	Ba
NC55	I	Caroline du Nord	Chat	13	20	7	8	2	Ba
BK153	II	Allemagne	Chat	10	23	10	8	4	Bb
97	II	France	Chat	13	14	6	5	4	Bb
76	I	France	Chat	13	31	6	5	5	Bb
257	II	Danemark	Chat	14	6	5	8	4	Bb
255	II	Danemark	Chat	14	33	2	7	4	Bb
F1	I	USA	Chat	14	15	10	9	4	Bb

Tableau 2 : Caractéristiques des souches et isolats à comparer avec MLST.

B. Méthodes :

B.1. Choix des gènes cibles et amplification des loci ciblés:

Plusieurs schémas de MLST ont été décrits chez *B. henselae* par différents auteurs (Arvand *et al.*, 2007 ; Iredell *et al.*, 2003, Lindroos *et al.*, 2006).

Ces schémas sont basés sur 7 à 9 gènes dont la majorité sont des gènes de ménage (*rib C*, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *rpoB*, *npfD*, *eno*, 16S RNA et *batR*), et dont les fonctions sont indiquées dans le tableau 3.

Pour amplifier les fragments de gènes sélectionnés, nous avons utilisé, dans notre étude, les amorces dessinées par les concepteurs de la technique pour *B.henselae*, Iredell (2003 *et al*), et qui ont servi à l'établissement du premier schéma MLST chez *B. henselae*. Les caractéristiques de ces gènes ainsi que celles des amorces correspondantes sont résumées dans le **tableau 3**. Nous

avons également adopté le même programme PCR que celui développé par ces auteurs (Iredell *et al.*, 2003), Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume de 25 μ l.

Le programme d'amplification comporte 35 cycles dont les différentes étapes sont les suivantes :

Dénaturation initiale: 95°C pendant 5 min

Dénaturation: 95°C pendant 1min

Hybridation : 55°C pendant 1min

Elongation: 72°C pendant 50 s

Elongation finale: 72°C pendant 10 min

} \Rightarrow **35 cycles**

B.2. Séquençage:

Les amplicons obtenus après amplification de ces gènes ont ensuite été séquencés dans le deux sens par le service QIAGEN. Les résultats adressés par QIAGEN sont présentés sous forme d'un chromatogramme des acides nucléiques et d'un fichier texte de la séquence du fragment de gène.

B.3. Analyse bioinformatique des séquences:

Les séquences sens et anti-sens ainsi obtenues, sont d'abord corrigées manuellement puis alignées à l'aide d'un logiciel permettant les alignements multiples tels que Clustal W (<http://align.genome.jp/>) Pour chaque locus, des numéros sont attribués aux nouveaux allèles selon l'ordre dans lequel ils sont localisés sur le fragment de gène. La combinaison de ces allèles permet de définir le profil de chaque souche connu sous le nom de « Sequence Type » (ST). Ces allèles résultent de mutations ponctuelles localisées dans des zones de polymorphisme qui sont ensuite répertoriées dans une base de données en fonction de leur localisation sur le gène étudié. **Le tableau 3** présente les sites de mutation des différents allèles rencontrés ainsi que leur positionnement sur les séquences des gènes concernés.

Locus	Fonction du gène	Nombre des allèles	Site de polymorphisme	Références
<i>Bat R</i>	Régulateur à deux composants	4	A2 : T302C A3 : C65T, C68A, A218G, T302C A4 : C65T, A218G, T302C	Iredell <i>et al.</i> , 2003
<i>ftsZ</i>	Code pour une protéine de division cellulaire	4	A2 : A1185T, G1404A, G1467T A3 : A1185T, G1467T, C1537T	Iredell <i>et al.</i> , 2003, Arvand <i>et al.</i> , 2007
<i>gltA</i>	code pour pour la citrate synthase	2	A2 : G648A, C1026T	Iredell <i>et al.</i> , 2003
<i>groEL</i>	Code pour la protéine de choc thermique	2	A2 : G1343A	Iredell <i>et al.</i> , 2003
<i>npiD</i>	Code pour une glycoprotéine de surface	2	A2 : G1453A	Iredell <i>et al.</i> , 2003
<i>rhoB</i>	Code pour la sous unité β de l'ARN polymérase	4	A2 : G1779A A3 : C1733T, G1779A A4 : G711758A	Lindroos <i>et al.</i> , 2006 Arvand <i>et al.</i> , 2007
<i>ribC</i>	Code pour la riboflavine synthase	2	A2 : A1310G, G1360, A1494G, G1499A	Iredell <i>et al.</i> , 2003

Tableau 3: Caractéristiques des sites de polymorphisme des gènes de *B. henselae* utilisés dans la technique MLST.

C. Résultats :

Pour évaluer les performances de la technique MLVA par rapport à celles des principales autres techniques de typage moléculaire de *B. henselae*, nous avons comparé leur pouvoir discriminant (notamment le nombre de profils trouvés, la valeur de l'index de diversité (I.D), la capacité à différencier des isolats supposés identiques avec d'autres techniques), leur praticabilité, leur rapidité d'exécution et leur coût.

Pour une comparaison efficace, nous avons essayé d'estimer les performances de la technique MLVA par rapport à chacune des autres techniques prise individuellement.

C.1. Comparaison MLVA- ECP :

Le typage des isolats par la technique d'ECP a fait l'objet de plusieurs études (Maruyama *et al.*, 2001, Sander *et al.*, 1998, Chang *et al.*, 2002, Arvand *et al.*, 2001, Iredell *et al.*, 2003 et Podsiadly communication personnelle). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux cinq principales d'entre elles.

➤ **1^{ère} étude :**

Elle avait en commun avec notre étude 22 isolats, tous issus d'Allemagne, à l'exception de la souche de référence d'origine américaine (Houston-1).

90% (20/22) des ces isolats sont d'origine féline (19 provenant de chats errants et un issu d'un chat dont le propriétaire souffrait de la maladie des griffes du chat) et de génotype II ; les 10% restants (2/22) sont d'origine humaine et de génotype I et ont été isolés à partir de 2 patients immunodéprimés (Houston I et Berlin 1).

Onze profils MLVA différents ont été observés sur les 22 isolats testés. Parmi ces profils, huit sont représentés par un seul isolat. A l'opposé, le profil (10-14-2-2-1) est rencontré chez 41% des isolats testés (9/22). Quant aux profils « 10-15-2-1-1 » et « 14-20-10-7-5 », ils sont trouvés respectivement chez trois et deux isolats. Le dernier regroupe la souche de référence Houston I et la souche Berlin 1.

L'analyse du gel d'ECP présenté dans l'article d'Arvand *et al.* (2001) nous a permis de noter que des profils ne se distinguant que par une seule bande ont été classés comme différents par les auteurs de l'article. C'est le cas de C1-C2-C3-C4, E1-E2, D1-D2, ces ensembles étant trouvés identiques ou très proches en MLVA. En tenant compte des critères de Tenover *et al.* (1995), on aboutit à 8 profils ECP au lieu de 14. L'I.D des isolats typés par MLVA est de 0.83 alors que celui des isolats typés par ECP est égal à 0.75. Dans la plupart de cas, les isolats possédant le même profil ECP peuvent être distingués par MLVA. Par exemple, les isolats des groupes F (BK123 et BK186), G (BK172 et BK193), D1 (BK108 et BK116) et C1 (BK56, BK111, BK132 et BK182) diffèrent par au moins un BHV. En revanche, pour la souche H1 et l'isolat Berlin 1, l'identité observée en ECP est validée en MLVA (**Tableau 4**).

Souche	Génotype	Origine	Hôte.	ECP	BHV-A	BHV-B	BHV-C	BHV-D	BHV-E
H759	I	USA	H	B	14	20	10	7	5
B1	I	Allemagne	H		14	20	10	7	5
BK56	II	Allemagne	CT	C1	10	14	2	2	1
BK111	II	Allemagne	CT		10	14	2	2	1
BK132	II	Allemagne	CT		10	14	2	2	1
BK182	II	Allemagne	CT		10	15	3	2	1
BK135	II	Allemagne	CT	C2	10	14	2	2	1
BK181	II	Allemagne	CT		10	14	2	2	1
BK169	II	Allemagne	CT	C3	10	14	2	2	1
BK118	II	Allemagne	CT	C4	10	14	2	2	1
BK156	II	Allemagne	CT	E1	10	14	2	2	1
BK161	II	Allemagne	CT	E2	10	14	2	2	1
B2	II	Allemagne	CT	C5	10	14	2	2	4
BK108	II	Allemagne	CT	D1	10	15	2	1	1
BK116	II	Allemagne	CT		10	15	2	1	1
BK158	II	Allemagne	CT	D2	10	15	2	1	1
BK172	II	Allemagne	CT	G	10	15	3	1	1
BK193	II	Allemagne	CT		10	15	2	2	1
BK123	II	Allemagne	CT	F	10	15	10	1	2
BK186	II	Allemagne	CT		10	15	2	1	2
BK143	II	USA	H	H	14	25	6	7	4
BK153	II	USA	I	I	10	23,5	10	8	4

Tableau 4: Comparaison des profils MLVA-ECP (Arvand *et al.*, 2001)

➤ **2^{ème} étude :**

La deuxième étude basée sur la technique d'ECP a été menée sur 20 isolats dont 18 d'origine australienne, la souche de référence (Houston I) d'origine américaine et la souche d'origine allemande (Berlin 2) (Iredell *et al.*, 2003).

65% de ces isolats sont d'origine humaine et la presque totalité d'entre eux (11/13) sont de génotype I.

Sur les 20 isolats testés, nous avons détecté 11 différents profils avec la technique MLVA avec un I.D de 0.66 alors que le typage par ECP a permis de révéler 6 profils avec un I.D de 0.64. Neuf profils uniques ont été observés avec la technique MLVA, alors que l'ECP n'a permis de différencier que 2 profils uniques (ceux de JR2 et Berlin 2).

Le cluster des JR (1, 3, 5, 6, 7, 8 et 9) a été validé par les deux techniques. Les isolats appartenant aux profils 1 et 2 sont tous différenciés par la technique MLVA (Tableau 5).

Souche	Génotype	Origine	Esp.	ECP	BHV-A	BHV-B	BHV-C	BHV-D	BHV-E
H1	I	USA	H		14	20	10	7	5
BH3	I	Australie	H	1	14	20	10	7	1
RMC10	I	Australie	CT		13	20	10	7	5
NU4695	I	Australie	CT	2	13	20	10	8	2
RMC3	I	Australie	CT		15	32	10	8	5
JR1	I	Australie	H		14	22	10	5	3
JR3	I	Australie	H		14	22	10	5	3
JR5	I	Australie	H		14	22	10	5	3
JR6	I	Australie	H		14	22	10	5	3
JR7	I	Australie	H		14	22	10	5	3
JR8	I	Australie	H		14	22	10	5	3
JR9	I	Australie	H	3	14	22	10	5	3
JR2	I	Australie	H	1	15,5	22	10	8	2
RMC1	II	Australie	CT		14	26	6	8	4
RMC8	II	Australie	CT	5	14	26	6	8	4
RMC12	II	Australie	CT		14	26	3	8	4
NU4714	II	Australie	CT		14	26	8	7	5
R987	II	Australie	H	4	14	32	8	7	1
R1073	II	Australie	H		14	32	8	7	1
Berlin 2	II	Allemagne	CT	7	10	14	2	2	4

Tableau 5: Comparaison des profils MLVA-ECP (Iredeel *et al.*, 2003)

➤ **3^{ème} étude :**

La troisième étude, celle de Chang *et al.* (2002), nous a permis de comparer les résultats obtenus en ECP et en MLVA pour 17 isolats communs d'origine américaine correspondant aux 4 paires d'isolats provenant de propriétaires et leur chat (K 33, K38) ; (K40, K42) ; (K50, K51) ; (K53, Zeus) et au groupe formé par les isolats issus d'un patient (K52) et de ses sept chats (BW, Flu, Kimmy, Gorda, Sacha, Raccouni et Flaca) qui ont servi à l'étude de traçabilité (cf. chapitre 3, Etude de traçabilité, page 151). La souche de référence Houston I était incluse dans l'étude.

L'analyse du profil de ces isolats en ECP montre que l'ensemble constitué par le patient K52 et ses chats forme un cluster faisant apparaître 2 groupes de chats ayant deux profils très proches, et qui sont séparés par celui de leur propriétaire. Le premier groupe de chats (Flu, BW et Kimmy) présentait une bande de différence par rapport au patient (K52) alors que les isolats des quatre chats du deuxième groupe présentaient 2 à 3 différences par rapport à l'isolat du patient. Les membres de la paire (K40, K42) se différenciaient également par 3 différences. Au sein des deux autres paires, les isolats présentaient les mêmes profils. En suivant les recommandations de Tenover *et*

al., (1995) pour l'interprétation d'un profil ECP, le nombre total de profil obtenus est de 7. Comme cela a déjà été montré dans l'étude de traçabilité, les isolats des propriétaires et de leur(s) chat(s) présentaient le même profil MLVA, ce qui réduit à 5 le nombre total de profils obtenu par cette technique (compte non tenu de celui de la souche de référence). Nous avons pu calculer l'ID correspondant pour chaque technique (ID MLVA = 0.70 et ID ECP = 0.86) (Tableau 6).

Souche	Génotype	Origine	Hôte	Profil ECP	BHV-A	BHV-B	BHV-C	BHV-D	BHV-E
759	I	USA	H	1	14	20	10	7	5
K33	I	USA	H	1	14	20	8	7	6
K50	II	USA	H	3	15.5	20	10	8	4
K51	II	USA	CT	3	15.5	20	10	8	4
K52	II	USA	H	4a	14	34	2	7	4
BW	II	USA	CT	4b	14	34	2	7	4
Flu (Fluffy)	II	USA	CT	4b	14	34	2	7	4
7C (Kimmy)	II	USA	CT	4b	14	34	2	7	4
7E (Gorda)	II	USA	CT	4c	14	34	2	7	4
7F (Sacha)	II	USA	CT	4c	14	34	2	7	4
7G (Raccouni)	II	USA	CT	4c	14	34	2	7	4
7A (Flaca)	II	USA	CT	4c	14	34	2	7	4
K40	II	USA	H	5a	14	32	8	7	4
K42	II	USA	CT	5b	14	32	8	7	4
K53	II	USA	H	5a	14	32	8	7	4
Zeus	II	USA	CT	5a	14	32	8	7	4
K38	II	USA	CT	2	14	32	2	7	4

Tableau 6: Comparaison des profils MLVA-ECP (Chang *et al.*,2002)

➤ **4^{ème} étude :**

Dans l'étude de Maruyama *et al.*, (2001) visant à étudier la diversité d'isolats de *B. henselae* issus de chats d'origine japonaise, américaine et française par la technique ECP, nous avons pu comparer les profils ECP des 5 isolats (4 d'origine américaine et un d'origine japonaise) communs avec ceux typés par la technique MLVA. Sur ces 5 isolats, 3 profils ECP différents avaient été obtenus, soit un ID de 0.7 (donné à titre indicatif seulement, dans la mesure où le nombre d'isolats et de profils est très faible). Avec la technique MLVA, nous arrivons à distinguer les 5 isolats entre eux, ce qui aboutit à un ID de 1 (Tableau 7).

Souche	Génotype	Origine	Hôte.	Profil ECP	BHV-A	BHV-B	BHV-C	BHV-D	BHV-E
759	I	USA	H	1	14	20	10	7	5
927	I	USA	CT	1	14	20	9	7	5
925	II	USA	CT	1	14	36	8	7	4
M17-1	I	JP	CT	3	15	21	4	9	2
U4	II	USA	CT	4	9	15	2	1	1

Tableau 7: Comparaison des profils MLVA-ECP (Maruyama et al., (2001))

➤ **5^{ème} étude :**

Cette étude a été réalisée en collaboration avec une équipe polonaise. Elle a porté sur 11 isolats félines (10 isolats de génotype II et 1 isolat de génotype I) issus de 2 différentes communes, situées dans la banlieue de Pologne. Selon les critères de Tenover, 6 profils ECP ont été identifiés (A, B, C, D, E et F) issus de la digestion du génome de ces 11 isolats bactériens avec uniquement *Sma*I. L'ID de ces isolats est égal à 0.85. Quant au typage par MLVA, il a révélé 10 profils, soit un ID de 0.98. Quatre à six allèles par locus ont été observés avec les cinq BHV testés. Les 3 types ECP B, D et E, représentés chacun par un seul isolat sont également trouvés distincts par la technique MLVA. Mais la technique MLVA apparaît plus discriminante, les isolats de types C (28 et 150) & F (13 et 163) présentant des profils MLVA différents. De même, les 4 isolats de type A qui diffèrent entre eux par 1 ou 2 bandes sont différenciés en trois profils en MLVA. Les données de typage moléculaire fournies par MLVA et ECP concordent avec les données épidémiologiques. En effet, les isolats 129 et 130, isolés de 2 chats provenant du même ménage, présentent les mêmes profils MLVA et ECP. Quant aux chats 3 et 150, qui ont été prélevés au moment où ils vivaient dans la même fourrière, leurs isolats présentent des profils différents, témoignant de sources de contamination indépendamment et sans doute antérieure à leur hébergement dans cette fourrière (**Tableau 8**).

Souche	Genotype	Origine	Profil ECP type (subtype)	BHV A	BHV B	BHVC	BHV D	BHV E
3	II	Warsaw	Type A (A1)	9.3	14.3	5	1.2	2.3
130	II	Józefów	Type A (A1)	9.3	14.8	18	1.2	1.3
129	II	Józefów	Type A (A1)	9.3	14.8	18	1.2	1.3
159	II	Warsaw	Type A (A2)	9.3	14.8	2	1.2	1.3
154	II	Otwock	Type B	11.8	14.8	2	2	3.5
28	II	Warsaw	Type C (C1)	9.8	13.8	2	2	1.3
150	II	Warsaw	Type C (C2)	9.3	14.8	2	2	1.3
12	II	Warsaw	Type D	10.8	19.8	10	1.2	2.3
30	II	Józefów	Type E	13.8	23.8	10	7	2.6
13	I	Warsaw	Type F (F1)	11.8	23.8	2	5.3	3.2
163	II	Warsaw	Type F (F2)	11.8	23.3	18	5.3	3.2

Tableau 8 : Comparaison MLVA-ECP (d'après Podsiadly : communication personnelle)

C.2. Comparaison MLVA- MLST:

Pour comparer les performances de la technique MLVA par rapport à celles de la technique MLST, nous nous sommes servis d'une part de l'étude réalisée par Iredell *et al* (2003), qui a fourni 22 isolats en commun et d'autre part de l'étude que nous avons nous-mêmes réalisée sur 14 isolats testés par les deux techniques.

Les isolats testés sont ceux qui ont servi pour la comparaison MLVA-ECP dans l'étude N°2 (page142).

Sur les 22 isolats, l'équipe de Iredell *et al.*, (2003) a identifié 6 profils "ST" répartis de la façon suivante: ST1 (59%,13 isolats) ; ST2 (4.%, 1 isolat) ; ST4 (13.61%, 3 isolats) ; ST5 (13.61%, 3 isolats); ST6 (4.5%, 1 isolat) ST 7 (4.5%, 1 isolat).

L'I.D. obtenu est de 0.61. Parmi les 22 isolats, 3 possédaient un profil unique (**Tableau 9**).

Souche	Hôte	ST	16s	batR	eno	gltA	ftsZ	groEL	nlpD	ribC	rpoB	BHV-A	BHV-B	BHV-C	BHV-D	BHV-E
H1	H	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	20	10	7	5
BH3	H		1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	20	10	7	1
RMC10	CT		1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	20	10	7	5
NU4695	CT		1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	20	10	8	2
RMC3	CT		1	1	1	1	1	1	1	1	1	15	32	10	8	5
BH5	H		1	1	1	1	1	1	1	1	1	15,5	20	12	8	4
JR1	H		1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	22	10	5	3
JR3	H		1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	22	10	5	3
JR5	H		1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	22	10	5	3
JR8	H		1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	22	10	5	3
JR7	H		1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	22	10	5	3
JR8	H		1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	22	10	5	3
JR9	H		1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	22	10	5	3
159	CT		1	1	1	1	1	1	1	1	1	15	20	6	8	2
JR2	H	2		1	1	1	1	2	1	1	1	15,5	22	10	8	2
NC55	CT		1	1	1	1	1	2	1	1	1	13	20	7	8	2
97	CT		2	1	1	1	1	2	1	1	1	13	14	6	5	4
BK153	CT		2	1	1	1	1	2	1	1	1	10	23	10	8	4
RMC1	CT	4		1	1	1	2	2	2	1	1	14	28	6	8	4
RMC8	CT											14	28	6	8	4
RMC12	CT			1	1	1	2	2	2	1	1	14	28	3	8	4
NU4714	CT	5	2	1	1	1	1	2	1	1	1	14	28	8	7	5
R987	H		2	1	1	1	1	2	1	1	1	14	32	8	7	1
R1073	H		2	1	1	1	1	2	1	1	1	14	32	8	7	1
76	CT		1	2	1	1	1	1	1	1	1	13	31	6	5	5
141	CT		2	2	1	1	1	2	1	1	1	14	5	6	5	4
HC71	CT	6	2	3	1	2	2	2	1	1	2	10	14,5	3	1	7
BK123	CT		2	3	1	1	2	2	1	1	2	10	15	10	1	2
233	CT		2	3	1	1	2	2	1	1	2	10	15	2	1	1
G628	CT		2	3	1	1	2	2	1	1	2	9	15	6	1	1
G472	CT		2	3	1	1	2	2	1	1	2	9	11	2	1	1
733	CT		2	3	1	1	2	2	1	1	1	9	6	3	1	1
R1073	H	7	2	4	1	2	3	1	2	2	1	10	14	2	2	4
B2	CT		2	4	1	2	3	1	2	2	1	10	14	2	2	4
256	CT		2	4	1	1	3	1	2	2	1	9	6	2	2	1

Tableau 9: Comparaison des profils MLVA-MLST (Iredell et al., 2003)

Pour les mêmes isolats testés, la technique MLVA a permis de différencier 14 profils dont 11 sont représentés par un seul isolat alors que les 3 autres sont communs à 2 isolats au moins. L'ID obtenu avec cette technique est de 0.90.

Pour consolider nos résultats, nous avons essayé d'augmenter le nombre d'isolats testés en commun avec le deux techniques. Pour cela, nous avons choisi 14 isolats déjà testés par MLVA et nous les avons typés par MLST selon le protocole établi par Iredell et al. (2003).

Sur le plan pratique, le séquençage de ces 14 isolats/souches a été fait dans le 2 sens afin d'éviter les erreurs de la polymérase lors du séquençage. Le coût du séquençage s'est élevé à 2500 euros pour les 14 isolats/souches.

Nous avons obtenu 14 profils MLVA, soit un ID de 1 et 7 profils MLST dont 3 sont partagés par au moins 2 isolats (ST1 (2 isolats), ST5 (3 isolats) et ST15 (5 isolats), l'I.D étant de 0.84.

Nous avons observé l'émergence de deux nouveaux profils MLST, que nous avons désignés ST15 et ST16. ST15 est proche de ST13 dont il diffère par des substitutions nucléotidiques dans les gènes *groEL* et *rpoB*, aboutissant à une nouvelle combinaison allélique pour ces deux gènes, alors que le profil ST16, proche de celui de ST7, s'en distingue par des substitutions nucléotidiques au niveau du gène *gltA* (allèle 1 au lieu de l'allèle 2) (**Tableau 10**).

Souche	Hôte	ST	16s	batR	gltA	ftsZ	groEL	nlpD	ribC	rpoB	BHV A	BHV B	BHV C	BHV D	BHV E
F1	CT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	15	10	9	4
159	CT		1	1	1	1	1	1	1	1	15	20	6	8	2
BK153	CT	5	2	1	1	1	2	1	1	1	10	23	10	8	4
97	CT		2	1	1	1	2	1	1	1	13	14	6	5	4
255	CT		2	1	1	1	1	1	1	1	14	33	2	7	4
256	CT	16	2	4	1	3	1	2	2	1	9	6	2	2	1
257	CT	4	2	2	1	1	2	1	1	1	14	6	5	8	4
733	CT	15	2	3	1	2	2	1	1	2	9	6	3	1	1
G472			2	3	1	2	2	1	1	2	9	11	2	1	1
BK 123	CT		2	3	1	2	2	1	1	2	10	15	10	1	2
G628	CT		2	3	1	2	2	1	1	2	9	15	6	1	1
233	CT		2	3	1	2	2	1	1	2	10	15	2	1	1
76	CT	8	1	2	1	1	1	1	1	1	13	31	6	5	5
NC55	CT	2	1	1	1	1	2	1	1	1	13	20	7	8	2

Tableau 10 : Comparaison MLVA-MLST

C.3. Comparaison MLVA- MST :

Contrairement aux autres techniques, le typage de *B. henselae* par MST, technique récente, n'a été réalisé pour le moment que par une seule équipe, celle de Li *et al* (2007), qui l'a mise au point, ce qui limite à 17 le nombre d'isolats en commun identifiables. Ces isolats sont tous issus de chats dont 59% vivaient aux USA (Californie) et 41% aux Philippines. 12 profils MST ont été identifiés qui se répartissent de la façon suivante : 9 profils MST uniques (10, 11, 14, 15, 19, 21, 35, 36 et 37) et 3 profils MST (5, 18 et 38) partagés par au moins 2 isolats. L'I.D calculé pour cette technique est de 0.94. Le nombre de profils identifiés par MLVA étant égal à 17 (1/isolat), ceci se traduit par un I.D de 1. Les isolats ayant des profils identiques en MST apparaissaient tous différents en MLVA, les profils MLVA étant cependant proches (1 ou 2 allèles de différence) (**Tableau 11**).

Souche	Géno- type	Origine	Hôte	Profil MST	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	BHV-A	BHV-B	BHV-C	BHV-D	BHV-E
199	I	USA		14	4	2	5	4	1	2	1	1	3	15	20	10	8	4
16	I	Ph.	CT	36	4	2	5	4	1	2	1	2	3	13	20	10	4	2
32	I	USA		19	4	1	5	4	1	2	1	1	3	15	20	10	8	3
S25	II	USA	CT	35	5	2	6	5	2	2	2	1	1	14	36	8	7	4
21	I	Ph.	CT	21	3	2	6	5	2	2	2	1	1	10	15	10	7	3
1	I	Ph.	CT	38	5	2	6	5	2	2	2	2	1	11	32	10	8	3
3	I	Ph.	CT	38	5	2	6	5	2	2	2	2	1	13	34	10	8	3
5	I	Ph.	CT	38	5	2	6	5	2	2	2	2	1	14	34	10	8	3
4	I	Ph.	CT	37	5	2	6	5	2	2	1	2	1	13	17	10	8	3
18	I	Ph.	CT	10	3	2	5	5	2	2	2	1	1	13	37	10	7	3
N5	I	USA	CT	15	4	5	5	4	1	2	1	1	3	13	20	10	7	5
518	I	USA	CT	5	5	1	1	1	2	2	2	1	1	13	32	8	7	4
272	I	USA	CT	5	5	1	1	1	2	2	2	1	1	14	32	10	7	4
232	I	USA	CT	5	5	1	1	1	2	2	2	1	1	14	32	8	7	4
105	II	USA	CT	18	3	1	6	3	5	4	4	3	2	9	14	2	1	1
180	II	USA	CT	18	3	1	6	3	5	4	4	3	2	9	15	2	1	3
46	II	USA	CT	11	3	3	6	3	5	4	4	1	2	9	15	2	1	4

Tableau 11: Comparaison de profils MLVA-MST (Li et al., (2006))

D. Discussion et conclusion :

La technique MLVA apparaît simple, conviviale, même si quelques échantillons échappent au typage pour certains VNTR, comme cela est le cas pour toutes les espèces bactériennes chez lesquelles cette technique a été développée. En confrontant nos résultats à ceux publiés pour les mêmes isolats et/ou souches par des équipes ayant utilisé d'autres techniques (ECP, MLST et MST), nous avons pu constater que la technique MLVA était plus performante pour la mise en évidence du polymorphisme, ainsi que l'ont montré le nombre de profils et les I.D obtenus.

La comparaison des performances de la technique MLVA et de celles de l'ECP a été difficile dans 2 études/5, celles de Arvand *et al.*, (2001) et de Chang *et al.*, (2002). En effet, cette technique expose à des problèmes de reproductibilité, ainsi que de lecture et d'interprétation des résultats. C'est une technique lourde qui nécessite des personnels qualifiés. Les résultats obtenus dépendent de plusieurs paramètres notamment la qualité de l'ADN. Ainsi, l'obtention d'un profil de macrorestriction d'un ADN génomique (fragments d'ADN de très grande taille générés par une endonucléase de restriction à faible fréquence de coupure) nécessite une procédure spécifique de purification de l'ADN : sa préparation se fait dans une matrice semi-solide d'agarose ("plug"), pour éviter les forces de cisaillement susceptibles d'endommager l'ADN puisque les procédures classiques favorisent les cassures aléatoires. La qualité de la

migration peut varier. En outre, et contrairement à la technique MLVA, la technique ECP n'est pas propice à la standardisation et à la numérisation, ce qui rend très difficile la comparaison des résultats entre les laboratoires, voire au sein d'un même laboratoire et peut conduire à générer des différences d'interprétation des résultats. C'est ainsi que, contrairement à la règle admise par la majorité des auteurs utilisant l'ECP comme technique de typage (Tenover *et al.*, 1995), dans l'étude d'Arvand *et al* (2001), tous les isolats d'origine allemande ayant un profil ECP différant par une seule bande (C1, C2, C3, C4, E1 et E2) ont été considérés par ces auteurs comme des isolats différents. L'identité de leur profil MLVA tend à accréditer le fait qu'une différence entre deux souches ne portant que sur une seule bande ne suffit pas pour conclure à leur identité. Dans leur étude menée sur des isolats issus de propriétaires et de leur chat et d'un groupe constitué d'un propriétaire et de ses sept chats (cf. tableau 6), Chang *et al.*, (2002) mettent en évidence d'une part la présence d'une bande de différence entre le profil de l'isolat obtenu à partir du propriétaire (K52) et celui observé chez les isolats obtenus à partir de trois de ses chats (BW, Flu et Kimmy) et d'autre part la présence de trois bandes de différence entre l'isolat obtenu à partir de ce propriétaire et ceux obtenus à partir de ses quatre autres chats (Gorda, Sacha, Racconi et Flaca) en considérant comme différents des profils ne différant que par une seule bande. De même, Chang *et al.* considèrent que les isolats de la paire (K40, K42) qui diffèrent par trois bandes ont un lien épidémiologique. Dans tous les cas, l'étude MLVA révèle des profils identiques entre les propriétaires et leur(s) chat(s) respectifs. Les données épidémiologiques vont dans le sens d'une contamination des propriétaires par leur(s) chat(s) et d'une transmission de la même souche de *B. henselae* au sein du groupe des sept chats. Le cas très particulier de l'étude de Chang *et al.*, tend donc à montrer que la technique MLVA est plus fiable que l'ECP pour confirmer la réalité d'un lien épidémiologique étroit entre isolats (l'ECP étant plus sujette à variations dans un intervalle de temps très bref, ce qui confirme la plus grande stabilité de la technique MLVA). Le plus faible ID obtenu pour la technique MLVA par rapport

à la technique ECP dans le cas de cette étude est donc plutôt à verser ici au crédit de la technique MLVA.

La comparaison des profils MLVA et ECP de chats polonais montre également que la technique MLVA est plus discriminante que l'ECP et que les données de typage sont concordantes avec les données épidémiologiques fournies. Les chats 3 et 150 qui étaient hébergés par la même fourrière au moment du prélèvement présentaient deux profils distincts. Ceci pourrait être expliqué par une infection par *B. henselae* antérieure à leur hébergement en ce lieu.

Les difficultés rencontrées dans l'interprétation des résultats de l'ECP au sein d'un même laboratoire illustrent à quel point il peut être *a fortiori* difficile de comparer des profils entre les différents laboratoires.

Les techniques MLST et MST sont beaucoup plus simples à mettre en œuvre, mais étant basées sur le séquençage de 7 à 9 segments génomiques chacune (pour la technique MLST, il s'agit dans la plupart des cas de gènes de ménage dont certains sont dimorphes pour l'ensemble des souches testées à ce jour alors que pour MST, ces segments correspondent à des séquences intergéniques dont les variations sont *a priori* moins sujettes à contre-sélection), elles sont nettement plus coûteuses que la technique MLVA. Cette technique est plus simple et elle est accessible à tout laboratoire disposant d'un appareillage simple comprenant un thermocycleur et des cuves d'électrophorèse.

La technique MLVA apparaît par ailleurs très robuste pour deux raisons : d'une part, car ses résultats sont souvent convergents avec ceux des autres techniques, notamment pour confirmer l'identité des souches appartenant probablement au même cluster, comme par exemple les isolats humains australiens : JR (1,3, 5, 6, 7, 8, 9) et les isolats R : (R987, 1073) (également identiques par MLST et ECP), ainsi qu'avec ceux fournis par les données épidémiologiques, d'autre part car elle fait preuve d'un très bon pouvoir de discrimination, qui s'avère supérieur à celui des autres techniques testées, pour les mêmes isolats, d'après les valeurs de l'index de diversité (I.D), alors qu'en même temps la stabilité des VNTR permet de conforter mieux que l'ECP l'existence de liens épidémiologiques entre isolats.

En conclusion, par rapport aux autres techniques évoquées MLVA présente d'autres avantages :

- Meilleur pouvoir discriminant par rapport aux techniques ECP et MLST ;
- Meilleure reproductibilité intra et inter-laboratoire (cf. Pologne) que la technique ECP ;
- Délais d'obtention des résultats fortement réduit par rapport à l'ECP ainsi que par rapport aux techniques MLST et MST, sauf si le laboratoire dispose d'un séquenceur haut débit ;
- Coût faible.

II. Validation des groupes MLVA par les autres techniques :

Après avoir vérifié les performances de la technique MLVA, nous avons testé la possibilité de valider les groupes identifiés par cette technique avec ceux obtenus par MLST (Iredell *et al.*, 2003 et Arvand *et al.*, 2007) et MST (Li *et al.*, 2006 et Li *et al.*, 2007). Pour ce faire, nous nous sommes basés, d'une part, sur certaines des études bibliographiques citées auparavant et qui ont servi à comparer leurs performances par rapport à celles de la technique MLVA et d'autre part sur les résultats de l'étude MLST que nous avons menée dans notre laboratoire.

A. Résultats :

A.1. Correspondance entre les groupes et sous groupes MLVA avec les lignages et les clusters obtenus par MLST et MST :

En nous basant sur les dendrogrammes obtenus dans les cinq études y compris la nôtre, nous avons pu établir des correspondances entre les différents groupes et sous-groupes MLVA et entre les 'lignages' et les 'clusters' obtenus respectivement par MLST et MST.

D'après **le tableau 12**, le groupe A obtenu par MLVA et qui n'est constitué que d'isolats félins de type II, correspond d'une part au « lignage » 3 défini par Iredell *et al.* (2003) et d'autre part au « cluster » 4 établi par Li *et al.* (2006 et 2007). En revanche, ce groupe n'a pas d'équivalent dans l'étude de Arvand *et al.* (2007).

Comme décrit précédemment, dans le sous-groupe Ba de MLVA, nous avons constaté que la majorité des isolats asiatiques, de génotype I, sont regroupés au sein d'un groupe très stable, nommé « Ba1 ». Ce sous-groupe correspond au « cluster » 1 défini en MST. Ce dernier n'a pas d'équivalent en MLST, ce qui est logique puisque les auteurs n'ont pas testé d'isolats asiatiques.

Les autres isolats de ce sous-groupe Ba, souche de référence Houston incluse, présentent un profil de type ST1 et appartiennent au « lignage » 1 dans l'étude de Iredell *et al.* (2003) et au groupe 1 de Arvand *et al.* (2007) ainsi qu'au « cluster » 2 dans l'étude de Li *et al.* (2006, 2007).

Pour le sous-groupe Bb, la situation est moins tranchée par rapport à Ba, au moins par rapport à la technique MLST, puisqu'on peut distinguer :

- d'une part la souche Marseille, qui en MLVA, a un profil assez particulier, et qui appartient au lignage/groupe 2 en MLST et au cluster 3 en MST ;
- d'autre part, les autres souches de ce sous-groupe, qui se positionnent dans le lignage/groupe 1 en MLST (ST: 4-5-8-9) et dont nous ignorons la position en -MST, en l'absence de souches communes.

Groupe MLVA	Sous- groupe MLVA		MLST (Iredell, 2003)	MLST (Arvand, 2007)	MST (Li 2006)	MST (Li 2007)	Génotype
A (Berlin-2)			Lignage/groupe 3 (ST7)		Cluster 4 (MST11 & 18)		II
B	Ba	Ba1 (Asie)			Cluster 1		I
		Autres Ba (Houston 1)	Lignage/groupe 1 (ST1)		Cluster 2 (Houston 1)		I
	Bb autres que « Marseille »				?		I ou II
	Bb (Marseille)		Lignage/groupe 2 (ST 6)		Cluster 3 (MST 5)		II (+I)

Tableau 12: Correspondances entre les groupes et les sous groupes formés par MLVA avec les lignages et les clusters obtenus respectivement par MLST et MST

A.2. Correspondance entre MLVA et MLST :

Pour valider les correspondances obtenues entre les groupes MLVA et les lignages MLST sur la base des données bibliographiques, nous avons essayé d'augmenter l'effectif des isolats à comparer en les typant avec la technique MLST dans notre laboratoire.

Comme déjà décrit précédemment, nous avons typé 14 isolats dont le profil et le groupe MLVA étaient connus. L'analyse des dendrogrammes établis à l'échelle de ces 14 isolats par MLVA permet de le séparer en deux groupes A et B. De la même façon, avec la technique MLST, les isolats forment deux groupes qui sont identiques à ceux obtenus par MLVA (A et B). La comparaison de chaque groupe avec son correspondant (le groupe A en MLVA *versus* le groupe A en MLST et le groupe B en MLVA *versus* le groupe B en MLST) montre que les isolats ne se distribuent pas forcément de la même façon à l'intérieur d'un même groupe (*cf. Figure 1*).

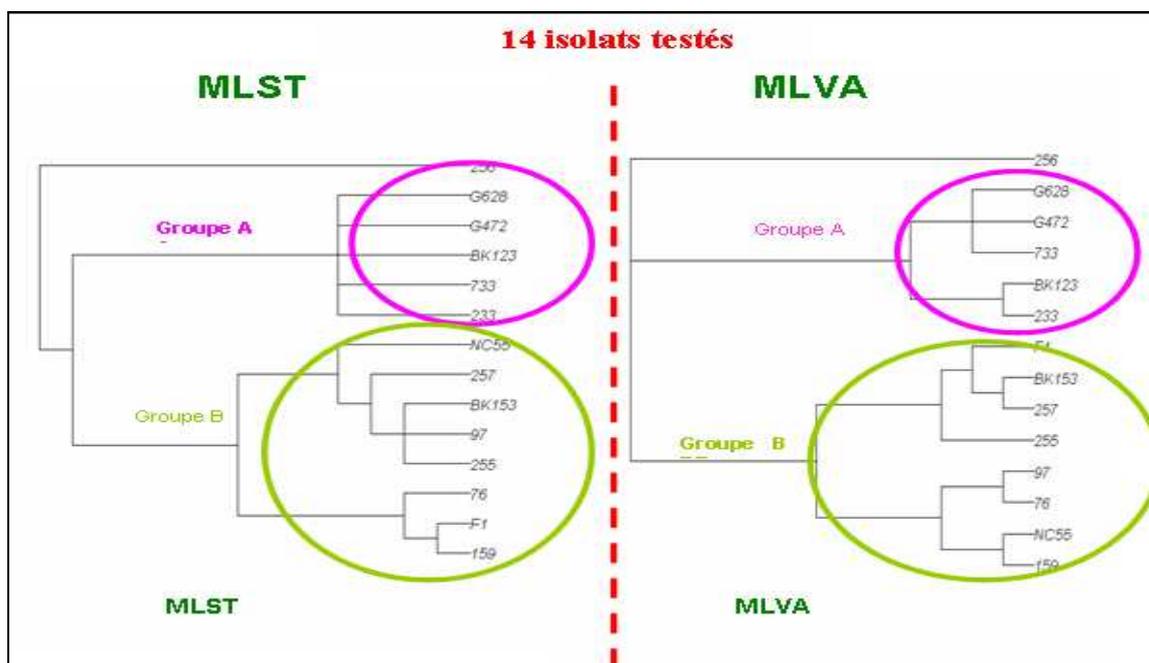


Figure 1 : Validation de groupe A et B de MLVA par MLST

B. Discussion:

Sur la base des données bibliographiques, la comparaison des groupes A et B et des sous-groupes Ba et Bb obtenus par MLVA avec les regroupements

par MLST et MST a porté sur un nombre limité d'isolats testés en commun, avec au total 22 isolats communs pour les techniques MLST et MLVA et 17 isolats communs pour les techniques MST et MLVA. Dans certains cas, la correspondance entre les groupes n'est pas possible, l'établissement de cette dessinés dernière étant dépendant de la disponibilité ou non d'isolats en commun à comparer. C'est le cas par exemple des isolats asiatiques qui sont présents dans l'étude MLVA/MST et absents dans les deux études MLST, réalisées par Iredell *et al.* (2003) et Arvand *et al.* (2007). L'établissement de liens de correspondance entre les groupes MLVA et les clusters MST a été plus facile à mettre en place, plusieurs souches en commun étant présentes dans chaque groupe, sauf pour les souches du sous-groupe Bb, non testées en MST. La subdivision du groupe B en deux sous-groupes MLVA Ba et Bb n'a pas été validée en MLST. Cela pourrait dû au fait que la technique MLST est moins discriminante que la technique MLVA. Néanmoins, la robustesse de ces deux sous-groupes n'est pas démontrée. Or, l'étude de Arvand *et al.* (2007) tend à montrer l'existence de recombinaisons (structure en réseau) pour des souches qui en MLVA se positionnent dans les deux sous-groupes. Cela tend à invalider l'existence de deux groupes exclusivement clonaux. Etant donné que toutes ces études portent sur un nombre faible de souches qui ne constituent pas par ailleurs un échantillonnage représentatif de la population d'isolats du groupe B, il n'est pas possible de tirer de conclusion de l'ensemble de ces études, et ce d'autant plus que nous sommes privés d'information quant au positionnement des souches du sous-groupe Bb par la technique MST (sauf pour la souche Marseille).

En revanche, les correspondances établies entre les groupes MLVA et les groupes observés par les autres techniques ont pu être validées d'une façon plus fine par l'étude MLST que nous avons menée dans notre laboratoire. à l'échelle tout au moins des souches/isolats disponibles (le coût élevé de la technique MLST, 2500 € pour 14 isolats, ne nous ayant pas permis d'en tester davantage pour le moment). La technique MLST étant considérée comme une technique de référence pour la phylogénie, la structuration observée avec la technique MLVA semble aussi fiable.

Comparison of the performances of MLVA vs. the main other typing techniques for *Bartonella henselae*

R. Bouchouicha¹, H.-J. Boudouis¹, M. Berrich¹, M. Monteil¹, B. Chomet² and N. Haddad²

¹UMR BIPAR, ENVA/AFSSA/INRA, Maisons-Alfort, France and ²School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA, USA

INTRODUCTION

Bartonella henselae is a zoonotic pathogen of growing medical importance, which causes persistent bacteraemia in the feline reservoir host. Transmission to the incidental human host, which occurs essentially by cat scratch, is associated with most human cases of cat scratch disease but also with bacillary angiomatosis and peliosis, and other clinical manifestations (endocarditis, osteomyelitis, neuroretinitis...).

Two different 'genotypes' (I/II) were described in 1996, based on minor sequence differences in the 16S rDNA.

Different molecular techniques have been developed for *B. henselae* typing, revealing high genetic diversity among isolates. The most widely used has been pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Recently, two other techniques have been developed: multilocus sequence typing (MLST) in 2003 and mutispacer typing (MST) in 2006, both based on the sequencing of small genomic sequences (nine different segments each). With MLST, Iredell *et al.* (2003) obtained only seven profiles for 37 tested isolates. Using MST, Li *et al.* (2006) detected 39 profiles for 126 cat isolates and 16 profiles for 75 human isolates.

MLVA (multiple locus VNTR analysis) was developed in 2007 in our laboratory, based on the polymorphism of sequences called VNTRs (variable number tandem repeats). This technique involved the amplification of five main VNTRs, called BHV-A to E (for *Bartonella henselae* VNTRs). Thirty-one profiles were observed for 43 tested isolates [6].

In the present study, we compared MLVA performances with those of PFGE, MLST and MST, using common isolates and strains that had

been previously tested by at least one of these techniques.

MATERIALS AND METHODS

For comparing our data with those provided by other techniques, we used five bibliographic sources [1–5]. In these studies, at least one part of the tested isolates was the same as that tested by MLVA (17, 22 and 65 common isolates with MST, MLST and PFGE, respectively). PFGE was used in four studies, [1–4] and 22, 17, 21 and 5 isolates, respectively, were common to those tested using MLVA. We evaluated the profile numbers obtained for the same series of isolates for each technique and we calculated the global diversity index proposed by Hunter and Gaston.

RESULTS

The performances (profile numbers and diversity indexes, DIs) of the different typing techniques are presented in Table 1. Both profile numbers, numbers of unique profiles and DIs were almost systematically higher for MLVA, for the same series of isolates.

MLVA-MLST

For MLST and MLVA, the profile numbers were, respectively, 6/22 and 14/22, which corresponded to DIs of 0.61 and 0.89, respectively. Both MLVA and MLST distinguished without ambiguity three unique profiles corresponding to three strains. Among the 13 isolates (60%) found identical using MLST (isolates belonging to Sequence Type (ST) '1'), MLVA differentiated easily seven different profiles. For MLVA, there were 11 unique profiles vs. only three for MLST. In addition, MLVA allowed distinguishing some isolates within two additional groups of isolates found identical by MLST (ST '4' and '5').

MLVA-MST

Data comparison reflects the high discriminatory powers of both techniques. The profile numbers

Corresponding author and reprint requests: Nadia Haddad, UMR BIPAR, ENVA/AFSSA/INRA, Maisons-Alfort, France. E-mail: nhaddad@vet-alfort.fr

No conflicts of interest declared.

2 Clinical Microbiology and Infection

Table 1. Comparison of the results obtained by MLVA vs. the other typing techniques: diversity indexes and profile numbers

Authors (references)	Common isolates	Geographic origins	16 S RNA genotype		Typing technique (vs. MLVA)	Number of profiles		Diversity index (DI)		No of unique profiles		No of clusters
			Genotype I	Genotype II		MLVA	Other	MLVA	Other	MLVA	Other	
Arvand <i>et al.</i> , 2001 [1]	22	Germany (21), USA (1)	3	19	PFGE	11	7	0.83	0.75	7	6	ND
Chang <i>et al.</i> , 2002 [2]	17	USA	2	15	PFGE	6	7	0.74	0.87	2	4	ND
Iredell <i>et al.</i> , 2003 [3]	20	Australia (20), Germany (1), USA (1)	13	7	PFGE	12	6	0.85	0.82	9	1	3
Maruyama <i>et al.</i> , 2001 [4]	5	USA (4), Japan (1)	3	2	PFGE	5	3	0.75	0.6	5	2	ND
Iredell <i>et al.</i> , 2003 [3]	22	Australia (20), Germany (1), USA (1)	14	8	MLST	14	6	0.89	0.61	11	3	3
Li <i>et al.</i> , 2006 [5]	17	USA (10), Philippines (7)	13	4	MST	17	12	1	0.94	17	9	4

ND = Not determined.

and DIs were 12/17 and 0.94 for MST and 17/17 and 1 for MLVA. MST allowed obtaining only 9/17 (53%) unique profiles instead of 17/17 (100%) for MLVA. The different isolates found identical by MST (types '5', '18' and '38') were differentiated by MLVA. For both techniques, no profile was common to genotypes I and II.

MLVA-PFGE

The comparison between MLVA and PFGE was based on 22, 17, 20 and 5 isolates in common [1-4]. For defining isolates as belonging to two different PFGE types, we considered as a minimum the presence of a two-band difference, as the criteria applied by the different authors were not the same. This option was strengthened by the observation that in most cases isolates that differed by only one band had identical profiles by MLVA technique. As shown in Table 1, apart from in one study [2], MLVA revealed more polymorphism than PFGE. The same clusters were defined when PFGE [2] and MLVA were applied on groups of isolates from owners and their cats, demonstrating the reliability of MLVA for molecular epidemiological studies. Some cases of discrepancies between genotypes I/II and PFGE types were found [1,4], whereas no such divergences were observed with MLVA, MLST and MST.

CONCLUSIONS

The techniques developed before 2007 have been very useful for epidemiological studies on

B. henselae. MLST and MST are easy to use and easy to analyse and interpret, as they provide simple numerical data. But PFGE is based on complex banding patterns and there is no clear consensus for determining the number of bands that allow distinguishing two PFGE types. MLVA appears the most interesting: it is simple, not expensive, does not need sequencing like MLST and MST and has the highest discriminatory power in terms of profile numbers and DIs.

REFERENCES

- Arvand M, Klose AJ, Schwartz-Porsche D, Hahn H, Wendt C. Genetic variability and prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Berlin, Germany, and analysis of its genetic relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic for humans. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 743-746.
- Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Tappero JW, Sanchez MA, Koehler JE. Molecular epidemiology of *Bartonella henselae* infection in human immunodeficiency virus-infected patients and their cat contacts, using pulsed-field gel electrophoresis and genotyping. *J Infect Dis* 2002; 186: 1733-1739.
- Iredell J, Blanckenberg D, Arvand M, Grauling S, Feil EJ, Birtles RJ. Characterization of the natural population of *Bartonella henselae* by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5071-5079.
- Maruyama S, Sakai T, Morita Y *et al.* Prevalence of *Bartonella* species and 16S rRNA gene types of *Bartonella henselae* from domestic cats in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 783-787.
- Li W, Chomel BB, Maruyama S *et al.* Multispacer typing to study the genotypic distribution of *Bartonella henselae* populations. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2499-2506.
- Monteil M, Durand B, Bouchouicha R *et al.* Development of discriminatory multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for *Bartonella henselae*. *Microbiology* 2007; 153: 1141-1148.

CHAPITRE III : APPLICATIONS EPIDEMIOLOGIQUES

Après avoir retenu les 5 BHVs (A, B, C, D et E) et validé la technique MLVA par rapport aux autres techniques, diverses applications épidémiologiques ont été développées. Dans cette partie, trois principales applications seront détaillées.

La première application a porté sur l'étude de la diversité des souches ou isolats de *B. henselae* en fonction de leur espèce (Chat, Homme et Chien), de leur génotype I/II, et de leur origine géographique.

La deuxième application visait à étudier l'efficacité de la technique MLVA en matière de traçabilité épidémiologique. Elle a été réalisée sur cinq paires d'isolats isolés de propriétaires de chats et de leur chat et sur un groupe formé d'un propriétaire et ses sept chats.

La troisième application a consisté à tester la capacité de la technique MLVA à typer des souches ou isolats autres que *B. henselae* et qui en constituent des sous-espèces ou de possibles nouvelles espèces. Jusqu'à nouvel ordre, elles sont qualifiées de « variantes ». Elles ont été isolées de grands félidés sauvages tels que lynx, guépards, lions et pumas d'origine africaine et américaine. Nous avons tenté d'étudier la relation qui pourrait exister entre les différents isolats étudiés d'une part, et entre ces isolats et les isolats et souches de *B. henselae* isolés de chats et de l'Homme d'autre part.

I. Etude de la diversité chez *B. henselae* : Chats domestiques, souches humaines et canine :

Cette étude a été basée sur un total de 178 souches et isolats de *B. henselae* provenant de différentes parties du monde, dans le but d'évaluer leur polymorphisme et d'étudier les relations phylogénétiques qui pourraient exister entre les souches ou les isolats testés.

Ce travail a fait l'objet d'un article, publié dans le journal EID (Bouchouicha *et al.*, 2010).

A. Matériel biologique :

La majorité des isolats et souches ont été fournis par différents collaborateurs dans le monde. Certains avaient été préalablement testés par d'autres techniques de typage moléculaire, en l'occurrence les techniques ECP, MLST et/ou MST. Ces isolats et souches ont été collectés dans 11 pays appartenant à 4 continents (France, Danemark, Allemagne, Grande Bretagne, Philippines, Thaïlande, Nouvelle Zélande, Japon, Australie, Californie et Caroline du Nord).

Les caractéristiques des isolats et souches sont présentées dans l'article N°2 (cf. Bouchouicha *et al.*, 2010).

B. Méthodes :

B.1. Calcul de l'index de diversité (I.D) :

Pour évaluer le polymorphisme des souches, nous avons utilisé l'index de diversité établi par Hunter et Gaston (1996) dont l'usage est recommandé par le groupe d'étude sur les marqueurs épidémiologiques de la société européenne de microbiologie clinique et des maladies infectieuses, l'ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases). Cet index permet de mesurer la probabilité que deux souches prises au hasard parmi d'autres présentent des types différents.

Il prend en compte le nombre d'allèles ainsi que leur fréquence.

Un index de diversité est considéré comme bon, lorsque pour des souches indépendantes, il a une valeur ≥ 0.95 .

Il est défini par la formule suivante:

$$I.D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S nj(nj-1)$$

Avec :

N : Nombre de souches testées

N_j : Nombre de souches ayant l'allèle j

S : Nombre total d' allèles

B.2. Elaboration des arbres :

Des dendrogrammes ont été construits, basés sur des matrices de distance qui prennent en compte le nombre de différences des allèles entre les différentes souches.

La méthode de Neighbor-Joining (NJ) ainsi que la méthode UPGMA ont été utilisées lors du développement de la technique (Struelens, 1996). Les résultats ont été également présentés sous forme de Minimum Spanning Tree.

C. Résultats :

C.1. Etude de la diversité :

C.1.1. Etude globale de la diversité :

L'amplification de l'ADN et des lysats bactériens obtenus à partir des isolats et des souches testés par les 5 principaux BHVs (A à E) révèle qu'individuellement les différents BHVs sont plus au moins discriminants, avec un nombre d'allèles variant de 1 à 37 par locus.

99 profils différents ont été observés après l'amplification de 178 souches ou isolats. Ceci correspond à une moyenne de 1.8 isolats ou souches par profil. 69 des profils observés sont uniques. Le profil (10 -14 - 2 - 2 -1), trouvé chez 14 isolats ayant le génotype II (8%), est le profil le plus rencontré chez les souches testées. D'après les résultats, BHV- E est le VNTR le moins polymorphe (7 Allèles), suivi de BHV-A et BHV-D, qui ont tous deux 8 allèles, puis de BHV-C avec 14 allèles. BHV-B semble le plus polymorphe puisqu'il permet de distinguer 22 allèles différents. Nous avons aussi observé un nombre d'unités

incomplets pour quelques VNTRs. En accord avec d'autres travaux (Pourcel *et al.*, 2003), les valeurs calculées ont été arrondies au chiffre inférieur ou supérieur. Par exemple, l'allèle 12.8 a été arrondi à 13 et l'allèle 5.2 à 5. En outre, nous avons observé des valeurs intermédiaires (pour BHV A et B) qui coexistent avec des valeurs entières ; par exemple, pour BHV 10, l'allèle 14.5 coexiste avec les allèles 14 et 15. Lorsque les allèles intermédiaires sont pris en compte, le nombre d'allèles obtenus pour BHV-A passe de 8 à 15 allèles et de 22 à 28 allèles pour BHV-B. En revanche, pour BHV-C, BHV-D et BHV-E, nous n'avons pas observé d'allèles intermédiaires.

L'évaluation du pouvoir discriminant a été réalisée par le calcul de l'index de diversité (I.D). Cet index a été calculé pour les cinq BHVs retenus (0.98) ainsi que pour chaque BHV étudié (BHV-A = 0.74 ; BHV-E =, 0.76 ; BHV-C= 0.77 ; BHV-D= 0.80 et BHV-B= 0.88). Nous avons également calculé l'index de diversité des souches en fonction de leur génotype (génotype I = 0.98 et génotype II = 0.97), de leur origine géographique (européenne = 0.95 ; asiatique = 0.98 ; américaine = 0.95 et australienne = 0.87) et de leur hôte (Homme = 0.87 et chat = 0.98).

C.1.2. Diversité en fonction du génotype 16S rDNA

Parmi les 99 profils, 55 correspondent à 114 isolats de génotype II, les 44 profils restants correspondant à 64 isolats de génotype I. Aucun profil commun aux isolats de génotype I et II n'a été observé dans cette étude.

Le nombre moyen d'isolats par profil est très proche pour les isolats de génotypes I (1.5) et II (2.0). En revanche, selon les BHVs, le degré de polymorphisme varie considérablement d'un génotype à l'autre (**Tableau 1**). Les VNTR BHV-C des isolats de génotype I et BHV-E des isolats de génotype II semblent les moins polymorphes alors que les VNTR BHV-B et E de génotype I et BHV-E de génotype II apparaissent les plus polymorphes.

	Nombre d'isolats	Nombre profils	I.D.					I.D. global
			BHV-A	BHV-B	BHV-C	BHV-D	BHV-E	
Total	178	99	0.74	0.88	0.77	0.80	0.76	0.98
Génotype I	64	44	0.66	0.74	0.52	0.72	0.74	0.98
Génotype II	114	55	0.73	0.81	0.62	0.75	0.55	0.97

Tableau 1 : Etude de la diversité en fonction du génotype (I/II) des isolats

C.1.3. Diversité en fonction de l'origine géographique:

Afin d'étudier la diversité des profils en fonction de leur origine géographique, nous avons calculé l'index de diversité global (I.D global) et l'index de diversité / BHV pour chaque continent (**Tableau 2**).

La plupart des profils ne sont rencontrés que dans un continent. Parmi les 99 profils, 30 sont communs à 2 isolats au moins (cf. article N°2 : Bouchouicha *et al.*, 2009). Seulement 4 (4%) de ces profils sont partagés par deux continents. Certains profils sont parfois concentrés dans un continent particulier. C'est le cas, par exemple, du profil 10-14-2-2-1 qui représente à lui seul 17.5% des profils européens.

Les isolats d'Asie sont caractérisés par l'I.D le plus élevé (0.97), alors que ceux d'Australie présentent l'ID le plus bas (0.87).

	Nombre d'isolats	Nombre profils	I.D					I.D global
			BHV-A	BHV-B	BHV-C	BHV-D	BHV-E	
Europe	81	42	0.71	0.73	0.61	0.72	0.55	0.95
Asie	29	22	0.78	0.85	0.60	0.57	0.55	0.97
USA	48	28	0.66	0.83	0.77	0.60	0.58	0.95
Australie	20	11	0.48	0.77	0.62	0.71	0.82	0.87

Tableau 2: Etude de la diversité en fonction de l'origine géographique des isolats

L'étude globale de la diversité de 178 isolats et souches testés montre que certains allèles semblent plus présents dans certaines régions du monde (géotypage). Le calcul de fréquence de certains allèles rencontrés a été réalisé uniquement pour BHV-C, BHV-D et BHV-E sur la base de leur moindre diversité

allélique. Par exemple, en Europe (France, Allemagne, Danemark, et Grande Bretagne), nous avons constaté la prédominance, d'une part, des allèles 1 et 4 pour BHV-E, dont la fréquence cumulée est de 71%, 85%, 94% et 100% dans chacun de ces pays et d'autre part, des allèles 2 et 6 pour BHV-C avec une fréquence cumulée de 74% (Allemagne), 79% (France), 83% (Danemark) et 83% (Grande Bretagne). Ces allèles E (2 et 6) et C (2 et 4) ont été également rencontrés en Caroline du Nord avec une fréquence de 58% chacun.

De même, les allèles 2 et 3 semblent caractéristiques pour BHV-E des régions asiatiques étudiées avec une fréquence cumulée très élevée de 80% (Thaïlande) et 100% (Japon et Philippines). Nous avons constaté que certains allèles ne sont jamais rencontrés dans certains régions ou bien y sont présents d'une façon très anecdotique. C'est le cas par exemple de l'allèle 3 qui, outre les pays asiatiques déjà cités, a été trouvé presque exclusivement en Australie (35%), territoire le plus proche des pays asiatiques étudiés (nous ne l'avons par ailleurs détecté qu'en Californie et en Caroline du Nord, avec une fréquence très faible de 5% et 8% respectivement).

C.1.4. Diversité en fonction de l'hôte:

Nous avons identifié 12 profils caractérisant les isolats humains (sur un total de 20 isolats) et 92 profils obtenus à partir de 156 isolats félines.

L'unique isolat canin testé dans cette étude, de génotype I, avait un profil spécifique et très proche de deux autres isolats félines également de génotype I, originaires tous les deux de Caroline du Nord.

Parmi les 30 profils rencontrés chez plus de 2 isolats, 3 se sont révélés spécifiques des isolats humains, 23 des isolats félines alors que 4 étaient communs aux deux espèces. Le nombre d'isolats par profil est presque identique, que ce soit chez les isolats humains (1.8) et félines (1.7). Vu le nombre limité d'isolats et de souches humaines disponibles dans cette étude, l'index de diversité (I.D) de ces derniers apparaît plus bas (0.87) que celui calculé pour les isolats de chats (0.98). Nous avons également constaté que les isolats de génotype I issus des humains (15/21, 71%) sont plus fréquents que les isolats félines de génotype I (48/156, 31%).

Cette observation est aussi valable pour la répartition des profils de génotype I entre les isolats humains et félins. Nous avons évalué l'I.D global selon l'espèce (Homme et Chat) ainsi que l'I.D pour chaque BHV en prenant en compte et en parallèle l'espèce. BHV-A présente une valeur d'I.D très basse de 0.31 qui est due à son dimorphisme chez les chats. En revanche, chez les humains, l'I.D de ce BHV apparaît le plus élevé (0.79) (**Tableau 3**).

	Nombre d'isolats	Nombre profils	I.D					I.D global
			BHV-A	BHV-B	BHV-C	BHV-D	BHV-E	
Isolats humains	22	12	0.31	0.76	0.68	0.72	0.79	0.89
Isolats félins	156	92	0.78	0.86	0.75	0.79	0.74	0.74

Tableau 3 : Etude de la diversité en fonction de l'hôte (Chat/Homme).

C.2. Etude de la relation entre les isolats/ souches testés:

Dans le but d'établir un lien entre les 178 isolats et souches étudiés, nous avons réalisé avec la collaboration de Benoît Durand, (unité d'épidémiologie, AFSSA), un dendrogramme basé sur les 5 principaux BHVs. Le dendrogramme a été construit avec la méthode UPGMA et est enraciné par *B. koehlerae* qui présente un profil très particulier (11-0-0-1-2). Ce dendrogramme permet d'afficher 99 profils différents représentatifs des isolats / souches testés lors de cette étude (cf. article 2 : Bouchouicha *et al.*, 2009).

Selon ce dendrogramme, les isolats et souches sont répartis en deux groupes principaux, **A & B** :

- Le groupe A (64 isolats), correspondant à 26 profils, est composé exclusivement d'isolats de génotype II (57% des isolats de génotype II testés) ;
- Le groupe B (114 isolats) correspondant à 73 profils se répartit en 2 sous groupes : **Ba** (59 isolats/souches et 38 profils) et **Bb** (55 isolats/souches et 35 profils). Contrairement au groupe A, le sous groupe Ba est constitué exclusivement d'isolats/souches de génotype I (91% des isolats/ souches de génotype I testés).

Ce sous groupe inclut la souche de référence Houston I. Au sein de ce sous groupe est présent un groupe très homogène renfermant la majorité des isolats asiatiques (16/19), 84%).

En revanche, le sous-groupe Bb est très hétérogène. Il est constitué principalement par des isolats/souches de génotype II (48/55, 87.3%).

La totalité des isolats /souches humains (21 isolats / souches) appartiennent au groupe B dont 71% dans le sous groupe Ba et 29% dans Bb.

La majorité des isolats et souches du groupe A sont d'origine européenne alors que ceux du sous groupe Bb sont majoritairement d'origine européenne et américaine. Ba se révèle le sous-groupe le plus hétérogène puisqu'il héberge des isolats et souches provenant de tous les continents avec une prédominance de souches asiatiques (26/ 59). 69% des isolats californiens sont groupés en clusters de 2, 3, 6 ou 8 isolats identiques dont 28% présentant des profils spécifiques et 8% ont des profils identiques à ceux des isolats européens, asiatiques et américains.

Toujours dans le but d'étudier le lien au sein de la population de *B. henselae*, nous avons élaboré un Minimum Spanning Tree, dans lequel il a été observé pratiquement les mêmes groupes et sous groupes que ceux identifiés auparavant par le dendrogramme (cf . **Figure 1**).

L'étude des liens phylogénétiques qui pourraient exister entre les isolats/souches testés sera traitée dans le troisième chapitre du manuscrit.

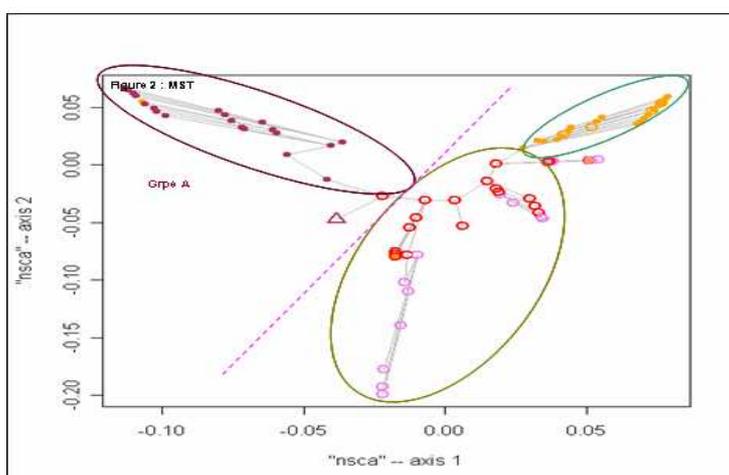


Figure1 : Mininum Spanning Tree montrant les groupes et les sous groupes

D. Discussion et conclusion :

Cette étude de typage moléculaire est la première réalisée à des fins épidémiologiques, basée sur la technique MLVA (Monteil *et al.*, 2007). Si on prend en compte l'ensemble des études de typage moléculaire déjà publiées, indépendamment de la technique, elle vient au deuxième rang pour le nombre d'isolats et souches de *B. henselae* typées (178) (Arvand *et al.*, 2008).

99 profils ont été obtenus en se basant sur la combinaison des 5 principales séquences répétées, BHV (A, B, C, D et E) retenues lors du développement de la technique pour leur polymorphisme.

Les isolats asiatiques présentent une diversité plus élevée que les isolats américains et européens. Les isolats australiens sont les moins polymorphes. Plusieurs facteurs pourraient expliquer la différence de diversité observée entre les 4 continents. Par exemple, en Amérique, certains isolats californiens issus de propriétaires et de leurs chats sont fortement liés épidémiologiquement et forment ainsi des clusters. De même, des isolats humains australiens (7/ 18) possédant des profils identiques (14-22-10-5-3) avec les 5 BHVs sont issus de personnes habitant la même région (Sydney). Cependant, les données disponibles n'ont pas permis de confirmer si un lien épidémiologique existait entre ces patients, en d'autres termes s'ils constituent un cluster. Quant aux isolats d'origine asiatique (Thaïlande et Japon), contrairement aux isolats de Californie et d'Océanie, ils ont été collectés à partir de nombreux sites dans les deux pays. Ainsi, les isolats de Thaïlande ont été isolés à partir de chats errants vivant dans 5 différentes villes de Thaïlande (cf. annexe 4). Les isolats du Japon, dont la plupart sont issus de chats de propriétaires, ont été collectés dans 9 différents départements de ce pays.

Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par d'autres auteurs avec d'autres techniques de typage, mais avec une partie des isolats en commun (Li *et al.*, 2008).

Cependant, toutes les études réalisées, la notre incluse, qui ont souvent recours à tout ou partie des mêmes échantillons, présentent des défauts majeurs de point de vue de la constitution de ces échantillons :

- à l'échelle des différents pays, l'absence d'échantillonnage raisonné dans la plupart des pays concernés : en ce qui concerne les chats, ils ont été réalisés à la seule initiative de certains vétérinaires praticiens (Danemark, Philippines) ou faisant partie d'institutions de recherche (Californie, France). Il s'agit d'échantillons le plus souvent de convenance (clientèle de la clinique ou de l'hôpital pour les chats domestiques, chats capturés pour les chats errants). Ils ne reflètent donc que la situation sur une population réduite de chats dans une zone géographique limitée et dans une période de temps restreinte et ne peuvent être extrapolés à la situation d'un pays. Le seul effort, déjà souligné, dans la constitution d'un échantillonnage qui couvre toute la surface d'un pays, concerne le Japon et la Thaïlande. Néanmoins, cela ne garantit pas d'avantage la représentativité des échantillonnages réalisés dans chacune de ces zones. En ce qui concerne les échantillons d'origine humaine, qui proviennent de quatre zones géographiques, nous n'avons pu obtenir aucune information complémentaire sur les cas dont étaient issus les isolats et sur les liens éventuels entre ces isolats, de profils MLVA identiques pour beaucoup d'entre eux, ce qui interdit de confirmer l'existence de ces liens, tout en suspectant fortement, sans pouvoir s'en assurer, la présence d'un biais de recrutement. Quant à l'étude portant sur la comparaison des isolats obtenus chez des propriétaires et leur (s) chat(s), l'objectif affiché dès le départ n'était pas celui d'une étude descriptive, mais celui d'une étude de traçabilité (cf chapitre II : Etude de traçabilité, page 111).
- Face à un échantillonnage de convenance si hétérogène, il est donc hasardeux de prétendre comparer les résultats entre pays, d'autant plus que certains échantillons ont été prélevés à des périodes différentes selon les pays (Hiver ou Eté). D'autres éléments sont susceptibles d'interférer avec les comparaisons entre pays relatives aux profils des isolats d'origine féline, notamment leur mode de vie (chats errants / animaux de compagnie). La ségrégation observée en fonction de l'origine géographique des isolats, particulièrement chez les isolats asiatiques, doit être interprétée d'une façon très prudente puisque dans certains cas, on ne peut pas dissocier le génotype d'un isolat de son origine géographique. Presque tous les isolats asiatiques

testés sont de type I et sont localisés dans le même sous groupe Ba. Ces observations sont corroborées par celles d'Arvand *et al.* (2007) qui ont montré que le génotype I est prédominant chez les isolats asiatiques et qu'il est associé le plus souvent aux formes les plus graves chez l'homme alors que le génotype II est plus fréquent chez les isolats et souches européens et américains. Cependant, le même possible facteur de confusion est présent dans les deux études.

- Les mêmes restrictions peuvent s'appliquer à la comparaison des isolats selon les autres critères pris en considération (génotype I/II et espèces d'origine).

Néanmoins, ces échantillons ont le mérite d'exister, car il est très rare d'en obtenir, et ceux que nous avons pu récupérer correspondent à des origines géographiques très diversifiées (USA, Océanie, Europe, Asie). La difficulté d'obtenir des souches humaines est due au fait que le diagnostic expérimental chez cette espèce est essentiellement basé sur des tests sérologiques. Quand les résultats de ces tests sont positifs pour *B henselae*, il est rare que la diagnose soit étendue à l'identification et/ou au typage de la souche. Pour ce faire, il faut d'abord obtenir l'isolement de la souche, qui nécessite généralement le recours à une méthode de prélèvement invasive (par biopsie) et gênante pour le patient.

La technique MLVA a permis aussi de distinguer les isolats en fonction de leur génotype I/II. Aucun profil n'a été trouvé commun aux génotypes I et II dans le dendrogramme.

Nos résultats permettent donc malgré les limites évoquées, de dégager certaines tendances concernant les profils, qui méritaient bien entendu d'être confirmées à plus grande échelle et surtout à l'aide d'échantillons plus représentatifs.

II. Etude de traçabilité :

L'objectif de cette étude était de déterminer la validité ou non de la technique MLVA pour confirmer ou d'infirmer l'existence de liens entre des isolats liés épidémiologiquement.

A. Matériel biologique :

- 4 paires d'isolats (Homme, Chat) isolés de propriétaires et de leurs chats : (K33, K38), (K40, K42), (K50, K51), (K53, Zeus)
- 1 groupe d'isolats constitué d'un isolat humain et de 7 isolats issus des sept chats vivant ensemble et avec leur propriétaire: K52, BW, Flu, Amanda, Gorda, Raconni, Flaca et Sacha.

Tous les isolats sont d'origine américaine et plus précisément californienne et sont de génotype II à l'exception de K33 (génotype I).

B. Résultats:

Les 4 paires constituées des isolats issus de propriétaires et de leur chat cités précédemment, ainsi que le groupe d'isolats issus d'un propriétaire et de ses 7 chats ont été testés initialement avec les 5 principaux BHV (A, B, C, D et E). Dans les cas où des isolats ont présenté le même profil MLVA pour ces BHV, le recours aux BHV additionnels est devenu nécessaire pour établir avec davantage de certitude l'identité de ces isolats. Les résultats obtenus en première intention avec les 5 principaux BHV sont présentés dans le tableau 4. Les souches issues des chats et de leurs propriétaires respectifs ont présenté les mêmes profils pour les 5 principaux BHV ainsi que pour les 6 autres BHV additionnels à l'exception de la paire 1 (K 38, K 38) ; dans ce dernier cas, le profil du propriétaire est différent de celui du son chat pour 3 BHV/5. En outre, ces deux isolats ne possèdent pas le même génotype (**Tableau 4**).

Paire/cluster supposé(e)	isolat	génotype	Origine géographique	Hôte	Profils VNTR				
					BHV-A	BHV-B	BHV-C	BHV-D	BHV-E
1	K33	I	USA	Homme	14	35	6	8	7
	K38	II	USA	Chat	14	32	4.5	2	7
2	K40	II	USA	Homme	14	32	4.5	8	7
	K42	II	USA	Chat	14	32	4.5	8	7
3	K50	II	USA	Homme	15	20	4.5	10	8
	K51	II	USA	Chat	15	20	4.5	10	8
4	K53	II	USA	Homme	14	31	4.5	8	7
	Zeus	II	USA	Chat	14	31	4.5	8	7
5	K52	II	USA	Homme	14	33	4.5	8	7
	BW	II	USA	Chat	14	33	4.5	8	7
	Flu	II	USA	Chat	14	33	4.5	8	7
	Sacha	II	USA	Chat	14	33	4.5	8	7
	Gorda	II	USA	Chat	14	33	4.5	8	7
	Flaca	II	USA	Chat	14	33	4.5	8	7
	Amanda	II	USA	Chat	14	33	4.5	8	7
	Racconi	II	USA	Chat	14	33	4.5	8	7

Tableau 4 : Profils MLVA de 4 paires (Homme/Chat) et d' un groupe formé d'un Homme et de ses 7 chats

C. Discussion et conclusion :

D'après le **tableau 4**, on constate une concordance entre les résultats du typage moléculaire et les données épidémiologiques, y compris pour la paire 1 d'isolats (K33, K38) qui diffèrent par 2 BHV. En effet, les données recueillies sur le terrain ont révélé que le propriétaire K33 n'a pas été griffé par son chat K38, ce qui concorde avec la différence des profils observée pour cette paire.

Le lien épidémiologique existant entre ces isolats a été également montré par Chang *et al.*, (2001) utilisant comme technique de typage l'ECP.

Cette étude montre que les VNTR peuvent pleinement jouer le rôle d'outils de traçabilité épidémiologique puisque la technique MLVA nous a permis de confirmer ou d'infirmer avec certitude l'hypothèse d'un lien entre l'infection de chats et de leur maître et que les résultats ont été confirmés par les informations du terrain.

Ceci montre que le test MLVA peut être utilisé dans tous les cas où l'on souhaite tracer une source de contamination ou évaluer le niveau de diffusion d'une souche au sein d'une population de félidés.

Article N°3 (Bouchouicha *et al.*, 2009)

Molecular Epidemiology of Feline and Human *Bartonella henselae* Isolates

Rim Bouchouicha, Benoit Durand, Martine Monteil, B.B. Chomel, Moez Berrich, Mardjan Arvand, Richard J. Birtles, Edward B. Breitschwerdt, Jane E. Koehler, Ricardo Maggi, Soichi Maruyama, Rick Kasten, Elisabeth Petit, Henri-Jean Boulouis, and Nadia Haddad

Multiple locus variable number tandem repeat analysis was performed on 178 *Bartonella henselae* isolates from 9 countries; 99 profiles were distributed into 2 groups. Human isolates/strains were placed into the second group. Genotype I and II isolates shared no common profile. All genotype I isolates clustered within group B. The evolutive implications are discussed.

Bartonella henselae is the zoonotic agent of cat-scratch disease and has been associated with bacillary angiomatosis, bacillary peliosis, endocarditis, osteomyelitis, and neuroretinitis (1). It is usually present in low numbers in infected human tissues, whereas cats, the natural reservoir for the bacterium, are prone to persistent bacteremia. Therefore, most *B. henselae* isolates are of feline origin. Two genotypes, based on 16S rDNA differences, have been described (1). Genotype I was more frequently observed in humans in some countries where most cats are infected with genotype II (2,3). Genotype II is more prevalent in cats in Europe, Australia, and the United States (2-6), and most feline isolates from Asia belong to genotype I (7-9). In a recent study, 3 (1.6%) of 191 *B. henselae* isolates harbored 2 different 16S rDNA cop-

ies and could not be assigned to a distinct genotype (10). However, most isolates harbored 2 identical 16S rDNA copies and were assigned to either type I or II, confirming that delineation of *B. henselae* isolates in two 16S rDNA types is generally reasonable.

Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) was recently developed for *B. henselae* typing (6). The results are produced in an intrinsically quantitative form, called a profile, corresponding to the number of basic units in an isolate for each variable number tandem repeat (VNTR). MLVA was more discriminatory (11) than the other widely used typing techniques, such as pulsed-field gel electrophoresis (2), multilocus sequence typing (MLST) (12) and multispacer typing (MST) (13). In our protocol, MLVA involves the amplification of 5 main VNTR loci, BHV-A to -E, for *B. henselae* VNTRs (6).

The Study

We analyzed 178 *B. henselae* isolates/strains from various sources (Table 1): 156 (88%) feline isolates/strains, 21 (11%) from diseased humans, and 1 isolate from a sick dog. The number of alleles varied from 7 (BHV-E) to 22 (BHV-B). Most of the European isolates (all but 1 of feline origin) (2,4,6) and of the American isolates/strains (North Carolina and California) (5,14), of which 85% were of feline origin, belonged to genotype II (89% and 64.6%, respectively). The Asian isolates (all but 1 of feline origin) (7-9) and the Australasian isolates (60% of human origin) (12), mainly belonged to genotype I (89.6% and 65%, respectively).

Ninety-nine different MLVA profiles were observed (Table 1), corresponding to an average number of isolates per profile of 1.8 (Table 2). Sixty-nine of these profiles were found in only 1 isolate or strain (67%), and 30 were observed in >1 isolate. Among these, none was shared by genotype I and genotype II isolates. Diversity index (DI) was 0.98 (Table 1). Diversity was observed in both genotypes because genotype-specific DIs were almost identical (Table 1).

MLVA profiles appeared location-specific because only 4 (13%) of the 30 profiles observed in >1 isolate/strain were present in >1 continent (Table 2). Within continents, no marked dominance of a given profile was observed, and continent-specific DIs were similar (Table 1).

Of the 99 *B. henselae* profiles, 12 were obtained from the 21 human isolates/strains and 1 from the dog, whereas 92 profiles were obtained from the 156 feline isolates. Five profiles were common to 5 human and 11 feline isolates. Among the 30 profiles observed in ≥ 2 isolates, 23 were observed only in feline isolates (Table 2). The proportion of genotype I profiles was significantly higher in human-specific profiles than in cat-specific profiles ($p = 0.01$, by Fisher test).

Author affiliations: Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons Alfort, France (R. Bouchouicha, M. Monteil, M. Berrich, E. Petit, H.-J. Boulouis, N. Haddad); Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons Alfort (B. Durand); University of California, Davis, California, USA (B. Chomel, R. Kasten); Zentrum für Gesundheitsschutz, Dillenburg, Germany (M. Arvand); University of Liverpool, Cheshire, UK (R.J. Birtles); North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA (E. Breitschwerdt, R. Maggi); University of California, San Francisco, California, USA (J. Koehler); and Nihon University, Kanagawa, Japan (S. Maruyama)

DOI: 10.3201/eid1505.080995

DISPATCHES

Table 1. Description of *Bartonella henselae* isolates and strains tested, global diversity of the typing system, and diversity variations according to 16S rDNA genotype, continent, and host*

Characteristics	No. isolates/ strains	No. profiles	Average no. isolates/profiles	DI	No. alleles (minimum–maximum no. repeats)				
					A	B	C	D	E
All <i>B. henselae</i>	178	99	1.8	0.98	8 (9–16)	22 (5–37)	14 (1–25)	8 (1–9)	7 (1–7)
16S rDNA genotype I	64	44	1.5	0.98	6	12	11	6	6
16S rDNA genotype II	114	55	2.0	0.97	6	15	7	7	6
Location									
Europe	80†	42	1.9	0.95	6	12	6	6	5
Asia	29‡	22	1.3	0.98	7	10	8	4	3
USA	49§	28	1.7	0.95	4	12	7	6	6
Australia–New Zealand	20¶	11	1.8	0.87	4	5	5	4	6
Host									
Human + dog	22#	12	1.8	0.87	2	6	6	3	6
Healthy cat	156	92	1.7	0.98	8	20	11	8	7

*DI, diversity index; A, BHV-A; B, BHV-B; C, BHV-C; D, BHV-D; E, BHV-E.

†Denmark, 18 (7); France, 23 (7); Germany, 27 (2); UK, 12 (5).

‡Japan, 12 (8); Philippines, 7 (9); Thailand, 10 (10).

§California: 36, including 5 owners and their 11 cats (6,14); North Carolina, 12 (provided by Ed Breitschwerdt). Reference strain Houston 1.

¶Australia, 18 and New Zealand, 2 (3,12).

#21 human isolates from 1 German patient with bacillary angiomatosis (BA) (2), 1 Japanese patient with cat-scratch disease (provided by S. Maruyama), 12 Australian human patients with cat-scratch disease (3), 5 California human patients with BA (14), 1 North Carolina patient with a wide range of symptoms, including fatigue, joint pain, insomnia, headache, blurred vision, irritability (provided by Ed Breitschwerdt), plus the reference strain Houston 1 (ATCC 49882, initially isolated from a patient with BA) (3), and 1 isolate from a dog with endocarditis (provided by Ed Breitschwerdt).

For BHV-A, only 2 alleles (14 and 15 copies) were found in isolates from humans, whereas all 8 identified alleles were observed in cat isolates. The number of repeats differed significantly between sick humans and healthy cats ($p = 0.02$, by Fisher test).

Relationships between the 99 MLVA profiles were analyzed by unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA), using a categorical distance, with a *B. koehlerae* isolate used as an outgroup. To take into account that UPGMA is sensitive to taxa entry order, we computed the majority-rule consensus tree of 500 dendrograms built with random taxa entry order. MLVA profiles were grouped into 2 main groups named A and B (online Appendix Figure, available from www.cdc.gov/EID/content/15/5/813.htm). Group A (26 profiles), was exclusively constituted by genotype II feline isolates. Group B (73 profiles), to which all human isolates belonged, further divided in 2 subgroups, Ba and Bb. Subgroup Ba (38 profiles) was exclusively composed of genotype I isolates, including the reference strain Houston I and a homogenous subgroup, Ba1, containing 84% of the Asian isolates. Finally, 83% of subgroup Bb isolates belonged to genotype II (29/35 profiles).

The utility of MLVA for molecular epidemiologic analysis of clusters was tested using isolates from California cats and their owners (14). Five human–cat groups of *B. henselae* isolates were analyzed. For 1 cat–human pair of isolates, which belonged, respectively, to genotype II and genotype I, major profile differences were observed, as expected. The 4 other cat–human groups, which possessed the same genotype, also had the same MLVA profile with the 5 tested BHV, as well as with the 6 additional BHV (F–K)

and variant alleles for BHV-A and/or B (6). Sequencing confirmed these results.

Conclusions

Our results confirm that VNTRs are excellent molecular markers for confirming or excluding the responsibility of a given cat in the transmission of *B. henselae* to a human. In California, the profile identity observed within 4 clusters further supports the hypothesis that all these humans acquired infection from their respective domestic cat contacts.

MLVA enabled a clear separation between genotypes I and II, because no profile was shared between both genotypes. The dendrogram showed a high level of discrimination between 16S rDNA genotypes in the *B. henselae* population tested. Interestingly, the groups and subgroups delineated by MLVA were the same as those defined by MLST, a standard method for phylogenetic analysis (12). The same was observed with MST (13). The isolates of the subgroup Bb appeared divergent and distant from each other and from subgroup Ba that contains almost all genotype I profiles (98%). Moreover and despite possible clustering for some of the isolates, none of the 21 human isolates was present in group A. Interestingly, as for most of the human patients, the isolate obtained from the ill dog also belonged to genotype I.

These observations suggest that all genotype I isolates could be phylogenetically derived from genotype II isolates located in group B but not in group A, as already suggested using MLST (15). This observation could mean that genotype II isolates belonging to group B are closer to genotype I isolates than to genotype II isolates belonging to group

DISPATCHES

Table 1. Description of *Bartonella henselae* isolates and strains tested, global diversity of the typing system, and diversity variations according to 16S rDNA genotype, continent, and host*

Characteristics	No. isolates/ strains	No. profiles	Average no. isolates/profiles	DI	No. alleles (minimum–maximum no. repeats)				
					A	B	C	D	E
All <i>B. henselae</i>	178	99	1.8	0.98	8 (9–16)	22 (5–37)	14 (1–25)	8 (1–9)	7 (1–7)
16S rDNA genotype I	64	44	1.5	0.98	6	12	11	6	6
16S rDNA genotype II	114	55	2.0	0.97	6	15	7	7	6
Location									
Europe	80†	42	1.9	0.95	6	12	6	6	5
Asia	29‡	22	1.3	0.98	7	10	8	4	3
USA	49§	28	1.7	0.95	4	12	7	6	6
Australia–New Zealand	20¶	11	1.8	0.87	4	5	5	4	6
Host									
Human + dog	22#	12	1.8	0.87	2	6	6	3	6
Healthy cat	156	92	1.7	0.98	8	20	11	8	7

*DI, diversity index; A, BHV-A; B, BHV-B; C, BHV-C; D, BHV-D; E, BHV-E.

†Denmark, 18 (7); France, 23 (7); Germany, 27 (2); UK, 12 (5).

‡Japan, 12 (8); Philippines, 7 (9); Thailand, 10 (10).

§California: 38, including 5 owners and their 11 cats (6,14); North Carolina, 12 (provided by Ed Breitschwerdt). Reference strain Houston 1.

¶Australia, 18 and New Zealand, 2 (3,12).

#21 human isolates from 1 German patient with bacillary angiomatosis (BA) (2), 1 Japanese patient with cat-scratch disease (provided by S. Maruyama), 12 Australian human patients with cat-scratch disease (3), 5 California human patients with BA (14), 1 North Carolina patient with a wide range of symptoms, including fatigue, joint pain, insomnia, headache, blurred vision, irritability (provided by Ed Breitschwerdt), plus the reference strain Houston 1 (ATCC 49882, initially isolated from a patient with BA) (3), and 1 isolate from a dog with endocarditis (provided by Ed Breitschwerdt).

For BHV-A, only 2 alleles (14 and 15 copies) were found in isolates from humans, whereas all 8 identified alleles were observed in cat isolates. The number of repeats differed significantly between sick humans and healthy cats ($p = 0.02$, by Fisher test).

Relationships between the 99 MLVA profiles were analyzed by unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA), using a categorical distance, with a *B. koehlerae* isolate used as an outgroup. To take into account that UPGMA is sensitive to taxa entry order, we computed the majority-rule consensus tree of 500 dendrograms built with random taxa entry order. MLVA profiles were grouped into 2 main groups named A and B (online Appendix Figure, available from www.cdc.gov/EID/content/15/5/813.htm). Group A (26 profiles), was exclusively constituted by genotype II feline isolates. Group B (73 profiles), to which all human isolates belonged, further divided in 2 subgroups, Ba and Bb. Subgroup Ba (38 profiles) was exclusively composed of genotype I isolates, including the reference strain Houston I and a homogenous subgroup, Ba1, containing 84% of the Asian isolates. Finally, 83% of subgroup Bb isolates belonged to genotype II (29/35 profiles).

The utility of MLVA for molecular epidemiologic analysis of clusters was tested using isolates from California cats and their owners (14). Five human–cat groups of *B. henselae* isolates were analyzed. For 1 cat-human pair of isolates, which belonged, respectively, to genotype II and genotype I, major profile differences were observed, as expected. The 4 other cat-human groups, which possessed the same genotype, also had the same MLVA profile with the 5 tested BHV, as well as with the 6 additional BHV (F–K)

and variant alleles for BHV-A and/or B (6). Sequencing confirmed these results.

Conclusions

Our results confirm that VNTRs are excellent molecular markers for confirming or excluding the responsibility of a given cat in the transmission of *B. henselae* to a human. In California, the profile identity observed within 4 clusters further supports the hypothesis that all these humans acquired infection from their respective domestic cat contacts.

MLVA enabled a clear separation between genotypes I and II, because no profile was shared between both genotypes. The dendrogram showed a high level of discrimination between 16S rDNA genotypes in the *B. henselae* population tested. Interestingly, the groups and subgroups delineated by MLVA were the same as those defined by MLST, a standard method for phylogenetic analysis (12). The same was observed with MST (13). The isolates of the subgroup Bb appeared divergent and distant from each other and from subgroup Ba that contains almost all genotype I profiles (98%). Moreover and despite possible clustering for some of the isolates, none of the 21 human isolates was present in group A. Interestingly, as for most of the human patients, the isolate obtained from the ill dog also belonged to genotype I.

These observations suggest that all genotype I isolates could be phylogenetically derived from genotype II isolates located in group B but not in group A, as already suggested using MLST (15). This observation could mean that genotype II isolates belonging to group B are closer to genotype I isolates than to genotype II isolates belonging to group

Feline and Human *B. henselae* Isolates

Table 2. Distribution of *Bartonella henselae* isolates/strains by 16S rDNA genotype, host, and location for profiles with ≥2 isolates*

VNTR profile					No. isolates	16S rDNA genotype		Host		Location			
A	B	C	D	E		I	II	Human	Healthy cat	Europe	Asia	USA	Aus-NZ
10	14	2	2	1	14		14		14	14			
9	15	2	1	1	8		8		8	5		3	
10	15	2	2	1	8		8		8	8			
14	34	2	7	4	8		8	1	7			8	
14	22	10	5	3	7	7		7	7				7
14	32	8	7	4	6		6	2	4			6	
14	20	10	7	5	4	4		2	2	3		1	
9	14	2	2	1	4		4		4	4			
10	15	2	1	1	4		4		4	4			
15	20	10	8	2	4	4			4		4		
13	14	6	5	4	3		3		3	3			
15	20	10	8	4	3	3		1	2			3	
13	31	6	5	5	2	2			2	2			
9	14	2	1	1	2		2		2	1		1	
9	15	2	2	1	2		2		2	2			
13	34	10	8	3	2	2			2		2		
14	36	8	7	4	2		2		2			2	
13	32	8	7	4	2		2		2			2	
9	15	2	1	3	2		2		2		1	1	
14	32	8	7	1	2		2	2					2
14	26	6	8	4	2		2		2				2
15	32	10	8	5	2	2			2				2
14	11	6	7	4	2		2		2	2			
13	20	7	8	2	2	2			2			2	
14	20	6	1	2	2	2		1	1			2	
10	15	3	1	1	2		2		2	2			
10	15	3	2	1	2		2		2	2			
14	20	10	8	2	2	2			2		2		
14	18	10	1	3	2	2			2		2		
15	20	10	1	2	2	2			2		2		

*VNTR, variable number tandem repeat; Aus-NZ, Australia and New Zealand; A, BHV-A; B, BHV-B; C, BHV-C; D, BHV-D; E, BHV-E.

A; it also raises an important clinical question: Are feline genotype II isolates belonging to group A nonpathogenic for humans? Genotype I isolates could represent the most pathogenic isolates for humans within a group of potentially zoonotic isolates, all belonging to group B and could represent an ultimate evolutionary step toward human infection. Additionally, within group B, the differences in the number of BHV-A repeat units observed between isolates from patients (humans, dog) versus cat isolates suggest that this specific VNTR could constitute a marker for the ability to cross the species barrier from reservoir cats to susceptible species, independent of the 16S rDNA genotype.

Acknowledgments

We thank Dorsey Kordick for providing cat isolates from North Carolina.

This work was supported by a grant from the Merial Company (grant no. 02TIC), National Institutes of Health grant R01 AI52813, a CA HIV/AIDS Research Program Award, and a Burroughs Wellcome Fund Clinical Scientist Award in Translational Research.

Ms Bouchouicha is a third-year doctoral student at the Unité Mixte de Recherche, Biologie Moléculaire et Immunologie Parasitaires et Fongiques, Maison-Alfort, France. Her research interests focus on the molecular epidemiology of animal diseases and zoonoses.

References

1. Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res.* 2005;36:383-410. DOI: 10.1051/vetres:2005009
2. Arvand M, Klose AJ, Schwantz-Porsche D, Hahn H, Wendt C. Genetic variability and prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Berlin, Germany, and analysis of its genetic relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic for humans. *J Clin Microbiol.* 2001;39:743-6. DOI: 10.1128/JCM.39.2.743-746.2001
3. Dillon B, Valenzuela J, Don R, Blanckenberg D, Wigney DJ, Malik R, et al. Limited diversity among human isolates of *Bartonella henselae*. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4691-9. DOI: 10.1128/JCM.40.12.4691-4699.2002
4. Birtles RJ, Laycock G, Kenny MJ, Shaw SE, Day MJ. Prevalence of *Bartonella* species causing bacteraemia in domesticated and companion animals in the United Kingdom. *Vet Rec.* 2002;151:225-9.

DISPATCHES

5. Chomel BB, Abbott RC, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kass PH, Glaser CA, et al. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2445-50.
6. Monteil M, Durand B, Bouchouicha R, Petit E, Chomel B, Arvand M, et al. Development of discriminatory multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for *Bartonella henselae*. *Microbiol.* 2007;153:1141-8.
7. Mauiyama S, Nakamura Y, Kabeya H, Tanaka S, Sakai T, Katsube Y. Prevalence of *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* and the 16S rRNA gene types of *Bartonella henselae* among pet cats in Japan. *J Vet Med Sci.* 2000;62:273-9. DOI: 10.1292/jvms.62.273
8. Chomel BB, Carlos ET, Kasten RW, Yamamoto K, Chang CC, Carlos RS, et al. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from the Philippines. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60:593-7.
9. Mauiyama S, Sakai T, Morita Y, Tanaka S, Kabeya H, Boonmar S, et al. Prevalence of *Bartonella* species and 16S rRNA gene types of *Bartonella henselae* from domestic cats in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65:783-7.
10. Viezens J, Arvand M. Simultaneous presence of two different copies of the 16S rRNA gene in *Bartonella henselae*. *Microbiology.* 2008;154:2881-6. DOI: 10.1099/mic.0.2008/018630-0
11. Bouchouicha R, Boulouis H-J, Benrich M, Monteil M, Chomel B, Haddad N. Comparison of the performances of MLVA versus the main other typing techniques for *Bartonella henselae*. *Clin Microbiol Infect.* In press.
12. Iredell J, Blanckenberg D, Arvand M, Grauling S, Feil EJ, Birtles RJ. Characterization of the natural population of *Bartonella henselae* by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5071-9. DOI: 10.1128/JCM.41.11.5071-5079.2003
13. Li W, Raouit D, Fournier PE. Genetic diversity of *Bartonella henselae* in human infection detected with multispacer typing. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1178-83.
14. Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Tappero JW, Sanchez MA, Koehler JE. Molecular epidemiology of *Bartonella henselae* infection in human immunodeficiency virus-infected patients and their cat contacts, using pulsed-field gel electrophoresis and genotyping. *J Infect Dis.* 2002;186:1733-9. DOI: 10.1086/345764
15. Arvand M, Feil EJ, Giladi M, Boulouis HJ, Viezens J. Multi-locus sequence typing of *Bartonella henselae* isolates from three continents reveals hypervirulent and feline-associated clones. *PLoS One.* 2007;2:e1346. DOI: 10.1371/journal.pone.0001346

Address for correspondence: Nadia Haddad, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7, Av du Général de Gaulle, 94704 Maisons Alfort CEDEX, France; email: nhaddad@vet-alfort.fr

The opinions expressed by authors contributing to this journal do not necessarily reflect the opinions of the Centers for Disease Control and Prevention or the institutions with which the authors are affiliated.

EMERGING INFECTIOUS DISEASES*

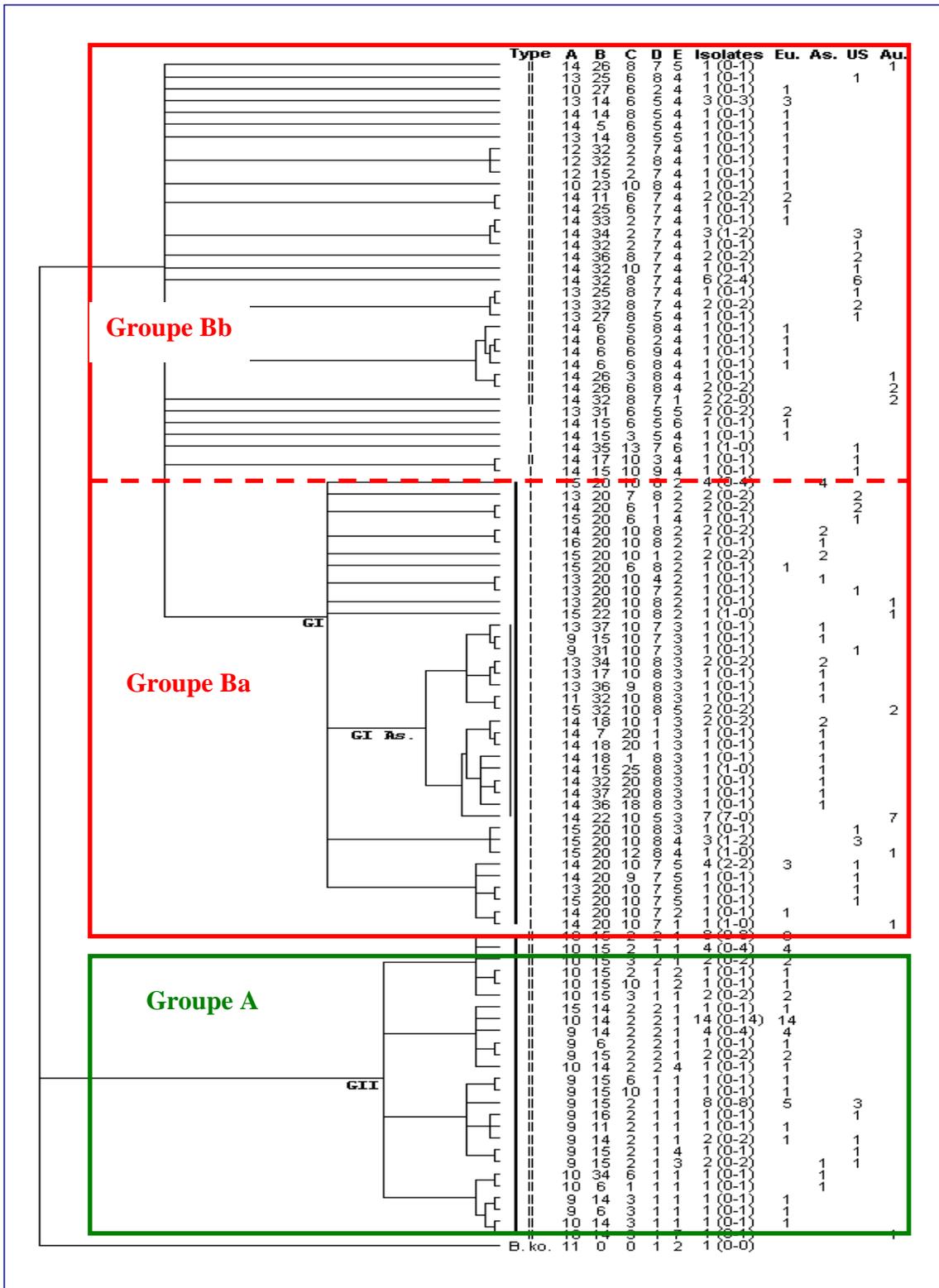


www.cdc.gov/eid

To subscribe online:
<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/subscribe.htm>

<input type="checkbox"/> Subscribe to print version <input type="checkbox"/> Unsubscribe from print version <input type="checkbox"/> Update mailing address
Number on mailing label: _____
Name: _____
Full mailing address: (BLOCK LETTERS) _____ _____ _____

Return:
 Email: eideditor@cdc.gov
 Fax: 404 639-1954
 or mail to:
 EID Editor
 CDC/NCID/MS D61
 1600 Clifton Rd, NE
 Atlanta, GA 30333



III. Etude d'isolats/souches issus de félidés sauvages :

Le but de cette étude était de tester la capacité de la technique MLVA à typer et à différencier des isolats de bartonelles autres que *B. henselae* issus des félidés sauvages libres ou captifs d'origine africaine ou américaine. Ce travail a permis d'enrichir notre base de données en matière de typage et de proposer certaines hypothèses expliquant les origines possibles des isolats testés.

A. Matériel biologique :

Les 24 isolats de *Bartonella* issus de félidés sauvages et testés dans cette étude issus de félidés se répartissent de la façon suivante:

- **Isolats d'origine californienne** : 4 isolats issus de pumas (*Felis concolor*) vivant en liberté, 7 isolats issus de lynx (*Lynx rufus*) vivant en liberté et 8 isolats issus de guépards (*Acinonyx jubatus*) vivant dans le zoo de San Diego.

- **Isolats d'origine africaine** : 2 isolats issus de guépards dont l'un vivait en liberté et l'autre en captivité et 3 isolats issus de lions (*Panthera leo*) vivant dans le parc Kruger.

Parmi ces 21 isolats, 5 appartiennent à l'espèce *B. henselae*, 15 sont considérés comme des « variantes » de *B. henselae* et un isolat a été identifié comme appartenant à l'espèce *B. koehlerae* (**Tableau 5**).

Dans cette étude, la souche de référence Houston I a été utilisée comme témoin positif.

Tous les échantillons ont été fournis sous forme d'ADN par Le Pr Bruno Chomel (université de Davis, Californie-USA).

B. Méthodes :

- Typage de la séquence codant pour l'ARN 16S :

L'amplification de la séquence codant pour l'ARN 16S a été réalisée en utilisant les couples d'amorces 16SF/BH1 et 16S/BH2 selon le protocole décrit par Bergmans *et al*, (1996), avec quelques modifications dans le protocole de PCR. Le programme de PCR utilisé a été le suivant :

Dénaturation initiale : 95°C pendant 3 minutes,
35 cycles avec : dénaturation : 95°C pendant 20 secondes ; hybridation : 56°C pendant 30 secondes ; extension : 72°C pendant 1 minute
Extension finale : 72°C pendant 10 minutes
Ce programme comporte 30 cycles et les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel à 2%.

C. Résultats :

C.1. Etude de la diversité :

Pour l'ensemble des isolats testés, la plupart des BHV ont pu être amplifiés aisément. Le tableau 5 montre que sur 24 isolats testés, 14 profils alléliques ont été obtenus.

Selon les hôtes (Lynx, Guépards, Lions et Pumas), le nombre de profils se répartit de la façon suivante : 6 profils/7 isolats (Lynx) ; 4 profils/10 isolats (Guépards) ; 3 profils/3 isolats (Lions) et 2 profils /4 isolats (Pumas).

Parmi les 24 isolats, 2 isolats (1036 et L-10-97) correspondant à des « variantes » de *B. henselae* présentent le même profil ; l'un (L-10-97) est issu d'un lynx californien vivant en liberté et l'autre (1036) d'un guépard californien capturé et vivant au zoo de San Diego, dans l'enceinte du Wild Safary Park.

Contrairement aux autres BHVs, l'amplification de la séquence de BHV-D n'a pas été possible chez 83% (12/18) de ces variantes. Ces dernières correspondent aux isolats issus de lynx et de guépards. On a également constaté que chez un isolat appartenant à ces variantes (L-08-96), BHV-C n'a pas pu être amplifié.

Toujours chez les variantes et parmi les VNTR qu'il a été possible d'amplifier systématiquement ou presque, BHV-B et BHV-C semblent être les moins polymorphes (avec 2 allèles pour chacun). En revanche, BHV-A et BHV-E apparaissent les plus polymorphes (6 allèles pour chacun).

N° d'isolat	Hôte	Origine géographique	Espèce de <i>Bartonella</i>	BHV A	BHV B	BHV C	BHV D	BHV E
H1	Human	USA	<i>B. henselae</i> Houston 1	14	20	10	7	5
98/215	lion	Afrique de Sud (Kruger Park)	<i>B. koehlerae</i>	11	0	0	1	1
150-41	lion	Afrique de Sud (Kruger Park)	<i>B. henselae</i>	8	14	3	1	1
7069				10	14	3	1	1
L-42-96	Puma	California (libre)	Variant de <i>B.h</i>	15	14	1	4	2
L-27-96				15	14	1	4	2
Ellie				15	14	1	4	2
Amanda			<i>B. henselae</i>	13	32	8	7	4
L-08-96	Lynx	California (libre)	Variant de <i>B.h</i>	12	14	0	0	3,5
L-10-97				14	14	1	0	3,5
L-11-96				13	14	1	0	5,5
L-17-96				14	14	1	0	5,5
DS-08				16	14	1	0	2
DS-507				13	14	1	0	5,5
SC-443			<i>B. henselae</i>	14	32	8	1	4
1023	Guepard	Californie (Zoo de San Diego)	Variant de <i>B.h</i>	16	14	1	0	5,5
1036				14	14	1	0	3,5
2326				16	14	1	0	5,5
2327				16	14	1	0	5,5
2328				16	14	1	0	5,5
5628				16	14	1	0	5,5
9192				16	14	1	0	5,5
9255				16	14	1	0	5,5
1178				Namibie (libre)	9,5	4	1	0
R19981		Zimbabwe (pet)	<i>B. henselae</i>	14	26	6	10	4

Tableau 5 : Profils MLVA des isolats issus de félinés sauvages

La diversité des souches a été évaluée par le calcul de la valeur globale de l'index de diversité (0.90) ainsi que par celle de sa valeur en fonction de l'espèce hôte (**Tableau 6**).

Hôte \ I.D	Espèce hôte			
	Lynx	Guépard	Lion	Puma
I.D (%)	0.97	0.53	1	0.5
I.D global (%)	0.90			

Tableau 6 : Etude de la diversité en fonction de l'hôte

C.2. Etude de la relation entre les différents isolats de félidés

sauvages :

Afin d'étudier les liens entre les 21 isolats de félidés sauvages, un dendrogramme a été élaboré. Ce dernier est raciné par l'isolat de *B. koehlerae* issu d'un lion africain, vivant dans le parc Kruger, dont le profil est un peu particulier. Ce dendrogramme permet de distinguer deux groupes : le premier englobe tous les isolats de *B. henselae* et le deuxième renferme l'ensemble de variantes de *B. henselae* (cf. figure 3).

D'après le dendrogramme, les variantes issues de pumas californiens forment un petit groupe à part et divergent des isolats issus de lynx et de guépards. Nous avons constaté également qu'un isolat variant de *B. henselae*, provenant d'un lynx namibien (NB 1178), vivant en liberté et caractérisé par un profil très différent des autres, occupait une position particulière. Cet isolat a permis de raciner l'ensemble des variantes.

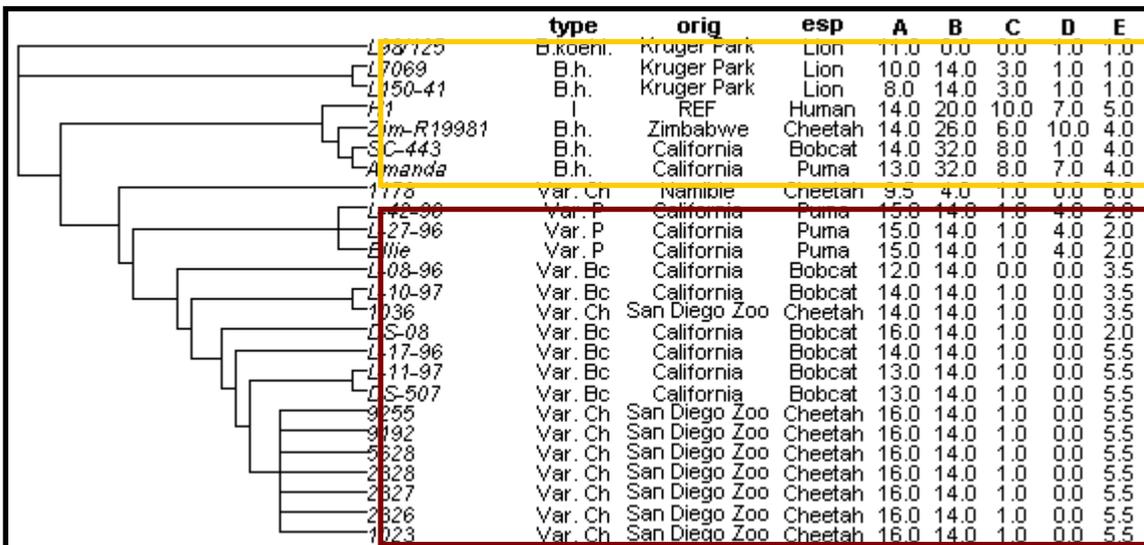


Figure 3 : Dendrogramme montrant la relation entre les différents isolats de félidés sauvages : en **jaune** les isolats de *B.henselae* et en **marron** les « variantes »

C.3. Etude des relations entre les isolats/souches de félidés sauvages, domestiques et les humains:

L'étude réalisée chez les félidés sauvages a montré que certains allèles rencontrés chez ces derniers semblent spécifiques, certains n'ayant pas été observés chez les félidés domestiques et les humains déjà testés. Afin d'étudier la relation entre les différents isolats, un dendrogramme regroupant l'ensemble des 178 isolats et souches antérieurement testés et les 20 isolats de félidés sauvages a été établi.

Le dendrogramme établi a permis de distinguer 3 groupes différents : A, B et C (**cf. figure 4**).

- Le groupe A n'est constitué que d'isolats et souches de génotype II. Il correspond au groupe A déjà identifié lors de l'étude menée sur les 178 isolats et souches de chats et d'humains. En plus de ces isolats et souches, 2 isolats de *B. henselae* issus de deux lions sauvages vivant dans le parc de Kruger et ayant de profils très proches (8-14-3-1-1 et 10-14-3-1-1) appartiennent à ce groupe.
- Le groupe B comporte 2 sous groupes, Ba et Bb, comme cela a déjà été décrit précédemment. Les 3 autres isolats de *B. henselae* isolés respectivement du lynx, du puma et du guépard sont localisés dans ce sous-groupe Bb. Le premier isolat californien issu d'un puma (Amanda) a un profil identique à celui d'un isolat provenant d'un chat domestique de Californie (518). Le deuxième isolat de Californie (SC- 443) et celui du Zimbabwe (Zim-R19981) diffèrent chacun par 2 VNTR (BHVD et BHV-E pour l'un et BHV-C et BHV-D pour l'autre) par rapport au profil des isolats d'humains et de chats les plus proches d'eux.
- Le groupe C, qui ne regroupe que les variantes de *B. henselae*, occupe une position particulière.

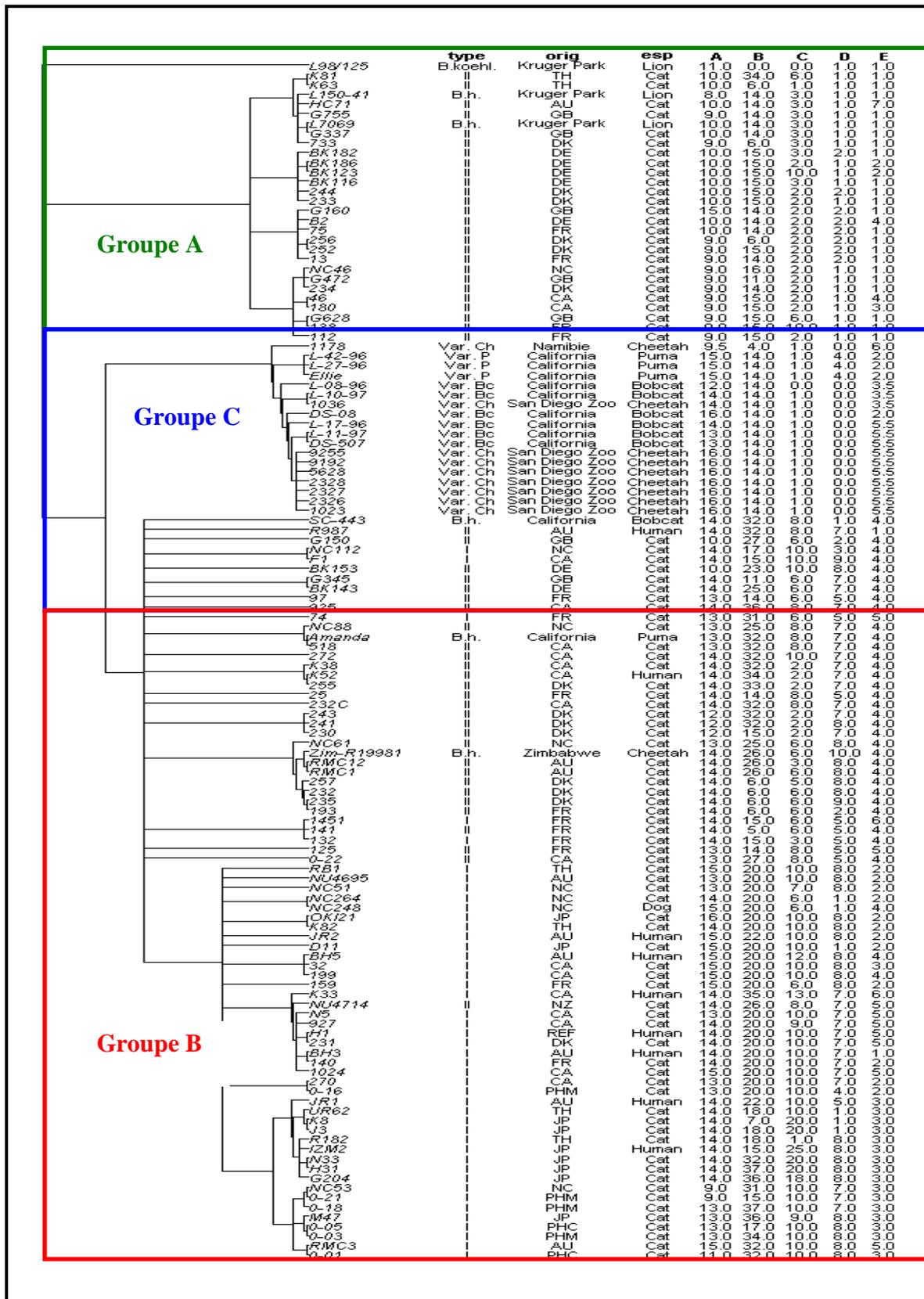


Figure 4 : Dendrogramme montrant la relation entre les chats, hommes, chien et félidés sauvages

D. Discussion et conclusion :

L'étude menée sur les félidés sauvages montre que la technique MLVA développée chez *B. henselae* est capable de typer des isolats proches de cette espèce et de les différencier les uns des autres. En effet, nous avons pu amplifier *B. koehlerae* avec au moins 3 VNTR. Ce résultat tend à confirmer l'existence d'un lien phylogénétique entre ces deux espèces comme cela a déjà été suggéré par d'autres auteurs (Pitulle *et al.*, 2002 ; Matar *et al.*, 1999) sur la base de gènes dédiés aux études phylogénétiques. Nous avons pu obtenir un haut niveau de polymorphisme traduit par le nombre de profils obtenus (14/24) après amplification de 24 isolats de *B. henselae* (5 isolats), de variants de *B. henselae* (18 isolats) et *B. koehlerae* (1 isolat) issus de félidés sauvages en captivité et en liberté. Cette diversité a été évaluée par le calcul de l'index de diversité qui est de 0.90. Cette valeur est inférieure à 0.95, valeur considérée comme le seuil à partir duquel l'index est considéré comme très élevé. Néanmoins, à l'échelle de notre série d'isolats, la valeur de 0.92 est très satisfaisante pour deux raisons : d'une part, le nombre d'isolats testés est très faible (20 isolats uniquement), et d'autre part et surtout cette série semble inclure des clusters d'isolats à profil identique, qui ont pour effet immédiat de réduire la valeur de l'I.D (2 clusters de 2 isolats, 1 cluster de 3 isolats et 1 cluster de 5 isolats). Comme déjà mentionné dans les résultats, sur les 14 profils obtenus d'isolats issus de félidés sauvages, la plupart sont originaux par rapport aux profils rencontrés antérieurement chez les félidés domestiques et chez l'Homme, et les profils des variantes issues de lynx et de guépards semblent caractéristiques de ces groupes d'isolats. En ce qui concerne les isolats appartenant à l'espèce *B. henselae*, trois d'entre eux (SC-443, Zim-R9981 et L-150-41) présentent un profil inédit, voire des allèles jamais rencontrés auparavant. En revanche, le profil de deux d'entre eux avait déjà été observé chez des chats domestiques. Le premier de ces deux profils, correspondant à l'isolat issu de puma Amanda, est identique à celui d'un isolat issu d'un félidé domestique (CT 518) de même origine géographique (Californie) et le deuxième, correspondant à l'isolat L-7069, issu d'un lion du parc Kruger, présente le même profil qu'un isolat issu d'un chat d'Angleterre

(G337). L'isolat du guépard en captivité au zoo de San Diego (1036) possède le même profil que celui d'un lynx (L-10-97) vivant en liberté à proximité du zoo. Or, des incursions de lynx à l'intérieur de l'enclos du Wild Safari Park où vivent les guépards du zoo ne sont pas à exclure, ce qui suggère la possibilité d'infection du guépard par le lynx par le biais des puces (plus probablement que le contraire, les animaux en liberté ayant plus de probabilité d'héberger des puces de façon permanente que les guépards en captivité). En ce qui concerne les isolats issus des pumas, nous avons remarqué que leurs profils sont originaux et identiques entre eux (formant un cluster). Il est intéressant de signaler que contrairement aux autres variantes, celles issues de puma ont pu être amplifiées avec BHV-D. Ceci permet de suggérer que ce profil apparemment unique est vraiment adapté à cet animal. Le dendrogramme montre aussi une bonne ségrégation des génotypes I/II ainsi qu'entre les isolats de *B. henselae* et les variantes.

L'ensemble de variantes formant le groupe C semblent être très adaptées à leurs hôtes puisque leurs profils sont spécifiques et ne sont pas rencontrés ailleurs. En outre, les résultats du typage de tous les isolats issus de félidés sauvages, basés sur l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S, montrent que ces derniers sont tous de génotype II. Ces résultats nous permettent de supposer que ce génotype est prédominant chez les souches de félidés sauvages. Par ailleurs, ils pourraient confirmer l'existence d'un lien phylogénétique entre *B. henselae* et ses variantes, et accréditer l'hypothèse du caractère non zoonotique de certains isolats de *B. henselae*, en particulier ceux du groupe A, qui sont tous de génotype II. Chez 83% des variantes (15/18), l'amplification de BHV-D n'a pas été possible, ce qui apparaît comme une sorte de signature chez ces variantes. Pour expliquer ces résultats, deux hypothèses sont envisageables : soit l'absence totale de ces séquences chez les isolats testés, soit la conservation de la séquence de BHV-D mais avec présence d'une mutation ayant pu induire un changement total ou partiel d'une des zones flanquantes ou des deux, empêchant ainsi la fixation du/des couple(s) d'amorces correspondant(s) et par suite leur amplification. Des investigations sont programmées pour tester ces hypothèses.

CHAPITRE IV: VNTR ET POUVOIR ZONOTIQUE

Différents auteurs envisagent l'existence d'une modulation de l'activité de certains gènes par des VNTRs polymorphes, que ce soit chez les eucaryotes ou les procaryotes (cf. Etude bibliographique, page 64).

Chez *B. henselae*, de telles séquences répétées sont présentes ; elles sont associées soit à des régions codantes soit à des régions intergéniques. Mais, d'après nos résultats ci-dessus (cf. chapitre 2, page 86), seule une faible proportion de ces VNTR semble polymorphes.

A ce jour, aucune étude ne s'est penchée à notre connaissance sur les facteurs susceptibles de moduler la sensibilité de l'homme (hôte sensible) par rapport au chat (hôte réservoir asymptomatique) vis-à-vis de *B. henselae*. Or, il est crucial de déterminer s'il existe un support chez l'hôte et/ou chez la bactérie de la réceptivité, de la sensibilité d'espèce et de la virulence.

L'objectif de ce travail est donc de contribuer à la compréhension des mécanismes d'adaptation des souches de *B. henselae* à leurs hôtes successifs, Homme et chats, et d'explorer le lien pouvant exister entre l'évolution du nombre d'unités de base et sa signification biologique, notamment sur le plan du pouvoir zoonotique et de la virulence et de la capacité à persister plus ou moins longtemps chez le chat, sous la forme d'une bactériémie.

Pour ce faire, nous nous sommes basés, d'une part sur les cinq principaux VNTR utilisés pour le typage de *B. henselae* et d'autre part sur des VNTRs dont nous avons recherché la présence dans des gènes déjà connus pour leur rôle dans la virulence.

I. Exploitation des données de typage obtenues pour 178 souches/ isolats avec les 5 VNTR :

A. Etude de la relation entre taille des VNTR et pouvoir zoonotique :

Comme déjà évoqué dans le chapitre 2 (cf. Applications épidémiologiques, page 107), le typage de 178 souches et /ou isolats par la technique MLVA a permis de classer les isolats et souches testés en deux grands groupes : un groupe A, qui ne contient que des isolats et souches recueillis chez le chat et un groupe B contenant tous les isolats et souches supposés zoonotiques, ainsi que certains isolats d'origine féline.

Les souches appartenant au groupe B, qu'elles proviennent de patients humains, des chats sains, ou d'un chien atteint d'endocardite, présentent un nombre d'unités de base (U.B.) plus élevé que celui des isolats du groupe A pour les 5 BHV (A, B, C, D et E) testés. Or la recherche de la localisation génomique de ces cinq BHV dans le génome de la souche de référence nous a permis de montrer que la majorité sont localisés dans des gènes dont la fonction n'est connue que pour BHV-D. Ce BHV est situé dans le gène qui code pour la protéine Arp (Acidic repeat protein), récemment identifiée par Litwin *et al* (2007). En outre, à l'exception notable de BHV-D, le GC% des 4 autres VNTR polymorphes (de 45% à 59%) est supérieur à celui du génome de *B. henselae*, qui est de 38%. Les différences observées dans le nombre d'U.B entre les différents groupes et sous-groupes, ainsi que les % de GC, sont présentées dans le **tableau 1**.

Groupe	Nombre souches	Nombre de copies d'U.B				
	178	BHV A	BHV B	BHV C	BHV D	BHV E
A (Isolats d'origine féline, non trouvés chez l'homme)	64	≤ 10	≤ 15	≤ 3	≤ 2	1
B (Isolats d'origine humaine + Isolats félines + Isolat canin)	114	≥ 13	≥ 15	≥ 6	≥ 5	≥ 2
B (Isolats d'origine humaine, dont H1)	21	14-15 (14)	15-35 (20)	6-25 (10)	5- 8 (7)	2-6 (5)
Fonction codante	Protéine Hypothétique	Protéine Hypothétique	Bactériophage related	Situé zone promotrice	Arp (Acidic Repeat Protein)	Protéine Hypothétique
% de GC		52	59	45	38	51

Tableau 1: Caractéristiques des répétitions des VNTR A à E des groupes A et B de *B. henselae*

B. Discussion :

L'étude de typage montre que les isolats et souches du groupe B, et en particulier ceux isolés chez l'homme, par rapport aux isolats et souches du groupe A (non trouvés chez l'homme) présentent un nombre plus élevé d'unités de base (tableau 2). Ceci nous amène à poser la question suivante : ces VNTR pourraient-ils jouer un rôle central sur la modulation de la sensibilité d'espèce et sur la virulence ?

Or, en étudiant la localisation de ces VNTRs, nous avons constaté qu'ils sont presque tous intragéniques ou localisés dans la zone promotrice d'un gène. Les VNTR intragéniques sont situés dans des gènes codant pour des protéines à fonction inconnue à l'exception de BHV-D qui est localisé dans le gène *arp*, qui code pour une protéine récemment identifiée comme immunodominante et associée à la membrane externe (Litwin *et al.*, 2007).

Ce BHV présente quasi-systématiquement un nombre plus élevé d'unités de base chez les isolats et souches du groupe B (≥ 5), isolés chez l'Homme. A l'inverse, chez les isolats et souches appartenant au groupe A, la taille de ce VNTR est toujours plus courte, avec un nombre d'U.B ≤ 2 . Ceci implique une différence pour la protéine d'au moins de 144 acides aminés (aa) entre les isolats/souches des groupe A et B. Ces résultats peuvent conduire à supposer qu'une taille minimale puisse être requise pour permettre à ces souches d'exercer leur pouvoir pathogène et donc contribuer à la virulence pour l'Homme. Les résultats obtenus par Harper *et al.* (2008) avec la protéine Arp de *Treponema pallidum*, proche de la protéine Arp de *B. henselae*, encouragent à explorer cette hypothèse.

En ce qui concerne les autres BHV (A, B, C et E), il est également frappant de constater que chez ces derniers, le nombre d'unités de base est plus élevé sauf exception chez les isolats et/ ou souches du groupe B que chez les isolats et/ ou souches du groupe A. En outre, nous avons constaté que pour BHV-A, les allèles 14 et 15 (copies) sont caractéristiques des isolats et des souches humaines, alors que les isolats et /ou souches félines du groupe A en ont soit 9 soit 10. Le GC% élevé de ces 4 autres VNTR, qui dépasse 50% pour BHV-A et E et atteint même 59% chez BHV-B, soit un différentiel de GC de 7% à 21%

par rapport au génome de *B. henselae*, suggère une acquisition exogène (d'ailleurs, la protéine codée par le gène contenant BHV-B est qualifiée de « bacteriophage-like »). Berglund *et al.* (2009), qui envisagent l'acquisition de gènes d'origine phagique nécessaires à l'adaptation des bartonelles des rongeurs à l'Homme va dans ce sens.

Au final, le profil des souches du groupe B se caractérise par le fait que la totalité ou la majorité des VNTR qui le composent ont un nombre élevé d'U.B., suggérant que si ces VNTR modulent l'activité de gènes intervenant dans le pouvoir zoonotique et/ou la virulence, ces gènes n'agissent pas seuls.

A ce jour, les isolats que nous avons testés sont peu nombreux (21 isolats humains dont un issu d'un chien souffrant d'endocardite). Bien de tels isolats soient très difficiles à obtenir pour les raisons explicitées auparavant, il serait utile d'obtenir de nouveaux isolats pour vérifier leur appartenance au groupe B, ce qui renforcerait notre hypothèse d'une implication des VNTR polymorphes dans le processus zoonotique et dans la virulence accrue de certaines souches de *B. henselae* (de génotype I) chez les immunodéprimés.

Ainsi, quatre nouvelles souches humaines (Marseille, Zim 4, Δ virB4 et Wt) ont pu être récemment intégrées au dendrogramme établi pour les 178 isolats/souches précédemment disponibles. Tout en présentant de nouveaux allèles et de nouveaux profils, elles se sont localisées également dans le groupe B, supposé zoonotique (données non présentées).

Si, avec l'ajout de ces nouvelles souches, nous ne pouvons pas confirmer que les VNTR utilisés dans le typage moléculaire jouent un rôle majeur dans le déterminisme du pouvoir zoonotique et de la virulence, nous pouvons attester que cette hypothèse se renforce de plus en plus. L'acquisition de nouvelles souches pourrait nous permettre de valider davantage cette hypothèse en, fournissant des résultats statistiquement significatifs et plus robustes.

Les résultats obtenus par Iredell *et al.* (2003) dans leur étude portant sur *B. henselae* et basée sur la technique MLST, technique phylogénétique de référence, les ont amenés à supposer que les souches de génotype I dérivent de celles de génotype II.

Cette hypothèse paraît plus logique, par le fait que le chat, réservoir naturel de *B. henselae*, héberge habituellement beaucoup plus souvent des souches de génotype II, alors que l'Homme, hôte accidentel et sensible, est infecté dans la plupart des cas par des souches de génotype I, surtout en cas de forme grave (endocardite, angiomatose et péliose bacillaires).

Notre étude, et notamment la distribution des souches dans le dendrogramme, conduit également à accréditer l'hypothèse de l'antériorité des isolats de *B. henselae* de génotype II par rapport aux isolats de génotype I. Cette hypothèse évolutive, si elle se confirme, implique l'expansion du nombre d'unité de base (U.B.) des VNTR polymorphes utilisés dans notre technique de typage.

L'existence de VNTR de grande taille chez les souches virulentes pour l'Homme pourrait s'expliquer par le fait que ceux-ci pourraient conférer à *B. henselae*, au travers de la modulation de l'expression des protéines dans les gènes au sein desquels ils se trouvent, un avantage adaptatif pouvant être associé à la virulence chez l'Homme et/ou l'échappement au système immunitaire le rendant capable de provoquer les symptômes caractéristiques déjà décrits chez l'Homme (Boulouis *et al*, 2005), ainsi qu'une persistance plus longue chez le chat.

II. Recherche de nouveaux VNTR polymorphes dans des gènes de virulence connus :

Nous avons testé le polymorphisme de VNTRs présents dans des gènes connus pour intervenir dans la virulence, afin de tenter de conforter l'existence d'une corrélation entre d'une part l'augmentation du nombre d'unités de base des VNTRs et d'autre part le potentiel zoonotique de *B. henselae*. Une partie de ce travail a été faite par un autre étudiant de notre équipe. En ce qui me concerne, je me suis intéressée à la recherche de séquences répétées d'une part dans la tête de la protéine Bad A (*Bartonella* adhesin A), qui joue un rôle d'adhérence lors de l'interaction de *B. henselae* avec les cellules endothéliales de l'hôte eucaryote, et d'autre part dans le gène *trw*, appartenant au système « Trw » qui est l'un de deux systèmes de sécrétion de type IV (SST4) les plus étudiés chez *B. henselae* (Schmid *et al.*, 2004, Dehio *et al.*, 2005). Le système

Trw est composé de 21 gènes colinéaires (*trwN* ; *trwL1-8*; *trwM*; *trwK*; *trwJ1*; *trwI1*; *trwH1*; *trwJ2*; *trwI2*; *trwH2*; *trwG*; *trwF*; *trwE* et *trwD*) codant pour 21 protéines ayant un rôle crucial dans la colonisation des érythrocytes et/ou dans la réplication intra érythrocytaire.

A. Matériel:

- 9 isolats/souches de *B. henselae* ont été utilisés pour tester le gène *trw*.
- 100 isolats et /ou souches de *B. henselae* ont servi pour tester *Bad A*

B. Méthodes :

1) Repérage des séquences répétées (VNTR) dans les gènes étudiés:

Nous avons utilisé le même logiciel qu'auparavant en modifiant quelques critères pour le choix des séquences répétées tels que :

- Taille de l'unité de base (U.B) variant de 3 pb à 300 pb,
- Pourcentage de conservation ≥ 80
- Nombre de copies dans le génome de la souche de référence ≥ 2 .

Le positionnement des gènes correspondants a été vérifié sur le site

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

2) Recherche des couples d' amorces: Les amorces dessinées sont accessibles en **annexe 5**.

3) Réalisation des réactions PCR :

Les réactions de PCR sont réalisées comme a été décrit précédemment (cf. partie 2, page 90) tout en testant deux ADN polymérases (Pfx Platinum Invitrogen et Takara Ex taq RR001).

C. Résultats:

En ce qui concerne le système Trw composé de 21 gènes colinéaires situés dans le dernier quart du génome, nous avons pu repérer 15 VNTRs, répartis comme suit :

- dans les gènes *trwL6*, *trwL8*, *trwI1* et *trwJ1* : deux VNTRs, respectivement *trwL6a* et *trwL6b* ; *trwL8a* et *trwL8b*; *trwI1a* et *trwI1b* et *trwJ1a* et *trwJ1b* ;

- dans les gènes *trwL4*, *trwL5*, *trwL7*, *TrwG*, *trwE*, *trwF* et *trwI2* : un seul seul VNTR pour chacun

Nous n'avons pas trouvé de séquences répétées dans les gènes *trwD*, *trwk*, et *trwM*.

Dans le gène codant pour la tête de Bad A, situé au début du génome, nous avons localisé deux VNTRs

Les caractéristiques de ces VNTRs sont présentées dans le **tableau 2**.

Nom VNTR	Nom gène	Rôle gène	Position dans le génome	Taille de l'U.B	Nombre copies	Séquence consensus
BadA V1	<i>Bad A</i>	adhérence	196976-202156	12	2.1	GATAAGAAATTT
Bad V2	<i>BadA</i>	adhérence	205378-214488	21	2.1	TTGAGAAGAAGGTACAGATA
<i>trwE</i>	<i>trwE</i>	SST4	1816257-1816293	18	2	GTAATAGAAGAACCAGAAA
<i>trwF</i>	<i>trwF</i>	SST4	1815567-1815576	4	2.5	AAAC
<i>trwG</i>	<i>trwG</i>	SST4	1815084-1815101	7	2.6	TTACAAG
<i>trwIa</i>	<i>trwI</i>	SST4	1811554-1811584	15	2.1	GCTTTCGAGGAAGCT
<i>trwIb</i>	<i>trwI</i>	SST4	1812025-1812047	11	2	TCGCACAGTCAA
<i>trwI2</i>	<i>trwI2</i>	SST4	1813628-1813658	15	2.1	GCTTTCGAGGAAGCT
<i>Trwj1a</i>	<i>trwJ1</i>	SST4	1810797-1810814	8	2.3	AAAGTGCA
<i>Trwj b</i>	<i>trwJ1</i>	SST4	1810914-1810931	9	2	CTATACGGT
<i>trwL4</i>	<i>trwL</i>	SST4	1805359-1805373	3	5	CTG
<i>trwL5</i>	<i>trwL</i>	SST4	1805669-1805678	4	2.5	ATTA
<i>trwL6a</i>	<i>trwL</i>	SST4	1806123-1806132	4	2.5	ATTA
<i>trwL6b</i>	<i>trwL</i>	SST4	1806157-1806178	9	2.4	ATTGCCGCA
<i>trwL7</i>	<i>trwL</i>	SST4	1806736-1806750	3	5	CTG
<i>trwL8a</i>	<i>trwL</i>	SST4	1807223-1807233	5	2.2	TTCTT
<i>trwL8b</i>	<i>trwL</i>	SST4	1807311-1807343	16	2.1	AGCAGCATATTATATT
<i>TrwN</i>	<i>trwN</i>	SST4	1803223-1803243	9	2.5	AACAGTCG

Tableau 2 : Caractéristiques des VNTR localisés dans les gènes *trw* et dans les gènes codant pour la tête de BadA

Les VNTRs présents dans les gènes *trw* se sont tous avérés monomorphes pour les 16 souches testées. Ces résultats ont été confirmés par le séquençage de certains amplifiats. En revanche, les séquences répétées du gène codant pour la tête de BadA apparaissent dimorphiques pour les 100 isolats et/ souches testés, mais 32 isolats/souches/100 possèdent le même allèle.

D. Discussion :

En ce qui concerne le gène *badA*, nous avons observé la présence de deux allèles sur un ensemble de 100 isolats et souches testés, mais la plupart d'entre elles 70% possèdent le même allèle et l'impact éventuel de ce dimorphisme très asymétrique n'est pas encore connu. En revanche, les VNTR localisés dans les différents gènes *trw* sont apparus monomorphes. Cependant, ce monomorphisme apparent n'a été observé que 16 isolats et souches testés. S'il devait se confirmer à l'échelle d'un nombre plus élevé de souches/isolats, ce monomorphisme pourrait être le reflet du rôle de ces gènes dans des processus vitaux pour tous les isolats et/ ou souches de *B. henselae*, pathogènes ou non, les protéines Trw étant cruciales pour l'induction d'une bactériémie chez l'hôte. Par ailleurs, pour les gènes *trw*, la similitude de certaines séquences VNTR entre elles ainsi que la similitude entre les séquences entières des gènes qui les hébergent pourrait laisser supposer des duplications anciennes des VNTRs et/ou des gènes concernés, qui auraient ensuite divergé, peut-être pour permettre la fixation de *B. henselae* à différentes populations de globules rouges chez différentes espèces et différents hôtes au sein de ces espèces. La localisation de ces VNTR dans le dernier quart du génome témoigne une fois de plus de la grande plasticité du génome de *B. henselae* et en particulier de cette partie, qui favorise la duplication des structures répétées, notamment celles situées dans des gènes de virulence, contribuant possiblement à la modulation de leur expression, comme semble en témoigner le cas de *arp*. Il est intéressant de noter que chez *E. ruminantium*, autre α -protéobactérie, la deuxième moitié du génome est moins stable que la première (Frutos *et al*, 2006).

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

B. henselae est une bactérie gram négative, appartenant à la classe des alpha Protéobactéries qui regroupe quinze familles¹. Ces bactéries ont des relations privilégiées avec les cellules de l'hôte eucaryote (mammifères, arthropodes, plantes...), puisqu'elles sont soit intracellulaires facultatives, soit intracellulaires strictes. La plupart d'entre elles, et en particulier celles qui sont pathogènes pour les mammifères, se caractérisent par un génome de petite taille, variant de 1 à 3 Mpb et un pourcentage de GC inférieur à 40% à l'exception du genre *Anaplasma* dont le GC% est de 49%. Le faible taux de C+G est souvent lié à un mode de vie parasitique ou symbiotique. En ce qui concerne *B. henselae*, la taille du génome est de 1,9 Mpb et son % de GC est de 38%.

Les alpha protéobactéries ont été considérées jusqu'à une époque récente comme essentiellement issues des populations clonales et comme présentant relativement peu des transferts horizontaux. Ce processus biologique représente une importante source de diversité chez les bactéries mais sa fréquence est variable d'une classe bactérienne à une autre. Depuis peu, chez les bartonelles, de tels mécanismes de transfert sont signalés ou suspectés. Il peut s'agir de transferts intra-espèces, comme chez *B. henselae* (Arvand *et al*, 2007) ou *Ehrlichia ruminantium* (Hughes *et al*, 2007), mais aussi de mécanismes induisant une plus grande variabilité. Ainsi, le récent article de Berglund *et al* (2009) révèle la présence, chez une bartonelle des rongeurs, *B. grahamii*, de segments génomiques capables d'être réencapsidés dans des phages, et qui sont homologues à certains facteurs de virulence majeurs chez les bartonelles pathogènes pour l'Homme. Cependant, les phages obtenus à partir de *B. henselae* et *B. quintana* n'étaient pas fonctionnels. Ce mécanisme

¹ *Anaplasmataceae*, *Bartonellaceae*, *Beijerinckiaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Brucellaceae*, *Caulobacteraceae*, *Holosporaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Methylocystaceae*, *Rhizobiaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Rhodospirillales*, *Rickettsiaceae* et *Sphingomonadaceae*

interviendrait dans l'aptitude des bactéries de rongeurs à s'adapter à de nouveaux hôtes, notamment humains, ce qui peut laisser supposer qu'il aurait pu intervenir il y a longtemps mais ne serait plus nécessaire chez ces espèces. Chez diverses alpha protéobactéries, et notamment *B. henselae*, des mécanismes d'adaptation liés à l'évolution du génome à l'échelle de la cellule bactérienne restent donc à l'ordre du jour, par le biais de recombinaisons, d'insertions, de délétions, de mutations ponctuelles ou de duplication de segments d'ADN, surtout lors de la division cellulaire des bactéries, permettant ainsi de contribuer à la genèse de la diversité des souches. Les structures répétées de type VNTR sont réputées intervenir à ce niveau. Ces phénomènes sont susceptibles de jouer un rôle d'autant plus important dans la genèse de diversité que les transferts horizontaux sont encore réputés peu fréquents. C'est la raison pour laquelle il était intéressant de se pencher sur le rôle potentiel des VNTR chez *B. henselae* et sur leur utilisation comme outil de typage dans un contexte supposé *a priori* clonal.

Cependant, le taux de séquences répétées dans les génomes bactériens est variable d'un agent à un autre. Ainsi, chez *B. henselae*, les séquences répétées de type minisatellites (UB > 9) représentent 4% de la taille totale du génome, ce qui est élevé par rapport à certaines bactéries du groupe des gamma protéobactéries, comme *Klebsiella* (1.4%). En revanche, cette proportion est faible par rapport à d'autres alpha protéobactéries. Ainsi, chez *E. ruminantium*, ce pourcentage dépasse 8% (). Ceci pourrait expliquer, d'une part, le faible nombre de candidats VNTRs présents dans le génome de *B. henselae* et d'autre part la rareté des séquences répétées polymorphes chez cette espèce. Malgré ces obstacles, l'étude que nous avons menée dans notre laboratoire était très intéressante pour plusieurs raisons :

-Tout d'abord, elle nous a permis de développer un outil de typage moléculaire simple, facile à utiliser, standardisable, transférable d'un laboratoire à un autre et surtout accessible à tous les laboratoires équipés simplement d'un thermocycleur et de cuves d'électrophorèse. Nous avons ainsi pu développer, dans notre laboratoire, la technique MLVA qui est fondée sur 5 VNTRs sélectionnés sur la base de leur polymorphisme (A, B, C, D et E).

Ces 5 VNTRs polymorphes sont tous localisés sur le dernier quart du génome. Leur position physique représentait donc *a priori* un inconvénient réel puisqu'elle ne semblait pas à même de refléter la variabilité génomique globale des souches et plus particulièrement ce qui est susceptible de se passer en matière de polymorphisme dans la partie en amont de cette zone. En fait, il s'est avéré qu'au moins pour les minisatellites, le polymorphisme était essentiellement localisé dans cette partie du génome.

En outre, en nous basant sur les 5 principaux VNTRs, nous avons pu révéler une grande diversité de souches de *B. henselae*, même à l'échelle d'un nombre limité d'isolats et souches provenant de 10 pays du monde. Cette diversité est traduite par un nombre élevé de profils, qui atteint 102 sur un total de 182 isolats/souches testés, ce qui témoigne du pouvoir discriminant de l'outil de typage utilisé. Cette diversité paraît importante malgré le manque de représentativité de l'échantillonnage (échantillons issus d'une zone géographique limitée, nombre limité d'échantillons d'origine humaine...). La diversité de souches de *B. henselae* a été également évaluée par d'autres auteurs avec d'autres techniques de typage mais avec des souches dont une partie était commune avec celles que nous avons typées.

D'après le dendrogramme, la répartition des isolats et/ ou des souches de *B. henselae* en groupes (A & B) et sous groupes (Ba & Bb) révèle certaines tendances :

- **Premièrement**, géographiques, traduites par le fait que certains isolats et souches de même origine ou d'origine proche sont groupés ensemble ; c'est le cas par exemple des isolats d'origine asiatique (Japon, Thaïlande et Philippines) dont 90% sont situés dans le groupe B et plus particulièrement dans le sous groupe Ba. En outre, le dendrogramme montre que 95% des isolats d'origine australienne testés sont également regroupés au sein du groupe B. Une telle corrélation entre la proximité géographique d'isolats et leur appartenance à un même complexe clonal a souvent été décrite dans la littérature pour différents agents pathogènes typés par MLST (Davinson *et al.*, 2003 ;Bain *et al.*, 2007) Cependant, une telle corrélation n'a pas toujours été observée dans notre étude ; ainsi, les isolats et souches européens sont

répartis de façon inégale entre les deux groupes (70% dans le groupe A et 30% dans le groupe B).

- **Deuxièmement**, en fonction de leur espèce hôte (féline & humaine) et de la suspicion de leur caractère zoonotique, toutes les souches humaines testées étant situées dans le groupe B supposé avoir un potentiel zoonotique. Ces isolats et souches sont dans la plupart des cas associés à des maladies humaines telles qu'angiomatose bacillaire et endocardite. A l'inverse, aucun des isolats et souches formant le groupe A n'est d'origine humaine, ce qui nous a amenés à supposer qu'elles pourraient être non zoonotiques, hypothèse également formulée indépendamment par Iredell *et al* (2003) et Arvand *et al* (2007), sur la base de la technique MLST, technique de référence pour la phylogénie. Bien que l'échantillonnage ne soit pas représentatif et soit de taille limitée, ces résultats ont été corroborés par ceux obtenus par d'autres auteurs avec des souches en partie communes et avec d'autres techniques : MLST, MST et PFGE. En particulier, la correspondance des résultats MLVA et MLST pour les souches communes permet de considérer comme fiable la technique MLVA pour la phylogénie, au moins à l'échelle des groupes. L'hypothèse d'une antériorité du génotype II par rapport au génotype I a été également supposée par d'autres auteurs (Iredell *et al.*, 2003).

Différents éléments suggèrent par ailleurs un rôle possible des VNTR polymorphes que nous avons utilisés pour le typage dans le pouvoir zoonotique et/ou la virulence, d'une part, la localisation intragénique de certains VNTR et plus particulièrement de BHV-D, notamment dans un gène codant pour des protéines de surface (cas de *arp*, dans lequel est situé BHV-D), et d'autre part, la taille plus courte des souches amplifiées par ce VNTR observée dans le groupe ne contenant aucune souche humaine (Groupe A). Des résultats récents suggèrent que chez les souches du groupe A, la protéine Arp ne serait d'ailleurs pas exprimée (M. Berrich, communication personnelle).

En revanche, des souches contenant plusieurs copies d'U.B et donc caractérisées par une taille plus longue sont dans la majorité des cas associées à des atteintes graves chez leur hôte (Homme) mais rarement chez le chat. Ceci nous a conduits à supposer que le nombre d'U.B. pourrait jouer un rôle clé

dans la structure, et par conséquent dans la fonction de cette région. Le changement du nombre de ces séquences répétées et notamment la diminution du nombre d'U.B. pourrait occasionner une perte du pouvoir zoonotique, dans le cas où ces répétitions interviendraient dans les interactions entre *B. henselae* et le système immunitaire de l'hôte et/ ou dans des mécanismes de virulence. Le fait que Arp chez la souche de référence H1 (7 U.B. pour BHV-D) soit une protéine immunodominante amène à s'interroger sur les effets de la réduction du nombre d'U.B. chez les souches du groupe A (1 à 2 U.B.), voire aux effets de la non expression probable de cette protéine. On pourrait ainsi spéculer sur une plus grande persistance du génotype II par rapport au génotype I chez le chat liée à une plus faible stimulation du système immunitaire et d'autre part sur la capacité du génotype I, considéré comme plus virulent chez l'Homme, à s'implanter particulièrement chez les personnes immunodéprimées, en lien possible avec leur incapacité à développer une réponse immunitaire efficace, ce qui permettrait à ce génotype d'exercer alors son potentiel pathogène et de provoquer chez eux des formes graves telles que l'angiomatose et péliose bacillaires.

Ce polymorphisme et son lien avec des propriétés biologiques pourrait ne pas être sans rapport avec le positionnement des VNTR et des gènes correspondants dans le dernier ¼ du génome. Ainsi, une partie au moins des gènes de la famille *trw*, qui est localisée dans cette zone, semble provenir de duplications de VNTR ancestraux qui auraient ultérieurement dégénéré, conférant à chacun des gènes *trw* une fonction différente, en lien avec la capacité à coloniser les érythrocytes.

Par ailleurs, le fait que pour certains VNTR intragéniques polymorphes, le GC% soit très supérieur à celui du génome de *B. henselae* pourrait suggérer une origine exogène, souvent en lien avec un avantage adaptatif.

De nombreuses questions restent cependant sans réponse. Certaines d'entre elles, notamment celles portant sur le rôle du VNTR présent dans Arp, et sur l'effet de la variation du nombre d'U.B. de ce VNTR sur la fonctionnalité de cette protéine, sont en cours d'investigation. Ainsi, des études fonctionnelles *in vivo* et *in vitro* sont nécessaires pour confirmer la capacité des souches de *B.*

henselae, caractérisées par un plus faible nombre d'U.B. de BHV-D, à induire ou non une réponse immunitaire protectrice chez l'Homme et/ou intervenant dans la clairance de la bactérie chez le chat réservoir.

D'autres pistes méritent d'être explorées afin d'élucider de façon globale le rôle des séquences répétées qui reste encore mal compris, surtout chez les procaryotes.

Ainsi, pour revenir à *B. henselae*, l'identification du rôle des autres protéines dont la fonction reste hypothétique et dans lesquelles nos autres VNTR polymorphes sont localisés, pourrait apporter dans l'avenir de nouveaux éléments permettant de mieux comprendre ce(s) rôle(s) des VNTR en général.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de cette thèse, nous avons réussi à mettre au point un outil de différenciation moléculaire performant, simple et transférable pour *B.henselae*, basé sur la technique MLVA. Cet outil est caractérisé par le degré élevé de polymorphisme conféré par la combinaison des 5 VNTRs sélectionnés (I.D.=0.98). Ceci nous a permis d'étudier la diversité des souches et/ou isolats de *B. henselae* d'origine féline et humaine provenant de différentes régions du monde.

Le dendrogramme que nous avons obtenu révèle une distribution des souches/isolats en deux groupes distincts et robustes, traduisant une structure de type à tendance clonale, au sein de laquelle la population évolue. Cette structure en deux groupes apparaît robuste, malgré la piètre qualité de l'échantillonnage (manque de représentativité pour la plupart des échantillons testés). Le manque d'isolats d'origine humaine constitue à ce niveau un handicap important, mais de tels isolats sont très rares.

En outre, l'étude réalisée sur les paires Homme/chats montre que ces VNTR constituent un outil très fin d'étude de traçabilité.

- La comparaison des performances de la technique MLVA *versus* les techniques MLST, MST et ECP déjà développées chez cette espèce montre que la technique MLVA est plus discriminante. Elle est également plus stable que la technique d'ECP. Cette comparaison nous a permis dans la plupart des cas de retrouver facilement la correspondance entre les groupes /lignages/clusters établis avec les autres techniques de typage, sur la base des isolats/souches communs. La technique MLVA semble être adaptée, à la fois à des études de macro-évolution (validation des résultats MLVA par MLST, technique de référence pour les études phylogénétiques) qu'à des études de micro-évolution (concordance entre données MLVA et données du terrain dans le cadre d'une étude de traçabilité de l'infection entre des chats et leur maître).
- Le typage de 178 isolats/souches, en dépit du manque de représentativité de l'échantillonnage, fait apparaître une association entre certains marqueurs et

certaines localisations géographiques, à l'échelle continentale. La séparation entre génotypes I/II est par ailleurs complète. Mais ces résultats méritent d'être validés à une plus grande échelle.

Les informations fournies par l'étude de ces 178 isolats/souches tendent à conforter, après d'autres auteurs, l'hypothèse du caractère non zoonotique de ceux appartenant au groupe A, contrairement à ceux du groupe B. Le fait que les cinq VNTR polymorphes utilisés pour le typage soient intragéniques ou localisés dans la zone promotrice de gènes et qu'ils comportent un nombre plus élevé d'unités de base chez les isolats d'origine humaine conduit à envisager que ces VNTR pourraient contribuer, en modulant l'expression de ces gènes, à leur pouvoir infectieux et à leur virulence chez l'Homme.

-C'est pourquoi, outre la nécessité d'élargir le typage MLVA à d'autres souches/isolats issus d'autres pays et régions du monde (Pologne, Algérie...), et celle d'enrichir les données de typage concernant les isolats d'origine humaine, nos principales perspectives portent sur l'approfondissement du rôle des VNTR intragéniques dans la biologie des différentes souches de *B. henselae* chez le chat, ainsi que dans la virulence chez l'Homme et le pouvoir zoonotique. Notre attention va particulièrement se focaliser sur BHV-D, présent dans le gène *arp*, car la protéine Arp est la seule dont la fonction soit en partie connue. Il est assez frappant de noter, que les variantes de *B. henselae* issus de félinés sauvages, qui sont typables pour les autres VNTR, ne permettent pas d'amplifier BHV-D pour certains d'entre eux. Or, chez *B. henselae*, les travaux en cours dans notre laboratoire tendent à montrer que le gène *arp* chez les souches du groupe A, ne comporte que 1-2 copies de BHV-D, et surtout ne pourrait être exprimé. Après clonage et expression de la protéine totale (lorsqu'elle s'exprime) et de certains fragments de cette protéine, des expérimentations vont donc être menées *in vitro* et *in vivo* (chez la souris et le chat), pour évaluer les activités biologiques de Arp et de ses différents segments, ainsi que l'influence sur ces activités du nombre d'U.B. de BHV-D. En particulier, les études *in vitro* pourraient permettre d'explorer le rôle éventuel de Arp dans l'adhérence aux macrophages humains vs félins et si cette hypothèse se confirmait, de rechercher si cette adhérence est conditionnée par

le nombre d'U.B. Ceci pourrait contribuer à expliquer pourquoi seules les souches de génotype I, porteuses d'un nombre élevé d'U.B., sont associées aux formes graves d'angiomatose bacillaire. *In vivo*, sera notamment exploré le pouvoir immunogène de Arp, et des peptides exprimés à partir de différents segments de Arp, notamment la partie NH2-terminale et les peptides correspondant à différentes tailles de BHV-D.

REFERENCES

REFERENCES

- Aanensen, DM., Spratt, BG.** (2005) The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* 33(Web Server issue):W728-33.
- Abbott, R.C., Chomel, B.B, Kasten, R.W, Floyd-hawkins, K.A, Kikuchi, Y, Koehler, J.I and Perderson, N.C.** (1997) Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in cats. *Comp.Immunol.Microbiol.Infect.Dis.*20(1):41-57.
- Ablordey, A., Swings, J. Hubans, C., Chemlal, K., Loch, C., Portaels, F. Supply, P.** (2005) Multilocus variable-number tandem repeat typing of *Mycrobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol.* 43 : 15466-51.
- Arbeit, R. D.** (1995) Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms, p. 190–208. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Achtman, M., Morelli, G., Zhu, P., Wirth, T., Diehl, I., Kusecek, B., Vofler, A.J., Wagner, D.M., Allender, C.j., Easterday, W.R., Chenal-Francisque, V., Worsham, P., Thomson, N.R., Parkhill, J., Lindler, L.E., Carniel, E. Keim, P.** (2004) Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*101:17837-42.
- Achtman M, Wagner M.** (2008) Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Microbiol.* 6(6):431-40.
- Allred, D. R., McGuire, T. C., Palmer, G. H., Leib, S. R., Harkins, T. M., McElwain, T. F and Barbet. A. F** (1990) Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:3220-3224.
- Allerberger, F., Schönbauer, M., Zangerle, R., Dierich, M.** (1995) Prevalence of antibody to *Rochalimaea henselae* among Austrian cats. *Eur J Pediatr.* 154(2):165.
- Al-Majali A.M.** (2004) Seroprevalence of and risk factors for *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* infections among pet cats in Jordan. *Prev. Vet. Med.* 64: 63–71.
- Al-Soud, W. A., Johnson, L. J and Radstrom, P.** (2000) Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J. clin. Microbiol.* 38:345-350.
- Anderson, B.E., Neuman, M.A.** (1997) *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* 10:203-19.
- Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, CC., 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.* 26:6-38.
- Arvand, M., Feil EJ., Giladi M, Boulouis, HJ., Viezens, J.** (2007) Multi-Locus Sequence Typing of *Bartonella henselae* Isolates from Three Continents Reveals Hypervirulent and Felin -Associated Clones. *PLoS ONE* 2: e1346.

- Arvand, M., Mielke, M.E., Sterry, K., Hahn, H.** (1998) Detection of specific cellular immune response to *Bartonella henselae* in a patient with cat scratch disease. *Clin Infect Dis.* **27**(6):1533-4.
- Arvand, M., Klose, A. J., Schwartz-Porsche, D., Hahn, H. & Wendt, C.** (2001) Genetic variability and prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Berlin, Germany, and analysis of its genetic relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic for humans. *J Clin Microbiol.* **39**:743-746.
- Arvand, M., Schäd, S.G.** (2006) Isolation of *Bartonella henselae* DNA from the peripheral blood of a patient with cat scratch disease up to 4 months after the cat scratch injury. *J Clin Microbiol.* **44**(6):2288-90.
- Arvand, M., Viezens, J.** (2007) Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing for the analysis of clonal relatedness among *Bartonella henselae* isolates. *Int J Med Microbiol.* **297**:255-262.
- Asano, T., Ichiki, K., Koizumi, S., Kaizu, K., Hatori, T., Fujino, O.** (2010) High prevalence of antibodies against *Bartonella henselae* with cervical lymphadenopathy in children. *Pediatr Int.*
- Avidor B., Graidy M., Efrat G., Leibowitz C., Shapira G., Schattner A., Zimhony O., Giladi, M.** (2004), *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3462–3468.
- Bain, JM., Tavanti, A.,A. Davidson, D., Jacobsen, MD., Shaw, D. Gow, AR., Odds, FC.** (2007) Multilocus Sequence Typing of the Pathogenic *Fungus Aspergillus fumigatus*. *Journal of clinical Microbiology.* **45**(5):1469-1477.
- Baneth, G., Kordick, D.L., Hegarty, B.C., Breitschwerdt, E.B.** (1996) Comparative seroreactivity to *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* among cats from Israel and North Carolina. *Vet. Microbiol.* **50**: 95-103.
- Barka, N.E., Hadfield, T., Patnaik, M., Schwartzman, W.A., Peter, J.B.** (1993) EIA for detection of *Rochalimaea henselae*-reactive IgG, IgM, and IgA antibodies in patients with suspected cat-scratch disease. *J Infect Dis.***167**(6):1503-4.
- Barka, N.E., Hadfield, T., Patneck, M., Schartzman, W.A., Peter, J.B.** (1994) EIA for detection of *Rochalimea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. *J Clin Microbiol.* **34**: 942-8.
- Barnes, A., Bell, S.C., Isherwood, D.R., Bennett, M., Carter, S.D.** (2000) Evidence of *Bartonella henselae* infection in cats and dogs in the United Kingdom. *Vet. Rec.* **147**: 673-677.
- Baron, A.L., Steinbach, L.S., LeBoit, P.E., Mills, C.M., Gree, J.H., Berger, T.G.** (1990) Osteolytic lesions and bacillary angiomatosis in HIV infection: radiologic differentiation from AIDS- related Kaposi sarcoma. *Radiology* **177**: 77-81.
- Barros, P., Blanco, M.G., Boán, F., Gómez-Márquez, J.** (2008) Evolution of a complex minisatellite DNA sequence. *Mol Phylogenet Evol.* **49**(2):488-94.
- Barton, A.L.** (1909) Description de elementos endoglobulares en los fermentos de fiebre de verruga. *Cron Med Lima.* **26** :7.
- Bass, J.W., Vincent, J.M. and Person, D.A.** (1997) The expanding spectrum of Bartonella infections : Batonellosis and trench fever. *Pediatr Infect Dis J.* **16**(1): 2-10.

- Ben-Ami, R., Ephros, M., Avidor, B., Katchman, E., Varon, M., Leibowitz, C., Comaneshter, D., Giladi, M.** (2005) Cat-scratch disease in elderly patients, *Clin Infect Dis.* **41**(7):969-74.
- Benson, G.** (1999) Tandem repeats finder : a program to analyse DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **27**:573-580.
- Bereswill, S., Hinkelmann, S., Kist, M., Sander, A.** (1999) Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the ribC gene for differentiation of Bartonella species by PCR. *J Clin Microbiol.* **37**(10):3159-66.
- Bergh, K., Bevanger, L., Hanssen, I., Loseth, K.** (2002) Low Prevalence of *Bartonella henselae* infections in Norwegian domestic and feral cats. *APMIS.* **110**:309-314.
- Berglund, EC., Frank, AC., Calteau, A., Vinnere, Pettersson, O., Granberg, F., al.** (2009) Run-Off Replication of Host-Adaptability Genes Is Associated with Gene Transfer Agents in the Genome of Mouse-Infecting *Bartonella grahamii*. *PLoS Genet* **5**(7): e1000546. doi:10.1371/journal.pgen.1000546.
- Bergmans, A. M., de Jong, C. M., van Amerongen, G., Schot, C. S. & Schouls, L. M.** (1997). Prevalence of Bartonella species in domestic cats in the Netherlands. *J Clin Microbiol.* **35**:2256-2261
- Bergmans, A. M., Schellekens, J., van Embden, J. & Schouls, L. M.** (1996). Predominance of two *Bartonella henselae* variants among catscratch disease patients in the Netherlands. *J Clin Microbiol.* **34**:254-260.
- Bermond, D., Boulouis, H.J., Heller, R., Van Laere, G., Monteil, H., Chomel, B.B., Sander, A., Dehio, C. and Piemont, Y.** (2002) *Bartonella bovis* sp. nov. and *Bartonella capreoli* sp. nov., isolated from European ruminants. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**(2):383-90.
- Bessen, D., Jones, K. F and Fischetti, V. A.** (1989) Evidence for two distinct classes of streptococcal Mprotein and their relationship to rheumatic fever. *J. Exp. Med.* **169**:269-283.
- Birtles, R.J., Harrison, T.G., Saunders, N.A. and Molyneux, D.H.** (1995). Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* **45**(1):1-8.
- Birtles, R.J., Harrison, T.G., Taylor, A.G.** (1993) Cat scratch disease and bacillary angiomatosis: aetiological agents and the link with AIDS. *Commun Dis Rep CDR Rev.* **16**:3(8):107-10.
- Birtles, R.J., Hazel, S., Bown, K., Raoult, D., Begon, M., Bennett, M.** (2000) Subtyping of uncultured bartonellae using sequence comparison of 16 S/23 S rRNA intergenic spacer regions amplified directly from infected blood. *Mol Cell Probes.* **14**(2):79-87.
- Birtles, R.J., Laycock, G., Kenny, M.J., Shaw, S.E., Day, M.J.** (2002) Prevalence of Bartonella species causing bacteraemia in domesticated and companion animals in the United Kingdom. *Vet Rec.* **151**:225-9.
- Birtles, R.J., Raoult, D.** (1996) Comparison of partial citrate synthase gene (gltA) sequences for phylogenetic analysis of Bartonella species. *Int J Syst Bacteriol.* **46**(4):891-7.

- Blanco, Ramos, J., Oteo, Martinez, V., Ramalle, E., Garcia, A., Ibarra, V., Rosel, L.**(1999) Seroepidemiology of Bartonella henselae infection in HIV-infected patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 17:434-438.
- Bolin, I., Norlander, L., Wolf-Watz, H.** (1982) Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun*. 37: 506-512.
- Botterel, F., Desterke, C., Costa, C., Bretagne, S.** (2001) Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *J Clin Microbiol*. **39**(11):4076-81.
- Boyd, E.F., Wang, F.S., Whittam, T.S. et Selander, R.k.**(1996). Molecular genetic relationships of the salmonellae. *Appl. Environ. Microbiol*. 62: 804-08.
- Boulouis, HJ., Marignac, G., Haddad, N., Maillard, R., Chomel, B.** (2008). les animaux reservoirs et victimes des BARTONELLA. *Bull. Acad. Vét. France- Tome 161 - N°3* www.academie-veterinaire-defrance.org/
- Branley, J., Wolfson, C., Waters, P., Gottlieb, T., Bradbury, R.** (1996), Prevalence of *Bartonella henselae* bacteremia, the causative agent of cat scratch disease, in an Australian cat population. *Pathology*. 28: 262-265.
- Breitschwerdt, E.B., Atkins, C.E., Brown, T.T., Kordick, D.L., Snyder, P.S.** (1999) *Bartonella vinsonii* subsp. *Berkhoffii* and related members of the alpha subdivision of the Proteobacteria in dogs with cardiac arrhythmias, endocarditis, or myocarditis. *J Clin Microbiol* 37:3618-3626.
- Breitschwerdt, E.B., Hegarty B.C., Hancock S.I.** (1998) Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *J.Clin. Microbiol*.36: 2645-2651.
- Breitschwerdt, E.B., Kordick, D.L.** (2000) Bartonella infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity and zoonotic potential for women infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**(3): 428-438.
- Breitschwerdt, E.B., Kordick, D.L., Malerkey, D.E., Keen, B., Hadfield, T.L., Wilson, K.** (1995) Endocarditis in a dog due to infection with a novel Bartonella subspecies. *J Clin Microbiol*. 33:154-160.
- Brenner, D.J., O'Connor, S.P., Winkler, H.H, and Steigerwalt, A.G.** (1993). Proposals to unify the genera Bartonella and Rochalimaea, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 43:777-786.
- Brenner, S.A., Rooney, J.A., Manzwitsch, P., Regnery, R.L.** (1997) Isolation of Bartonella (*Rochalimaea*) *henselae*: effects of methods of blood collection and handling. *J. Clin. Microbiol*. **35**(3) 544-547.
- Bricker, B.J., Ewalt, D.R., Olsen, S.C., Jensen, A.E.** (2003) Evaluation of the Brucella abortus species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the Brucella AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest*. **15**(4):374-8.
- Britten, R.J., Kohne, D.E.** (1968) Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science*.**161**(841): 529-40.

- Brouqui, P., Raoult, D.** (2001) Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev* .14: 177-207.
- Bull, T.J., Sidi-Boumedine, K., McMinn, E.J., Stevensen, K., Pickup, R., Hermon-Taylor, J.** (2003) Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Mol Cell Probes*.17:157-64.
- Burch, C. L., Danaher, R. J. and Stein, D. C** (1997) Antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*: production of multiple lipooligosaccharides. *J. Bacteriol.*179:982-986.
- Cabassi, C.S., Farnetti, E., Casali, B., Taddei, S., Donofrio, G., Galvani, G., Cavirani, S.** (2002) Isolation of *Bartonella henselae* from domestic cats in an Italian urban area. *New Microbiol.* **25**(2):253-7.
- Carithers, H. A.** (1985) Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients. *Am J Dis Child.* **139**(11):1124-33.
- Carithers, H.A., Margileth, A.M.** (1991) cat-scratch disease:acute encephalopathy and other neurologic manifestations. *Am J Dis Child.*145:98-101.
- Caskey, C. T., A. Pizzuti, Y. Fu, R. G. Fenwick, Jr., and D. L. Nelson.** (1992) Triplet repeat mutations in human disease. *Science* .256:784-789.
- Celebi, B., Kilic, S., Aydin, N., Tarhan, G., Carhan, A., Babur, C.** (2009) Investigation of *Bartonella henselae* in cats in Ankara, Turkey. *Zoonoses Public Health* .**56**(4):169-75.
- Chan, M. S., Maiden, M. C. et Spratt, B. G.** (2001) Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics*.17:1077-83.
- Chang, C.C., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Romano, V. and Tietze, N.** (2001) Molecular evidence of *Bartonella* spp. In questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. *J Clin Microbiol.* **39**(4):1221-6.
- Chang, C.C., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Tappero, J.W., Sanchez, M.A. Koehler, J.E.** (2002). Molecular epidemiology of *Bartonella henselae* infection in human immunodeficiency virus-infected patients and their cat contacts, using pulsed-field gel electrophoresis and genotyping. *J Infect Dis.* **186**:1733-1739.
- Chang, C.C., Lee, C.C., Maruyama, S., Lin, J.W., Pan, M.J.** (2006) Cat-scratch disease in veterinary-associated populations and in its cat reservoir in Taiwan. *Vet Res.* **37**(4):565-77.
- Charlesworth, B., Sniegowski, P. et Stephan, W.** (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature.* **371**:215-220.
- Chenoweth, M.R., Somerville, G.A., Krause, D.C., O'Reilly, K.L., Gherardini, F.C.** (2004) Growth characteristics of *Bartonella henselae* in a novel liquid medium: primary isolation, growth-phase-dependent phage induction, and metabolic studies. *Appl Environ Microbiol.* **70**(2):656-63.
- Childs, J.E., Olson, J.G., Wolf, A., Cohen, N., Fakile, Y., Rooney, J.A., Bacellar, F., Regnery, R.L.** (1995) Prevalence of antibodies to *Rochalimaea* species (cat-scratch disease agent) in cats. *Vet. Rec* .136 : 519-520.
- Childs, J.E., Rooney, J.A., Cooper, J.L., Olson, J.G., Regnery, R.L.** (1994)

Epidemiologic observations on infection with *Rochalimaea* species among cats living in Baltimore. *Md, J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204:1775–1778.

Cho, D.H., Thienes, C.P., Mahoney, S.E., Analau, E., Filippova, G.N. and Tapscott, S.J. (2005). Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF. *Mol. Cell* 20: 483-489.

Chomel, B.B., Abbott, R.C., Kasten, R.W. Floyd-Hawkins, K.A., Kass, P.H. Glaser, C.A., Pederson, N.C., and Koehler, J.E. (1995) *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J. Clin. Microbiol.* 33:2445-2450.

Chomel, B.B., Boulouis, H.J., Gurfield, A.N., Heller, R., Piémont, Y., Pilet, C. (1997) Cat scratch disease and associated infections. *Bull Acad Natl Med.* 181(3):441-50.

Chomel, B. B., Boulouis, H. J., Petersen, H., Kasten, R. W., Yamamoto, K., Chang, C. C., Gandoin, C., Bouillin, C. & Hew, C. M. (2002). Prevalence of *Bartonella* infection in domestic cats in Denmark. *Vet Res.* 33: 205-213

Chomel, B. B., Carlos, E. T., Kasten, R. W., Yamamoto, K., Chang, C. C., Carlos, R. S., Abenes, M. V. & Pajares, C. M. (1999) *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from the Philippines. *Am J Trop Med Hyg.* 60: 593-597.

Chomel, B.B., Kasten, R.W., Floyd-Hawkins, K., Chi, B., Yamamoto, K., Roberts-Wilson, J., Gurfield, A.N., Abbott, R.C., Pedersen, N.C. and Koehler, J.E. (1996) Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol.* 34(8): 1952-6.

Chomel, B.B., Mac Donald, K.A., Kasten, R.W., Chang, C.C., WeY, A.C., Foley, J.E., Thomas, W.P., Kittleson, M.D. (2001) Aortic valve endocarditis in a dog due to *Bartonella clarridgeiae*. *J Clin Microbiol.* 39: 3548-3554.

Chomel, B. B., Wey, A. C., Kasten, R. W., Stacy, B. A. & Labelle, P. (2003) Fatal case of endocarditis associated with *Bartonella henselae* type I infection in a domestic cat. *J Clin Microbiol.* 41:5337-5339.

Ciammaruconi, A., Grassi, S., De Santis, R., Faggioni, G., Pittiglio, V., D'Amelio, R., Carattoli, A., Cassone, A., Vergnaud, G., Lista, F. (2008) Fieldable genotyping of *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* based on 25-loci Multi Locus VNTR Analysis. *BMC Microbiol.* 29: 8-21.

Clewell HJ, Gearhart JM, Gentry PR, Covington TR, VanLandingham CB, Crump KS, Shipp AM. (1999) Evaluation of the uncertainty in an oral reference dose for methylmercury due to interindividual variability in pharmacokinetics. *Risk Anal.* 19(4):547-58.

Cockerell, C. J., Berhctresser, P.R., Myrie-Willams, C. and Tierno, P. M. (1990) Bacillary epithelioid angiomatosis occurring in an immunocompetent individual. *Arch Dermatol.* 126:787-790.

Cockerell, C. J., Whitlow, M. A., Webster, G. F., Friedman- Kien, A. E. (1987) Epithelioid angiomatosis: a distinct vascular disorder in patients with the acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. *Lancet.* 654-656.

- Coil, D.A., Vandersmissen, L., Ginevra, C., Jarraud, S., Lammertyn, E. and Anné, J.** (2008). Intragenic tandem repeat variation between *Legionella pneumophila* strains. *BMC Microbiology*. **8**(218).
- Coletta-Filho, H.D., Takita, M.A., De Souza, A.A., Aguilar-Vildoso, C.I., Machado, M.A.** (2001) Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. *Appl Environ Microbiol*. **67**:4091-5.
- Commducci, M., Bambini, S., Brunelli, B., Adu-bobie, J., Arico, B., et al.** (2002) NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med*. **195**: 1445-1454.
- Cotter, S.E., Yeo, H.J., Juehne, T., St Geme, J.W.** (2005) Architecture and adhesive activity of the *Haemophilus influenzae* Hsf adhesion. *J Bacteriol*. **187**(13):4656-64.
- Cover, T.L., Aber, R.C.** (1989) *Yersinia enterocolitica*. *N Engl J Med*. **321**:16-24.
- Cunningham, E.T., Koehle, J.E.** (2000) Ocular bartonellosis. *Am.J.Ophthalmol*. **130** 340-349.
- D'Auria, G., Jimenez, N., Peris-Boodia, F., Pelza, C., Lattore, A., Moya, A.** (2008) Virulence factor rtx in *Legionella pneumophila*, evidence suggesting it is a modular multifunctional protein. *BMC Genomics*. **9**(1):14.
- Daly, J.S., Worthington, M.G., Brenner, D.J., Moss, C.W., Hollis, D.G., Weyant, R.S.** (1993). *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol*. **31**:872-81.
- Davidson, M. C. J. Maiden, C. d'Enfert, and F. C. Odds.** (2003). Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol*. **41**:5265-5266.
- Daybell, D., Paddock, C.D., Zaki, S.R., Comer, J.A., Woodruff, D., Hansen, K.J., Peacick, J.E.Jr.** (2004) Disseminated infection with *Bartonella henselae* as a cause of spontaneous splenic rupture. *Clin Infect. Dis*. **39**:21-24.
- Debré, R., Lamy, M., Jammet, M.L., Costil, L. & Mozziconacci, P. (1950). La maladie des griffes de chat . *Sem Hôp Paris*. **26** : 1895-904.
- Dehio, C.** (2001). Bartonella interactions with endothelial cells and erythrocytes. *Trends Microbiol*. **9**(6):279-85.
- Dehio, C.** (2005). Bartonella-host cell interactions and tumour formation. *Nat Rev Microbiol*. **3**:621-631.
- Demers, D.M., Bass, J.W., Vincent, J.M., Person, D.A., Noyes, D.K., Staeger, C.M., Samlaska, C.P., Lockwood, N.H., Regnery, R.L., Anderson, B.E.** (1995) Cat-scratch disease in Hawaii: etiology and seroepidemiology. *J.Pediatr*. **127**:23-26.
- Diancourt, L., Passet, V., Chervaux, C., Garault, P., Smokvina, T., Brisse, S.** (2007) Multilocus sequence typing of *Lactobacillus casei* reveals a clonal population structure with low levels of homologous recombination. *Appl Environ Microbiol*. **73**: 6601-11.
- Djelouadji, Z., Raoult, D., Daffé, M., Drancourt, M.** (2008) A single-step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. *PLoS Negl Trop Dis*. **2**(6):e253.
- Doman, E., Zechel, S., Lingnau, A., Hain, T., Darji, T A., Nichterlein, T., Wehland, J. and Chakraborty, T.** (1997) Identification and characterization of a novel PrfA-

regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats. *Infect. Immun.* 65:101-109.

Drancourt, M., Birtles, R., Chaumentin, G., Vandenesch, F., Etienne, J., Raoult, D. (1996) New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. *Lancet.* **347**(8999):441-3.

Drancourt, M., Bodaghi, B., Lepidi, H., Le Hoang, P., Raoult, D. (2004) Intraocular detection of *Bartonella henselae* in a patient with HLA-B27 uveitis. *Clin Microbiol.* **42**(4):1822-5.

Drancourt, M., J.L., Mainardi, P., Brouqui, F., Vandenesch, A., Carta, F., Lehnert, J., Etienne, F., Goldstein, J., Acar, and Raoult, D. (1995) *Bartonella (Rochalimaea) quintana* endocarditis in three homeless men. *N. Engl. J. Med.* 332:419-423.

Drancourt, M., Raoult, D. (1993) Proposed tests for the routine identification of Rochalimaea species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **12**(9):710-3.

Droz, S., Chi, B., Horn, E., Steigerwalt, A.G., Whitney, A.M. and Brenner, D.J. (1999) *Bartonella Koehlerae* sp.nov., isolated from cats. *J Clin Microbiol* **37**(4):1117-22.

Ebani, V.V., Cerri, D., Andreani, E. (2002) Cat scratch disease. Survey on the presence of *Bartonella henselae* among cats of Tuscany. *New Microbiol.* **25**(3):307-13.

Edouard, S., Raoult, D. (2009) *Bartonella henselae*, un agent d'infections ubiquitaires. *Med Mal Infect.* Doi : 10.

Ehrenborg, C., Wesslén, L., Jakobson, A., Friman, G., Holmberg, M.(2000) Sequence variation in the ftsZ gene of *Bartonella henselae* isolates and clinical samples. *J Clin Microbiol.* **38**(2): 682-7.

Engbaek, K., Lawson, P.A. (2004) Identification of Bartonella species in rodents, shrews and cats in Denmark: detection of two *B. henselae* variants, one in cats and the other in the long-tailed field mouse. *APMIS.* **112**(6):336-41.

Engberg, I., Lundberg, A. (1998) An electromyographic analysis of stepping in the cat. *Experientia.* 18: 174-6.

Engvall, E.O., Brändström, B., Fermér, C., Blomqvist, G., Englund, L. (2003) Prevalence of *Bartonella henselae* in young, healthy cats in Sweden. *Vet Rec.***152**(12):366-9.

Eremeeva, M.E., Gerns, H.L., Lydy, S.L., Goo,J.S., Ryan, E.T., Mathew, S.S., Ferraro, M.J., Holden, J.M., Nicholson, W.L., Dasch, G.A. and Koehler, J.E. (2007) Bacteremia, fever, and splenomegaly caused by a newly recognized Bartonella species. *N Engl J Med.* **356**(23): 2381-7.

Euzéby, J.P. (2002) *Bartonella henselae*. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. <http://www.bacdico.net>.

Fabbi, M., De Giuli, L., Tranquillo, M., Bragoni, R., Casiraghi, M., Genchi, C. (2004) Prevalence of *Bartonella henselae* in Italian stray cats: evaluation of serology to assess the risk of transmission of Bartonella to humans. *J. Clin. Microbiol.* **42**:264-268.

Farlow, J., Smith, K.L., Wong, J., Abrams, M., Lytle, M., Keim, P. (2001) *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol.* **39**(9):3186-92.

- Farlow, J., Postic, D., Smith, K. L., Jay, Z., Baranton, G. & Keim, P. (2002). Strain typing of *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia garinii* by using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol.* **40**:4612-4618.
- Florin T.A., Zaoutis T.E., Zaoutis, L.B. (2008) Beyond cat scratch disease : widening spectrum of *Bartonella henselae* infection. *Pediatrics.* 121:e1413-25.
- Foley, J.E., Harrus, S., Poland, A., Chomel, B., Pedersen, N.C. (1998) Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. *Am J Vet Res.***59** (12):1581-8.
- Foster, T.J., Mc Devitt, D. (1994) Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence. *FEMS Microbiol Lett.* **118**(3):199-205.
- Foucault, C., La Scola, B., Lindroos, H., Andersson, S.G., Raoult, D. (2005) Multispacer typing technique for sequence-based typing of *Bartonella quintana*. *Journal of Clinical Microbiology.* **43**(1) 41-48.
- Fournier, P.E., Lelievre, P., Eykyn, S.J., Mainardi, J.L., Marrie, T.J., Bruneel, F., Roure, C., Nash, J., Clave, D., James, E., Oit-Lemercier, C., Deforges, L., Tissot-Dupont, H., Raoult D. (2001). Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis : a study of 48 patients. *Medecine (Baltimore).* **80**: 245-251.
- Fournier, P.E., Ndiokubwayo, J.B., Guidran, J., Kelly, P.J, and Raoult, D. (2002) Human pathogens in body and head lice. *Emerg Infect Dis.* **8**(12):1515-8.
- Fournier, P.E., Zhu, Y., Ogata, H., Raoult, D. (2004) Use of highly variable intergenic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains. *J Clin Microbiol.* **42**(12):5757-66.
- Fox GM, Flynn HW Jr, Davis JL, Culbertson W. (1992) Causes of reduced visual acuity on long-term follow-up after cataract extraction in patients with uveitis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Ophthalmol.* **15**:114(6):708-14.
- François, P., Huyghe, A., Charbonnier, Y., Hezig, S., Topolsky, I., Fleury, B., Lew, D., Vaudaux, P., Harbarth, S., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Blanc, D.S., Pittet, D. Schrenzel, J. (2005) Use of an automated multiple-locus, variable-number tandem repeat-based method for rapid and high-throughput genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol.* **43**:3346-55.
- Frenay, H. M. E., Theelen, J. P. G., Schouls, L. M., Vandenbroucke- Grauls, C. M. J. E., Verhoef, J., van Leeuwen, W. J. and Mooi, F. R (1994) Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 846-847.
- Frothingham, R & Meeker-O'Connel, W.A. (1998) Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable number of tandem repeats. *Microbiol.* **144**:1189-1196.
- Frutos, R., Viari, A., Ferraz, C., Morgat, A., Eychenie, S., Kandassamy, Y. Chantal, I., Bensaid, A., Coissac, E., Vachieri, N., Demaille, J., Martinez, D. (2006) Comparative Genomic Analysis of Three Strains of *Ehrlichia ruminantium* Reveals an Active Process of Genome Size Plasticity. *J. Bact.* **188**(7)2533-2542 .
- Gieger, T.L., Taboada, J., Groves, M.G. (1998) Cat scratch disease and other Bartonella infections. compendium on Continuing Education for the practicing Veterinarian. **20**:1308-1317.

- Gilbert, F.B., Fromageau, A., Lamoureux, J., Poutrel, B.** (2006) Evaluation of tandem repeats for MLVA typing of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. *BMC Vet Res* . 2:33.
- Gillespie, T. N., Washabau, R. J., Goldschmidt, M. H., Cullen, J. M., Rogala, A. R. and Breitschwerdt, E.B.** (2003) Detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* DNA in hepatic specimens from two dogs with hepatic disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222:47-51.
- Glaus, T., Hofmann-Lehmann, H., Greene, C .** (1997) Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. *J. Clin . Microbiol.* 35:2883-2885.
- Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fournous, G., Tyczka, J., Tokarevich, N., Kovacava, E., Marrie, T.J., Raoult, D.** (2005) *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis.* 11(8):1211-7.
- Go, M.FI., Kapur, V., Graham, D.Y et Musser, J.M.** (1996). Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis : extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J.Bacteriol.* 78: 3934-3938.
- Goh, S. H., Byrne, S. K. and Chow, A.W.** (1992) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 30:1642-1645.
- Goodman, R.A., Breitschwerdt E.B.** (2005) Clinicopathologic findings in dog seroreactive to *Bartonella henselae* antigens. *Am J Vet Res.* 66(12):2060-4.
- Gorgé, O., Lopez, S., Hilaire, V., Lisanti, O., Ramisse, V., Vergnaud, G.** (2008) Selection and validation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis panel for typing. *J Clin Microbiol.* 46(3):1026-36.
- Gräser, Y., Klare, I., Halle, E., Gantenberg, R., Buchholz, P., Jacobi, HD., Presber, W., Schönian, G.** (1993) Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 31(9): 2417-20.
- Gravekamp, C., Horensky, D.S. Michel, J.L. and Madoff, L.C** (1996) Variation in repeat number within the alpha C protein of group B streptococci alters antigenicity and protective epitopes. *Infect. Immun.* 64: 3576-3583.
- Gravekamp, C., Kasper, D. L., Michel, J. L ., Kling, D. E., Carey, V. and Madoff, L.C.** (1997) Immunogenicity and protective efficacy of the alpha C protein of group B streptococci are inversely related to the number of repeats. *Infect. Immun.* 65: 5216-5221
- Greenbaum, B., Nelson, P., Marchildon, M., Donaldson, M.** (1986) Haemolytic anemia and hepatosplenomegaly associated with cat-scratch disease. *J Pediatr.*108: 428-430.
- Grenouillet, F., Million, L., Bart, J.M., Roussel, S., Biot, I., Didier, E., Orang, A .S . Piarroux, R.** (2007). Multiple-Locus Variable- Number Tandem-Repeat A nalysis for Rapid Typing of *candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 45:3781-4.
- Groathouse, N.A., Rivoire, B., Kim, H., Lee, H., Cho, S.N., Brennan, P.J. Vissa, V.D.** (2004) Multiple polymorphic loci for mollecular typing of strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol.* 42:1666-72.

- Gundi, V.A., Davoust, B., khamis, A., Boni, M., Raoult, D. and La Scola, B.** (2004) Isolation of *Bartonella rattimassiliensis* sp. nov. and *Bartonella phoceensis* sp. nov. from European *Rattus norvegicus*. *J Clin Microbiol.* **42**(8):3816-8.
- Guptill, L., Slater, L.C., Wu, C.** (1997) Experimental infection of young specific pathogen-free cats with *Bartonella henselae*. *J. Infect Dis.* **176**: 206-216.
- Guptill, L., Slater, L.N., Wu, C.C., Lin, T.L., Glickman, L.T., Welch, D.F., Tobolski, J., HogenEsch, H.** (1998). Evidence of reproductive failure and lack of perinatal transmission of *Bartonella henselae* in experimentally infected cats. *Vet immunol Immunopathol.* **65**:177-189.
- Gurfield, A. N., Boulouis, H. J., Chomel, B. B., Kasten, R. W., Heller, R., Bouillin, C., Gandoin, C., Thibault, D., Chang, C. C. & other Authors.* (2001). Epidemiology of Bartonella infection in domestic cats in France. *Vet Microbiol* **21**:185-198.
- Haimerl, M., Tenter, A.M., Simon, K., Rommel, M., Hilger, J., Autenrieth, I.B.** (1999) Seroprevalence of *Bartonella henselae* in cats in Germany, *J. Med. Microbiol.* **48**:849-856.
- Hamilton, D.H., Zangwill, K.M., Hadler J.L., Cartter M.L.** (1995) Cat-search disease. Connecticut, 1992-1993. *J Infect Dis.* **172**: 570-3.
- Hardy, K.J., Ussery, D.W., Oppenheim, B.A., Hawkey, P.M.** (2004) Distribution and characterization of staphylococcal interspersed repeat units (SIRUs) and potential use for strain differentiation. *Microbiology.* **150**:4045-52.
- Harper, K.N., Liu, H., Ocampo, P.S., Steiner, B.M., Martin, A., Levert, K., Wang D., Sutton, M., Armelagos, G.J.** (2008). Sequence of the acidic repeat protein (arp) gene differentiates venereal from nonvenereal *Treponema pallidum* subspecies, and the gene has evolved under strong positive selection in the subspecies that causes syphilis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **53**(3):322-32.
- Harris, S.R., Feil, E.J., Holden, M.T.G., Quail, M.A et al.** (2010) Evolution of MRSA During Hospital Transmission and Intercontinental Spread. *Science.* **327**(5964): 469-74.
- Heath, D. G., An, F. Y., Weaver, K. E. et Clewell, D. B.** (1995) Phase variation of Enterococcus faecalis pAD1 conjugation functions relates to changes in iteron sequence region. *J Bacteriol.* **177**: 5453-9.
- Heller, R., Artois, M., Xemar, V., De Briel, D., Gehin, H., Jaulhac, B., Monteil, H., Piemont, Y.** (1997) Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *J Clin Microbiol.* **35**:1327-1331.
- Heller, R., Kubina, M., Mariet P., Riegel, P., Delacour, G., Dehio, C., Lamarque F., Kasten, R., Boulouis, H.-J., Monteil, H., Chomel, B., and Piemont Y.** 1999. *Bartonella alsatica* sp. nov., a new Bartonella species isolated from the blood of wild rabbits. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:283-288.
- Heller, R., Riegel, P., Hansmann, Y., Delacour, G., Bermond, D., Dehio, C., Lamarque, F., Monteuil, H., Chomel, B. and Piemont, Y.** (1998) *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new Bartonella species isolated from the blood of wild rats. *Int J Syst Bacteriol.* **48** (4):1333-9.
- Henderson, I.R., Owen, P & Nataro, J.P.** (1999) Molecular switches; the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol.* **33**: 919-932.

- Henn, J.B., Chomel, B.B., Boulouis, H.J., Kasten, R.W., Murray, W.J., Bar-Gal, G.K., King, R., Courreau, J.F., Baneth, G. (2009) *Bartonella rochalimae* in raccoons, coyotes, and red foxes. *Emerg Infect Dis.* **15**(12):1984-7.
- Higgins, C.F., McLaren, R.S., Newbury, S.F. (1988) Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion? *Gene.* **10**: 72(1-2):3-14.
- Higgins, G.A., Sandiford, J.A., Blair, W.C. (1982) Remote Salmonella infections. *World J Surg.* **6**(2): 236-40.
- High, N. J., Deadman, M. E. and Moxon, E. R. (1993) The role of the repetitive DNA motif (59-CAAT-39) in the variable expression of the *H. influenzae* lipopolysaccharide epitope alpha-Gal(1-4)beta-Gal. *Mol. Microbiol.* **9**:1275-1282.
- Hjelm, E., McGill, S., Blomqvist, G. (2002) Prevalence of antibodies to *Bartonella henselae*, *B. elizabethae* and *B. quintana* in Swedish domestic cats. *Scand J Infect Dis.* **34**(3):192-6.
- Hnatuk, L.A., Brown, D.H., Snell, G.E. (1994) Bacillary angiomatosis: a new entity in acquired immunodeficiency syndrome. *J Otolaryngol.* **23**(3):216-20.
- Holenarasipur, R., Vikram, A., Kirstin, B., Patrick, A., DeValeria, Scott A., Cunningham, and Franklin, R. Cockerill III. (2007) Bivalvular *Bartonella henselae* Prosthetic Valve Endocarditis. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.* **45**(12):4081-4084.
- Holmberg, M., McGill, S., Ehrenborg, C., Wesslén, L., Hjelm, E., Darelid, J., Blad, L., Engstrand, L., Regnery, R., Friman, G. (1999) Evaluation of human seroreactivity to *Bartonella* species in Sweden. *J Clin Microbiol.* **37**(5):1381-4.
- Holmes, A. H., Greenough, T. C., Balady, G. J., Regnery, R.L., Anderson, B. E., Oikeane, J. C., Onger, J. D. F. and McCrone, E.L. (1995) *Bartonella henselae* endocarditis in an immunocompetent adult. *Clin. Infect. Dis.* **21**:1004-1007.
- Hood, D. W., Deadman, M.E., Jennings, M.P., Bisercic, M., Fleischmann, R.D., Venter, J.C. and Moxon, E.R. (1996) DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:11121-11125.
- Houpikian, P., Raoult, D. (2001) 16S/23S rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis, identification, and subtyping of *Bartonella* species. **39**(8):2768-78.
- Houpikian, P., Raoult, D. (2005) Blood culture-negative endocarditis in a reference center: etiologic diagnosis of 348 cases. *Medicine (Baltimore).* **84**(3):162-73.
- Hulton, C.S., Higgins, C.F., Sharp, P.M. (1991) ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol.* **5**(4): 825-34.
- Hulzebos, C. V., Koetse, H.A., Kimpen, J.L.L., Wolfs, T. F. W. (1999) Vertebral osteomyelitis associated with cat-scratch disease. *Clin. Infect. Dis.* **28**:1310-1312.
- 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.

- Inoue, K., Kabeya, H., Shiratori, H., Ueda, K., Kosoy, M.Y., Chomel, B.B. Boulouis, H.J and Maruyama, S.** (2009) *Bartonella japonica* sp. nov. and *Bartonella silvatica* sp. nov., isolated from Apodemus mice in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* DOI.
- Iredell, J., Blanckenberg, D., Arvand, M., Grauling, S., Feil, E. J. & Birtles, R. J.** (2003). Characterization of the natural population of *Bartonella henselae* by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* 41:5071-5079.
- Ives, T.J., Manzewitsch, P., Regnery, R.L., Butts, J.D., Kebede, M.** (1997) In vitro susceptibilities of *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. elizabethae*, *Rickettsia rickettsii*, *R. conorii*, *R. akari*, and *R. prowazekii* to macrolide antibiotics as determined by immunofluorescent-antibody analysis of infected Vero cell monolayers. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(3):578-82.
- Jackson, L. A., Perkins, B. A. & Wenger, J. D.** (1993) Cat scratch disease in the United States: an analysis of three national databases. *Am J Public Health.* 83:1707-1711.
- Jackson, L.A., Spach, D.H., Kippen, D.A., Sugg, N.K., Regnery, R.L., Sayers, M.H. and Stamm, W.E.** (1996) Seroprevalence to *Bartonella quintana* among patients at a community clinic in downtown Seattle. *J Infect Dis.* 173(4):1023-6.
- Jackson, P. J., Walthers, E. A., Kalif, A. S., Richmond, K. L., Adair, D. M., Hill, K. H., Kuske, C. R., Andersen, G. L., Wilson, K. H., Hugh-Jones, M.E. and Keim, P.** (1997) Characterization of the variable number of tandem repeats in *vvrA* from different *Bacillus anthracis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1400-1405.
- Jacobs, R.F., Schutze, G.E.** (1998) *Bartonella henselae* as a cause of prolonged fever and fever of unknown origin in children. *Clin. Infect. Dis.* 26:80-84.
- Jacomo, V., Kelly P.J. Raoult D.** (2002) Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate), *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9 :8-18.
- Jalava, J., Kotilainen, P., Nikkari, S., Skurnik, M., Vanttinen, E, Lehtonen, O.P., Eerola, E. and Toivanen, P.** (1995) Use of the polymerase chain reaction and DNA sequencing for detection of *Bartonella quintana* in the aortic valve of a patient with culture-negative infective endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* 21: 891-896.
- Jameson, P., Green, C., Regnery, R., Dryden, M., Marks, A., Brown, J., Cooper, J., Glaus, B., Greene, R.** (1995) Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in pet cats throughout regions of North America. *J. Infect. Dis.* 172:1145-1149.
- Jeffreys, A.J.** (1987) Highly variable minisatellites and DNA fingerprints. *Biochem.Soc.Trans.*15: 309-17.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson, and S. L. Thein.** (1985). Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature* 316:76-79.
- Joblet, C., Roux, V., Drancourt, M., Gouvernet, J., Raoult, D.** (1995) Identification of *Bartonella (Rochalimaea)* species among fastidious gram-negative bacteria on the basis of the partial sequence of the citrate-synthase gene. *J Clin Microbiol.* 33(7):1879-83.
- Johnson, G., Ayers, M., McClure, S.C., Richardson, S.E., Tellier, R.** (2003) Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*ribC*). *J Clin Microbiol.* 41:1069-1072.

- Johnson, R., Ramos-Varra, J. and Vemulapalli, R.** (2009). Identification of *Bartonella henselae* in an aborted equine fetus. *Vet. Pathol.* **46**(2):277-281.
- Johansson, A., Farlow, J., Larsson, P., Dukerich, M., Chambers, E., Bystrom, M., Fox, J., Chu, M., Forsman, M. & other authors** (2004). Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J Bacteriol.* **186**:5808-5818.
- Jones, K.F., Hollingshead, S.K., Scott, J.R. and Fischetti, V.A.**(1988). Spontaneous M6 protein size mutants of group A streptococci display variation in antigenic and opsonic epitopes. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA.* **85**: 8271-8275.
- Jones, C. W., and F. C. Kafatos.** (1982). Accepted mutations in a gene family: evolutionary diversification of duplicated DNA. *J. Mol. Evol.* **19**:87-103.
- Jones, S.L., Maggi, R., Shuler, J., Alward, A., Breitschwerdt, E.B.** (2008) Detection of *Bartonella henselae* in the Blood of 2 Adult Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* **22**(2):495-498.
- Joseph, A.K., Wood, C.W., Robson, J.M., Paul, S.L., Morris, A.J.** (1997) *Bartonella henselae* bacteraemia in domestic cats from Auckland. *N. Z. Vet. J.* **45**:185-187.
- Juskevicius, R., Vnencak-Jones, C.** (2004) Pathologic quiz case: a 17-year-old renal transplant patient with persistent fever, pancytopenia, and axillary lymphadenopathy. Bacillary angiomatosis of the lymph node in the renal transplant recipient. *Arch Pathol Lab Med.* **128**(1):12-4.
- Kabeya, H., Maruyama, S., Irei, M., Takahashi, R., Yamashita, M., Mikami, T.**(2002) Genomic variations among *Bartonella henselae* isolates derived from naturally infected cats. *Vet Microbiol.* **89**(2-3):211-21.
- Kaiser, P.O., Riess, T., Wagner, C.L, Linke, D., Lupas, A.N., Schwarz, H., Raddatz, G., Schafer, A. and Kempf, V.A.** (2008) The head of *Bartonella* adhesion A is crucial for host cell interaction of *Bartonella henselae*. *Cellular Microbiol.* **10**(11): 2223-2234.
- Karem, K.L., Paddock, C.D. and Regnery, R.L.** (2000) *Bartonella henselae*, *B. quintana*, and *B. bacilliformis*: historical pathogens of emerging significance. *Microbes Infect.* **2**(10):193-205.
- Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J. & Hugh-Jones, M. E.** (2000). Multiple locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.* **182**:2928-2936.
- Kelly, P.J., Matthewan, .A., Hayter, D., Downey, S., Wray, K., Bryson, N.R., Raoult, D.** (1996) *Bartonella (Rochalimaea) henselae* in southern Africa – evidence for infections in domestic cats and implications for veterinarians. *J.S. Afr. V.Assoc.* **67**:182-187.
- Kelly, P., Rolain, J. M., Maggi, R., Sontakke, S., Keene, B., Hunter, S., Lepidi, H., Breitschwerdt, K. T. and Breitschwerdt. E. B.** (2006) *Bartonella quintana* endocarditis in dogs. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1869-1872.
- Kelly, P.J., Rooney, J.J., Marston, E.L., Jones, D.C., Regnery, R.L.** (1998) *Bartonella henselae* isolated from cats in Zimbabwe. *Lancet.* **351**:1706.
- Kenneth, C., Earhart, M.D., Michael, H., Power, M.D.**(2000) *Bartonella* Neuroretinitis. Images in clinical medicine. *New Engl. J. Med.* **343**(20):1459.

- Kevin J. Bown, Xavier Lambin, Nicholas H. Ogden, Miroslav Petrovec, Susan E. Shaw, Zerai Woldehiwet, and Richard J. Birtles.** (2007) High-Resolution Genetic Fingerprinting of European Strains of *Anaplasma phagocytophilum* by Use of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**(6):1771-1776.
- Kim, Y.S., Seo, K.W., Lee, J.H., Choi, E.W., Lee, H.W., Hwang, C.Y., Shin, N.S., Youn, H.J., Youn, H.Y.,** (2009). Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats and dogs in Korea. **10**(1): 85-7.
- Klein, J. L., Nair, S. K., Harrison, T.G., Hunt, I., Fry, N. K. and Friedland, J. S.** (2002) Prosthetic val endocarditis caused by *Bartonella quintana*. *Emerg. Infect. Dis.* **8** :202-203.
- Klevytska, A.M., Price, L.B., Schupp, J.M., Worsham, P.L., Sangare, L., Wong, J.Keim, P.** (2001) Identification and characterization of Variable-Number Tandem-Repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J Clin Microbiol.* **39**:3179-3185.
- Koeck, J.L., Njanpop-Lafourcade, B.M., Cade, S., Varon, E., Sangar, L., Valjevac, S., Vergnaud, G., Pourcel, C.** (2005) Evaluation and selection of tandem repeat loci for *Streptococcus pneumoniae* MLVA strain typing. *BMC Microbiol.* **5**: 66.
- Koehler, J.E, Cederberg, L.** (1995) Intra-abdominal mass associated with gastrointestinal hemorrhage: a new manifestation of bacillary angiomatosis. *Gastroenterology*. **109**(6):2011-4.
- Koehler, J.E., Quinn, F.D., Berger, T.G., LeBoit, P.E. and Tappero, J.W.** (1992) Isolation of Rochalimaea species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. *N Engl J Med* .**327**(23):1625-31.
- Koehler J.E., Tappero, J.W.** (1993) Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus . *Clin Infect Dis.* **17**:612-24.
- Kordick, D.L., Breitschwerdt, E.B.** (1997) Relapsing bacteremia after blood transmission of *Bartonella henselae* to cats. *Am J Vet Res.* **58**(5):492-7.
- Kordick, S.K., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Southwick, K.L., Colitz, C.M., Hancock, S.I., Bradley, J.M., Rumbough, R., McPherson, J.T. and MacCormack, J.N.** (1999) Coinfection with multiple tick- borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *J Clin Microbiol* .**37**(8):2631-8.
- Kordick, D.L., Swaminathan, B., Greene, C.E., Wilson, K.H., Whitney, A.M., O'Connor, S., Hollis, D.G., Matar, G.M., Steigerwalt, A.G., Malcolm, G.B., Hayes, P.S., Hadfield, T.L., Breitschwerdt, E.B., Brenner, D.J.** (1996) *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* subsp. nov., isolated from dogs; *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*; and emended description of *Bartonella vinsonii*. *Int J Syst Bacteriol.* **46**(3):704-9.
- Kordick, D.L., Wilson, K.H., Sexton, D.J., Hadfield, T.L., Berkhoff, H.A., Breitschwerdt, E.B.** (1995) Prolonged Bartonella bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J. Clin. Microbiol* . **33**:3245-3251.
- Kreisel, D., M. K. Pasque, R. J. Damiano, Jr., G. Medoff, A. Kates, F. H. Kreisel, and J. S. Lawton.** (2005) Bartonella species-induced prosthetic valve endocarditis associated with rapid progression of valvular st Thorac. *Cardiovasc. Surg.* **130**:567-568.

- Kreiswirth, B., Kornblum, J., Arbeit, R.D., Eisner, W., Maslow, J.N., McGeer, A., Low, D.E., Novick, R.P. (1993) Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science*. **259**(5092):227-230.
- Landau, M., Kletter, Y., Avidor, B., Ephrat, G., Ephros, M., Brenner, S., Giladi, M. (1999) Unusual eruption as a presenting symptom of cat scratch disease. *J Am Acad Dermatol*. **41**: 833-836.
- Lappin, M.R., Black, J.C. (1999) Bartonella spp infection as a possible cause of uveitis in a cat. *J Am Vet Med Assoc*. **214**:1205-1207.
- La Scola, B., Liang, Z., Zeaiter, Z., Houpiqian, P., Grimont P.A., Raoult D. Genotypic characteristics of two serotypes of *Bartonella henselae*. *J Clin Microbiol*. **40**(6):2002-8.
- La Scola, B., Raoult, D. (1996) Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. *J Clin Microbiol*. **34**(9):2270-4.
- La Scola, B., Raoult, D. (1999) Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998). *Clin Microbiol*. **37**(6):1899-905.
- La Scola, B., Zeaiter, Z., Khamis, A., and Raoult, D. (2003) Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the Bartonella paradigm. *Trends in Microbiology*. **11**(7):318-321.
- Laycock G.M., Day M.J., Birtles R.J. (2001) Prevalence of *Bartonella henselae* in cats in the UK. *Vet. Rec.* 148-219.
- Lawson, P.A., Collins, M.D. (1996) Description of *Bartonella clarridgeiae* sp.nov. isolated from the cat of a patient *Bartonella henselae* septicemia. *Med Microbiol Lett* **5**: 64-73.
- Leach, F. S., Nicolaidis, N. C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomaki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L. A., Nystrom, M., Guan, X. Y., Zhang, G. J., Meltzer, P. S., Yu, J. W., Kao, F. T., Chen, D. A., Cerosaletti, D. M., Fournier, R. E. K., Todd, S., Lewis, T., Leach, R. J., Naylor, S. L., Green, J., Jass, J., Watson, P., Lynch, H. T., Trent, J. M., de la Chapelle, A., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1993) Mutations of a MutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*. **75**:1215-1225.
- Le Flèche, P., Fabre, M., Denoeud, F., Koeck, J.L., Vergnaud, G. (2002) High resolution, online identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol*. **2**: 37.
- Le Flèche, P., Jacques, I., Grayon, M., Al Dahouk, S., Bouchon, P., Denoeud, F., Nöckler, K., Neubauer, H., Guilloteau, L.A., Vergnaud, G. (2006) Evaluation and selection of tandem repeat loci for a Brucella MLVA typing assay. *BMC Microbiol*. **9**:6:9.
- Le Flèche, P., Hauck, Y., Onteniente, L., Prieur, A., Denoeud, F., Ramiisse, V., Sylvestre, P., Benson, G., Ramiisse, F. & Vergnaud, G. (2001). A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol* **1**:2-15.
- Leighton, F.A., Artsob H.A., Chu M.C., Olson J.G. (2001) A serological survey of rural dogs and cats on the southern Canadian prairie for zoonotic pathogens. *Can. J. Public Health*. **92**: 67-71.

- Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J.G., Charles, I.G., Fairweather, N., Novotny, P., Brennan, M.J.** (1991) Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing Bordetella pertussis surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc. Natl.Acad.Sci.* 88: 345-349.
- Lesprit, P., Noel, V., Chazouilleres, P., Brun-Buisson, C. and Deforges. L.** (2003) Cure of Bartonella et of a prosthetic aortic valve without surgery: value of serologic follow-up. *Clin. Microbiol. Infect.* 9:239.
- Levinson, G. and Gutman. G. A** (1987). High frequency of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 15 (13): 5323-5338.
- Li, W., Chomel, B. B., Maruyama, S., Guptill, L., Sander, A., Raoult, D. & Fournier, P. E.** (2006). Multispacer typing to study the genotypic distribution of *Bartonella henselae* populations. *J Clin Microbiol.* 44:2499-2506.
- Li, W., Raoult, D., Fournier, P.E.** (2007) Genetic diversity of *Bartonella henselae* in human infection detected with multispacer typing. *Emerg Infect Dis*;13:1178-83.
- Liang, S.Y., Watanabe, H., Trajima, J., Li, C.C., Liao, J.C., Tung, S .K., Chiou, C.S.** (2007) Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Molecular typing of *Shigella sonnei*. *J Clin Microbiol.* 45:3574-80.
- Liao, J.C., Li, C.C., Chiou, C.S.** (2006) Use of a multilocus variable-number tandem repeat analysis method for molecular subtyping and phylogenetic analysis of *Neisseria meningitidis* isolates. *BMC Microbiol.* 6:44.
- Lindstedt, B.A., Brandal, L.T., Aas, L., Vardund, T., Kapperud, G.** (2007) Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates for use in a genotyping assay. *J. Microbiol. Methods.* 69:197-205.
- Lindstedt, B.A., Heir, E., Gjernes, E., Vardund, T., Kapperud, G.** (2003) DNA fingerprinting of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 based on Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA). *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*10: 2-12.
- Lindstedt, B.A., Tham, W., Danielsson-Tham, M.L., Vardund, T., Helmersson, S., Kapperud, G.** (2008) Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *J Microbiol Methods.* 72(2):141-8.
- Lindstedt, B.A., Vardund, T., Aas, L., Kapperud, G.** (2004a) Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* using PCR multiplexing and multicolour capillary electrophoresis. *J. Microbiol. Methods.* 59: 163-172.
- Lindstedt, B.A., Vardund, T., Kapperud, G.,** (2004b) Multiple-locus variable number tandem-repeats analysis of *Escherichia coli* O157 using PCR multiplexing and multi-colored capillary electrophoresis. *J.Microbiol.Methods.* 58:213-222.
- Litwin, C.M., Rawlins, M.L., Swenson, E.M.** (2007) Characterization of an Immunogenic Outer Membrane Autotransporter Protein, Arp, of *Bartonella henselae*. *Infection and Immunity.* 75(11): 5255-5263.

- Lucey, D., Dolan, M.J., Moss, C.W., Garcia, M., Hollis, D.G., Wegner, S., Morgan, G., Almeida, R., Leong, D., Greisen, K.S. (1992) Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. *Clin Infect Dis.* 14(3): 683-8.
- Luria, B.J., Levy, J.K., Lappin, M.R., Breitschwerdt, E.B., Legendre, A.M., Hernandez, J.A., Gorman, S.P., Lee, I.T. (2004), Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *J. Feline Med. Surg.* 6: 287-296.
- Lysnyansky, I., Rosengarten, R. and Yogev, D. (1996) Phenotypic switchin of variable surface lipoproteins in *Mycoplasma bovis* involves high frequency chromosomal rearrangements. *J. Bacteriol.* 178: 5395-5401.
- MacDonald, K.A, Chomel, B.B., Kittleson, M.D., Kasten, R.W., Thomas, W.P., Pesavento, P. (2004) A prospective study of canine infective endocarditis in northern California (1999-2001): emergence of Bartonella as a prevalent etiologic agent. *J. Vet. Intern. Med.* 18: 56-64.
- Madoff, L.C., Michel, J.L., Gong, E.W., Kling, D.E. and Kasper, D.L. (1996). Group B streptococci escape host immunity by deletion of tandem repeat elements of the alpha C protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:4131-4136
- Maggi, R.G., Duncan, A.W., Breitschwerdt, E.B. (2005a) Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven Bartonella species. *J. Clin. Microbiol.* 43:2651-2655.
- Maggi, R.G., Harms, C.A., Hohn, A.A., Pabst, D.A., McLellan, W.A. Walton, W.J., Rotstein, D.S., Breitschwerdt E.B. (2005b) *Bartonella henselae* in porpoise blood. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1894–1898.
- Maiden, M.C.J., 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. and Spratt, B.G. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 3140-3145.
- Maillard, R., Vayssier-Taussat M., Bouillin, C., Gandoin, C., Holos, L., Chomel, B., Piemont, Y., Boulouis, HJ. (2004). Identification of Bartonella strains isolated from wild and domestic ruminants by a single- step PCR analysis of the 16S-23S intergenic spacer region. *Vet. Microbiol.* 98: 63-69.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trottier, Y., Lehrach, H., Davies, S.W. and Bates, G.P. (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell.* 87: 493-506.
- Margileth, A.M. (1993) Cat scratch disease. *Adv. Pediatr. Infect. Dis.* 8:1-21.
- Margileth, A.M., Baehren D.F (1998) Chest-Wall abscess due to cat-scratch disease (CSD) in an adult with antibodies to *Bartonella clarridgeiae*: case report and review of the thoracopulmonary manifestations of CSD. *Clin. Infect. Dis.* 27:353-357.
- Margileth, A.M., Wear, D.J. and English, C.K. (1987) Systemic cat scratch disease: report of 23 patients with prolonged or recurrent severe bacterial infection. *J. Infect. Dis.* 155 :390-402.
- Mark, C., Enright, N., Day, P., Catrin, J., Davies, E., Sharon, Peacock, J. and Spratt, G. (2000) Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-

Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical Microbiology*. **38** (3):1008-1015.

Marra, C.M. (1995) Neurologic complications of *Bartonella henselae* infection. *Curr Opin Neurol*. **8**(3):164-9.

Marsh, J.W., O'Leary, M.M., Shutt, K.A., Pasculle, A.W., Johnson, S., Gerding, D.N., Muto, C.A., Harrison, L.H. (2006) Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in Hospitals. *J Clin Microbiol*. **44**:2558-66.

Marston E.L., Finkel B., Regnery R.L., Winoto I.L., Graham R.R., Wignal S., Simanjuntak G., Olson J.G. (1999) Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in an urban Indonesian cat population. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. **6**:41-44.

Martin, B. et al. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res*. **20**:3479-83.

Maruyama, S., Hiraga, S., Yokoyama, E., Naoi, M., Tsuruoka, Y., Ogura Y., Tamura, K., Namba, S., Kameyama, Y., Nakamura, S., Katsube, Y. (1998) Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* infections among pet cats in Kanagawa and Saitama Prefectures. *J. Vet. Med. Sci* .**60**:997-1000.

Maruyama, S., Kabeya, H., Nakao, R., Tanaka, S., Sakai, T., Xuan, X., Katsube, Y., Mikami, T. (2003) Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. *Microbiol. Immunol* . **47**:147-153.

Maruyama, S., Kasten, R. W., Boulouis, H. J., Gurfield, N. A., Katsube, Y. & Chomel, B. B. (2001) Genomic diversity of *Bartonella henselae* isolates from domestic cats from Japan, the USA and France by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol*. **79**:337-349.

Maruyama, S., Nakamura, Y., Kabeya, H., Tanaka, S., Sakai, T. & Katsube, Y. (2000). Prevalence of *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* and the 16S rRNA gene types of *Bartonella henselae* among pet cats in Japan. *J Vet Med Sci*. **62**:273-279.

Maruyama, S., Nogami, S., Inoue, I., Namba, S., Asanome, K., Katsube, Y. (1996) Isolation of *Bartonella henselae* from domestic cats in Japan. *J. Vet Med. Sci* .**58**:81-83.

Maslow, J.N., Mulligan, M.E., Arbeit, R.D.(1993) Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis*.**17**(2):153-6

Mason J.O.(2004) Retinal and optic nerve neovascularization associated with cat scratch neuroretinitis. *Retina*. **24**:176-178.

Matar, G.M., Koehler, J.E., Malcolm, G., Lambert-Fair, M.A., Tappero, J., Hunter, S.B., Swaminathan, B. (1999) Identification of *Bartonella* species directly in clinical specimens by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment. *J Clin Microbiol*. **37**(12):4045-7.

Matar, G. M., Swaminathan, B., Hunter, S. B., Slater, L. N. & Welch, D. F. (1993). Polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis of a fragment of the ribosomal operon from *Rochalimaea* species for subtyping. *J Clin Microbiol*. **31**:1730-1734.

- Maurin, M., Birtles, R.J. and Raoult, D.** (1997) Current knowledge of Bartonella species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16: 487-506.
- Maurin, M. and D. Raoult.** (1996) *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 273-292.
- Maurin, M., Rolain, J.M., Raoult, D.** (2002) Comparison of in-house and commercial slides for detection of immunoglobulins G and M by immunofluorescence against *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(5): 1004-9.
- Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A. L., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B., Tibayrenc, M., Loch, C. & Supply, P.** (2001). High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:1901-1906.
- McAuliffe, L., Ayling, R.D. Nicholas, R.A.** (2007) Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for the molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides* SC. *FEMS Microbiol Lett.* 276:181-8.
- McDevitt, D. and Foster, T.J.** (1995) Variation in the size of the repeat region of the fibrinogen receptor (clumping factor) of *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiology.* 141: 937-943.
- McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P. and Foster, T. J.** (1994) Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *S. aureus*. *Mol. Microbiol.* 11: 237-248.
- Melter, O., Hercik, K., Weyant, R.S, Janecek, J., Nemecek, A., Mecera, J., Gonzorova, L., Branny, P.** (2003) Detection and characterization of feline *Bartonella henselae* in the Czech Republic. *Vet. Microbiol.* 93: 261-273.
- Metzker-Cotter, E., Kletter, Y., Avidor, B., et al.** (2003) Long-term serological analysis and clinical follow-up of patients with cat scratch disease. *Clin Infect Dis.* 37:1149-54.
- Mexas, A.M., Hancock, S.I, Breitschwerdt, E.B.** (2002) *Bartonella henselae* and *Bartonella elizabethae* as potential canine pathogens. *J Clin Microbiol.* 40(12):4670-4
- Meyer, T. F., Gibbs, C. P. and Haas, R.**(1990). Variation and control of protein expression in *Neisseria*. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 451-477.
- Michel, J. Madoff, L.C., Olson, K., Kling, D.E., Kasper, D.L. and Ausubel, F.M.** (1992) Large, identical, tandem repeating units in the C protein alpha antigen gene, bca, of group B streptococci. *Pro.Natl.Acad. Sci. USA.* 89:10060-10064.
- Milam, M.W., Balerdi, M.J., Toney, J.F., Foulis, P.R., Milam, C.P., Behnke, R.H.** (1990) Epithelioid angiomatosis secondary to disseminated cat scratch disease involving the bone marrow and skin in a patient with acquired immune deficiency syndrome: a case report. *Am J Med* 88.(2):180-3.
- Mohle-Boetani, J.C., Koehler, J.E., Berger, T.G., LeBoit, P.E., Kemper, C.A., Reingold, A.L., Plikaytis, B.D., Wenger, J.D., Tappero, J.W.** (1996) Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus: clinical characteristics in a case-control study. *Clin Infect Dis.* 22(5): 794-800.
- Molia, S., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Leutenegger, C.M., Steele, B.R., Marker, L., Martenson, J.S., Keet, D.F., Bengis, R.G., Peterson, R.P., Munsong, L., O'Brien,**

- S.J.** (2004) Prevalence of Bartonella infection in wild african lions (*Panthera leo*) and cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Vet Microbiol* .100: 31-41.
- Mullane, NR., Ryan, M., Iversen, C., Murphy, M., O'Gaora, P., Quinn, T., Whyte, P., Wall, PG., Fanning, S.** (2008) Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for the molecular subtyping of *Enterobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol*. **74**(4):1223-31.
- Murakami, K., Tsukahara, M., Tsuneoka, H., Lino, H., Ishida, C., Tsujino, K., Umeda, A., Furuya, T., Kawauchi, S., Sasaki, K.** (2002) Cat scratch disease : analysis of 130 seropositive cases. *J. Infect. Chemother* .8:349-352.
- Murphy, M., Corcoran, D., Buckley, J.F., O'mahony, M., Whyte, P., Fanning, S.** (2007) Development and application of multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) to subtype a collection of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol*. 115:187-194.
- Nadal, D., Zbinden, R.** (1995) Serology to *Bartonella (Rochalimaea) henselae* may replace traditional diagnostic criteria for cat-scratch disease. *Eur.J.Pediatr*. **154**(11):906-8.
- Nasirudeen, A.M., Thong, M.L.** (1999) Prevalence of *Bartonella henselae* immunoglobulin G antibodies in Singaporean cats. *Pediatr.Infect. Dis. J.* 18: 276-278.
- Newton, H.J., Sansom, F.M., Dao, J., McAlister, A.D., Sloan, J., Cianciotto, N.P., Hartland, E.L.** Sell repeat protein LpnE is a Legionella virulence determinant that influences vacuolar trafficking. *Infect Immun*. **75**(12): 5575-5585.
- Noller, A.C., McEllistrem, M.C., Pacheco, A.G., Boxrud, D.J., Harrison, L.H.** (2003) Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J Clin Microbiol*. **41**(12):5389-97.
- Noguchi and Hercelles.** (1926) A Preliminary note on the etiology of verruga peruviana. *Science* 121-122.
- Norman, A. F., R. Regnery, P. Jameson, C. Greene, and D. C. Krause.** (1995).Differentiation of Bartonella-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J. Clin.Microbiol*. 33:1797-1803
- Nutter, F.B., Dubey, J.P., Levine, J.F., Breitschwerdt, E.B., Ford, R.B., Stoskopf, M.K.** (2004) Seroprevalences of antibodies against Bartonella henselae and *Toxoplasma gondii* and fecal shedding of *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.*, and *Toxocara cati* in feral and pet domestic cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225:1394-1398.
- Ohad, D.G., Morick, D., Avidor, B., Harrus, S.(2010) Molecular detection of Bartonella henselae and Bartonella koehlerae from aortic valves of Boxer dogs with infective endocarditis. Vet Microbiol . 141(1-2):182-185..**
- Onteniente, L., Brisse, S., Tassios, P.T. Vergnaud, G.** (2003) Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for Pseudomonas aeruginosa strain typing. *J Clin Microbiol*. 41:4991-497.
- O'Reilly K.L., Bauer R.W., Freeland R.L., Foil L.D., Hughes K.J., Rohde K.R., Roy A.F., Stout R.W., Triche P.C.** (1999) Acute clinical disease in cats following infection with a pathogenic strain of .(LSU16). *Infect Immun* 67: 3066-3072.

- O'Reilly, K.L., Parr, K.A., Brown, T.P., Tedder-Ferguson, B., Scholl, D.T. (2001) Passive antibody to *Bartonella henselae* protects against clinical disease following homologous challenge but does not prevent bacteremia in cats. *Infect Immun.* **69**(3):1880-2.
- Ormerod, L.D., Dailey J.P (1999) Ocular manifestations of cat-scratch disease. *Curr.Opin.Ophthalmol.* 10:209-216.
- Ormerod, L.D., Skolnick, k.A., Menosky, M.M., Pavan, P.R., Pon, D.M. (1998) Retinal and choroidal manifestations of cat-scratch disease. *Ophthalmology* .105:1024-1031.
- Oura, C.A., Odongo, D.O., Lubega, G.W., Spooner, P.R., Tait, A. Bishop, R.P. (2003) A panel of microsatellite and minisatellite markers for the characterisation of field isolates of *Theileria parva*. *Int J Parasitol.* 33:1641-53.
- Overduin, P., Schouls, L., Roholl, P., van der Zanden, A., Mahmmod, N., Herrewegh, A., van Soolingen, D. (2004) Use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol.* **42**(11): 5022-8.
- Pape, M., Kollaras, P., Mandraveli, K., Tsona, A., Metallidis, S., Nikolaidis, P., Alexiou-Daniel, S.(2005) Occurrence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* among human immunodeficiency virus-infected patients. *Ann N Y Acad Sci.* 1063:299-301.
- Pappalardo, B.L., Brown, T., Gookin, J.L., Morrill, C.L., Breitschwerdt, E.B. (2000) Granulomatous disease associated with Bartonella infection in two dogs. *J. Vet. Intern Med.* 14:37-42.
- Parinaud, H. (1889) Conjonctivite infectieuse paraissant transmise à l'homme par les animaux. *Recueil ophthalmologique.* 11:176-8.
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J. and Ho"o"k. M. (1994) MSCRAMM mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:585-617.
- Patti, J.M., Jönsson, K., Guss, B., Switalski, L.M. and Wiberg. K.M (1992) Molecular characterization and expression of a gene encoding a S. aureus collagen adhesin. *J. Biol. Chem.* 267:4766-4772.
- Perkocha, L.A., Geagham, S.M., Yen, T.S.B., Nishimura, S.L., Chan, S.P., Garcia-Kennedy, R., Honda, G., Stoloff, A.C., Klein, H.Z., Goldman, R.L., Van Metter, S., Ferrell, L.D., LeBoit, P.E. (1990) Clinical and pathological features of bacillary peliosis hepatis in association with human immunodeficiency virus infection . *New Engl. J. Med.* 323:1581.
- Pitulle, C., Strehse, C., Brown, J.W., Breitschwerdt, E.B. (2002). Investigation of the phylogenetic relationships within the genus Bartonella based on comparative sequence analysis of the rnpB gene, 16S rDNA and 23S rDNA. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52:2075-2080.
- Plettenberg, A., Lorenzen, T., Burtsche, BT., Rasokat, H., Kaliebe,T., Albrecht, H., Mertenskötter, T., Bogner, JR., Stoehr, A., Schöfer, H. (2000) Bacillary angiomatosis in HIV-infected patients--an epidemiological and clinical study. *Dermatology* .**201**(4):326-31.

- Podsiadly, E., Sokolowska, E., Tylewska-Wierzbanowska, S.** (2003) Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* infections in Poland in 1998-2001. *Ann. NY Acad. Sci.* 990: 407-408.
- Pons, I., Sanfeliu, I., Quesada, M., Anton, E., Sampere, M., Font, B., Pla, J., Segura, F.** (2005) Prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Catalonia, Spain. *Am J Trop Med Hyg.* 72(4):453-7.
- Pourcel, C., Andre-Mazeaud, F., Neubauer, H., Ramiisse, F. Vergnaud, G.** (2004) Tandem repeats analysis for the high resolution phygenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol* 4 :22.
- Pourcel, C., Visca, P., Afshar, B., D'Arezzo, S., Vergnaud, G., Fry, N.K.** (2007) Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *J Clin Microbiol.* 45(4):1190-9.
- Pourcel, C., Vidgop, Y., Ramiisse, F., Vergnaud, G. & Tram, C.** (2003). Characterization of a tandem repeat polymorphism in *Legionella pneumophila* and its use for genotyping. *J Clin Microbiol.* 41:1819-1826.
- Premachandra, D.J., Milton, C.M.** (1990) Cat scratch disease in the parotid gland presenting with facial paralysis. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 28(6):413-5.
- Pretorius, A.M., Kelly, P.J., Birtle,s R.J., Raoult, D.** (1999) Isolation of *Bartonella henselae* from a serologically negative cat in Bloemfontein, South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 70:154-155.
- Ramiisse, V., Houssu, P., Herandez, E., Denoeud, F., Hilaire, V., Lisanti, O., Ramiisse, F., Cavallo, J.D. Vergnaud, G.** (2004) Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica subsp. Enterica* for typing purposes. *J Clin Microbiol* 42:5722-30.
- Raoult, D** (1999) Infections humaines à *Bartonella*. *La Presse médicale.* 8 :429-434.
- Raoult, D.** (2006). Etiological diagnosis of blood-culture-negative endocarditis. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 24(5):295-6.
- Raoult, D., Fournier, P.E., Drancourt, M., Marrie, T.J., Etienne, J., Cosserat, J., Cacoub, P., Poinsignon, Y., Leclercq, P. and Sefton, A.M.** (1996) Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditid. *Ann Intern Med.* 125 (8): 646-52.
- Reed, J.B, Scales, D.K., Wong, M.T., Lattuada, Jr C.P., Dolan, M.J., Schwab, I.R.** (1998) *Batonella henselae* neuroretinitis in cat scratch disease. Diagnosis, management, and sequelae. *Ophthalmology* 105:459-66.
- Regnery, R., Martin, M., Olson, J.** (1992) Naturally occurring *Rochalimaea henselae*. infection in domestic cat. *Lancet.* 340: 557-558.
- Reiss, T., Andersson, Siv G.E ,Lupas, A., Schaller, M., Schäfer, A., Kyme, P., Martin, J., Wälzlein, J., Ehelt, U., Lindroos, H., Schirle, M., Nordheim, A.,**
- Autenrieth, I.B.,& Kempf, V.A.J.** (2004) *Bartonella* Adhesin A Mediates a Proangiogenic Host Cell Response. *JEM.* 200:1267-1278.
- Reiss,T., Günter, R., Linke, D., Schäfer, A & Volkhard A. J. Kempf.** (2007). Analysis of *Bartonella* Adhesin A Expression Reveals Differences between Various *B.henselae* Strains. *Infection and Immunity* .75: 35-43.

- Renesto, P., Gouvernet, J., Drancourt, M., Roux, V., Raoult, D.** (2001) Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol.* **39**(2):430-7.
- Robson, J.M., Harte, G.J., Osborne, D.R., McCormack, J.G.** (1999) Cat-scratch disease with paravertebral mass and osteomyelitis. *Clin. Infect. Dis.* **28**: 274-278.
- Rodriguez-Barradas, M. C., Hamill, R. J., Houston, E. D., Georghiou, P. R., Clarridge, J. E., Regnery, R. L. & Koehler, J. E.** (1995). Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species an isolates. *J Clin Microbiol.* **33**:1089-1093.
- Rolain, J.M., Fournier, P.E., Raoult, D., Bonerandt, J.J.** (2003) First isolation and detection by immunofluorescence assay of *Bartonella Koehlerae* in erythrocytes from a French cat. *J. Clin Microbiol.* **41**:4001-4002.
- Rolain, J.M., Locatelli, C., Chabanne, L., Davoust, B., Raoult, D.** (2004). Prevalence of *Bartonella claridgeiae* and *Bartonella henselae* in domestic cats from France and detection of the organisms in erythrocytes by immunofluorescence. *Clin Diagn Lab Immunol.* **11**:423-425.
- Rosche, W. A., Jaworski, A., Kang, S., Kramer, S.F., Larsson, J.E., Geidroc, D.P., Wells, R.D. and Sinden, R.R.** (1996) Single-stranded DNA-binding protein enhances the stability of CTG triplet repeats in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **17**-(16): 5042–5044.
- Rosenberg, S. M., Longerich, S., Gee, P. and Harris, R. S.** (1994) Adaptive mutation by deletions in small mononucleotide repeats. *Science.* **265**: 405-407.
- Roux, V., Eykyn, S.J., Wyllies, S., Raoult, D.** (2000) *Bartonella vinsonii subsq. Berkoffii* as ab agent of a febril blood culture-negative endocarditis in human. *Clin Microbiol.* **38**:1698-700.
- Roux, V., Raoult, D.** (1995) The 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *Bartonella (Rochalimaea)* species is longer than usually described in other bacteria. *NEJM's.* **156** (1):107-11.
- Sabat , A., Kryszton-Russjan, J., Strzalka, W., Filipek, R., Kosowska, K., Hryniewicz, W., Travis, J. Potempa, J.** (2003) New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol.* **41**:1801-4.
- Salaün, L., Audibert, C., Le Lay, G., Burucoa, C., Fauchere, J.L. et Picard, B.**(1998). Panmictic structure of *Helicobacter pylori* demonstrated by the comparative study of six genetic markes. *FEMS. Microbiol. Lett.* **161**:231-239.
- Salaün, L., Mérien, F., Gurianova, S., Baranton, G., Picardeau, M.** (2006) Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* **44**(11):3954-62.
- Sander, A., Berner, R., Ruess, M.** (2001) Serodiagnosis of Cat Scratch Disease : Response to *Bartonella henselae* in Children and review of diagnosis methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **20**:392-401.
- Sander, A., Buhler, C., Pelz K., von Cramm E., Bredt, W.** (1997) Detection and identification of two variants in domestic cats in Germany. *J. Clin. Microbiol.* **35**:584-587.

- Sander, A., Ruess, M., Deichmann, K., Böhm, N., Bredt, W.** (1998) Two different genotypes of *Bartonella henselae* in children with cat-scratch disease and their pet cats. *Scand J Infect Dis*.**30**(4):387-91.
- Sawires, Y.S., Songer, J.G.** (2005) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*. **11**(5):262-72.
- Schouls, L.M., Van der Heide, H.G., Vauterin, L., Vauterin, P., Mooi, F.R.** (2004) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. *J Bacteriol*. **186**(16):5496-505.
- Schouls, L.M., van der Ende, A. Damen, M. van de Pol, I.** (2006) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Neisseria meningitidis* yields groupings similar to those obtained by multilocus sequencing. *J Clin Microbiol*. **44**:1509-18.
- Schröder, G. & Dehio, C.** (2005) Virulence associated type IV secretion systems of Bartonella. *Trends Microbiol*. **13**: 336-342.
- Schulein, R., Seubert, A., Gille, C., Lanz, C., Hansmann, Y., Piemont, Y. and St Geme, JW. 3rd., Cutter, D.** (2000) The Haemophilus influenzae Hia adhesion is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J Bacteriol*. **182**:6005-6013.
- Schwartz, D. C., Saffran, W., Welsh, J., Haas, R., Goldenberg, M., Cantor, C. R.** (1982) New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*,**XLVII**:189-195.
- Sharples, G.J., Lloyd, R.G.** (1990) A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res*. **18**(22):6503-8.
- Simpson, E. H.** (1949) Measurement of diversity. *Nature* (London):163:688.
- Singh L.** (1995) Biological significance of minisatellites. *Electrophoresis*.**16**(9):1586-95.
- Slack, A. T., Dohnt, M. F., Symonds, M. L. & Smythe, L. D.** (2005).Development of a multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. **30**:1-10.
- Slater, L. N., Welch, D. F., Hensel, D. & Coody, D. W.** (1990). A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. *N Engl J Med* **323**:1587-1593.
- Slater, L.N., Welch, D.F. and Min, K.W.** (1992) *Rochalimaea henselae* causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatic. *Arch. Intern. Med*. **152**:602-606.
- Smith, J.M., Smith, N.H., O'Rourke, M. et Spratt, B. G.** (1993) How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**:4384-8.
- Sondermeijer, H.P., Class, E.C., Orendi, J.M. and Tamsma, J.T.** (2006) *Bartonella quintana* prosthetic endocarditis detected by blood culture incubation beyond 10 days. *Eur. J. Intern. Med*. **17**:441-443.
- Spach, D.H., Kanter, A.S., Dougherty, M.J., Larson, A.M., Coyle, R.M.B., Swaminathan, B., Brenner, D.J., Matar, G.M., Welch, D.F., Root, R.K. and Spach, D.H., Panther, L.A., Thorning, D.R., Dunn, J.E, Plorde, J.J, Miller, R.A.** (1992) Intracerebral bacillary angiomatosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Ann Intern Med*. **116**:740-742.

- Spratt B. G., Maiden M. C. J.** (1999) Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 354:701-710.
- Spurgiesz, RS., Quitugue, TN., Smith, KL.** (2003) Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by using nine novel variable number tandem repeats across the Beijing family and low copy number IS6110 isolates. *J Clin Microbiol*. 41:4224-4230.
- Stamm, W.E.** (1995) Bartonella (Rochalimaea) quintana bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. *N.Engl.J.Med*. 332:424-428.
- St Geme, J.W. 3rd, Cutter, D.** (2000) The Haemophilus influenzae Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J Bacteriol*. 182(21):6005-13.
- Stern, M. J., Ames, G. F., Smith, N. H., Robinson, E. C. et Higgins, C. F.** (1984) Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*. 37:1015-26.
- Stern, M. J., Prossnitz, E., and Ames. G. F.-L.** (1988) Role of the intercistronic region in post-transcriptional control of gene expression in the histidine transport operon of *Salmonella typhimurium*: involvement of REP sequences. *Mol. Microbiol*. 2:141-152.
- Stoler, M.H., Bonfiglio, T.A., Steigbigel, R.T., Pereira, M.** (1983) An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Clin Pathol*. 80(5):714-8.
- Stragier, P., Ablordey, A., Meyers, W.M. Portaels, F.** (2005) Genotyping *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Bacteriol*.187:1639-47.
- Struelens, M. J. (1996).Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *ClinMicrobiol. Nfect*. 2:2-11.
- Stull, T.L., LiPuma, J.J., Edlind, T.D.**(1988) A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *J Infect Dis*. 157(2): 280-6.
- Supply, P.E., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., Van Soolingen, D& Lotch, C.** (2001) Automated high throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interested repetitive units. *J Clin Microbiol* .39:3563-3571.
- Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B. Locht, C.** (2000) Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol*. 36: 762-71.
- Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K., Homan, W.L.**(2006) Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Lett*. 254(2):268-74.
- Sawires YS, Songer JG.** (2005) Clostridium perfringens: insight into virulence evolution and population structure. *Anaerobe*. 12(1): 23-43
- Sykes, J.E., Kittleson, M.D., Pesavento, P.A., Byrne, B.A., MacDonald, K.A., Chome,I B.B.** (2006) Evaluation of the relationship between causative organisms and clinical characteristics of infective endocarditis in dogs: 71 cases (1992–2005). *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 228: 1723-1734.

- Szczesny, P., Linke, D., Ursinus, A., Bar, K., Schwarz, H.M., Riess, T.A.J., Kempf, V.N., Lupas, A., Martin, J., Zeth, K. (2008). Structure of the head of Bartonella Adhesion. *BadA* 4(8): e1000119. doi 10.1371/journal.ppat.1000119.
- Tappero, J.W., Koehler, J.E., Berger, T.G., Cockrell, C.J., Lee, T.H., Busch, M.P., Stites, D.p., Mohle-Boetani, J. C., Rringold, A.L. and LeBoit, P.E. (1993) Bacillary angiomatosis and bacillary splenitis in immunocompetent adults. *Ann. Intern. Med.* 118: 363-365.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, H., Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33(9): 2233-9.
- Theiss, P., and Wise, K.S. (1997) Localized frameshift mutation generates selective, high-frequency phase variation of a surface lipoprotein encoded by a mycoplasma ABC transporter operon. *J. Bacteriol.* 179: 4013-4022.
- Titze-de-Almeida, R., Willems, R.J., Top, J., Rodrigues, I.P., Ferreira, R.F 2nd., Boelens, H., Brandileone, M.C., Zanella, R.C., Felipe, M.S., Van Belkum, A. (2004) Multilocus variable-number tandem-repeat polymorphism among Brazilian *Enterococcus faecalis* strains. *J Clin Microbiol.* 42(10):4879-81.
- Top, J., Schouls, L.M., Bonten, M.J., Willems, R.J. (2004) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol.* 42: 4503-1.
- Truman, R., Fontes, A.B., De Miranda, A.B., Suffys, P., Gillis, T. (2004) Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol.* 42(6): 2558-65.
- Tsujino, K., Tsukahara, M., Tsuneoka, H., Ichihara, K., Furuya, T., Kawachi, S., Oga, A., Sasaki, K. (2004) Clinical implication of prolonged fever in children with cat scratch disease. *J. Infect. Chemother.* 10: 227-233.
- Tsukahara, M., Tsuneoka, H., Iino, H., Ohno, K., Murano, I. (1998) *Bartonella henselae* infection from a dog. *Lancet.* 352:1682.
- Ueno, H., Hohdatsu, T., Muramatsu, Y., Koyama, H., Morita, C. (1996) Does coinfection of *Bartonella henselae* and FIV induce clinical disorders in cats. *Microbiol Immunol.* 40:617-620.
- Ueno, H., Muramatsu, Y., Chomel, B.B., Hohdatsu, T., Koyama, H. and Morita, C. (1995) Seroepidemiological survey of *Bartonella (Rochalimaea) henselae* in domestic cats in Japan. *Microbiol. Immunol.* 39:339-341.
- Uhlen, M., Guss, B., Bjorn, Q., Teni, N., Gatenbeck, Lennar Pt hilipson, and Martin Lindberg. (1984) Complete Sequence of the Staphylococcal Gene Encoding protein A: Gene evolved through multiple duplications. *The Journal of biological chemistry.* 259(3):1695-1702.
- U'Ren, J.M., Schupp, A.M., Pearson, T., Hornson, H., Friedman, C.L., Smith, K.L., DeSgthy, R.R., Rhoton, S.D., Leadem, B., Georgia, S., Cardon, M., Huynh, L.Y., DeShazer, D., Harvey, S.P., Robison, R., Gal, D., Mayo, M.J., Wagner, D., Currie,

- B.J., Keim, P.** (2007) Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. *BMC Microbiol.* 7:23.
- Van Alphen, L., Geelen van den Broek, L., van Ham, M. et Dankert, .** (1991) *Infect. Immun.* 59:4473-4477.
- Van Belkum, A., Scherer, S., Van Leeuwen, W., Willemse, D., Van Alphen, L., Verbrugh, H.** (1997) Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun.* 65:5017-27.
- Van der Berg, R.J., Shaap, I., Templeton, K.E., Klaassen, C.H., Kuijper, E.J.**(2007) Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *J.Clin Microbiol.* 45:1024-8.
- Van der Ende, A., Hopman, C.T., Zaat, S., Essink, B.B., Berkhout, B. And Dankert, J.** (1995) Variable expression of class I outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by variation in the spacing of the 210 and 235 regions of the promoter. *J. Bacteriol.* 177: 2475-2480.
- Van Ham, S.M., Van Alphen, L., Mooi, F.R., and Van Putten, J.P.M.** (1993) Phase variation of *H. influenzae* fimbriae: transcriptional control of two divergent genes through a variable combined promoter region. *Cell* .73: 1187-196.
- Van Putten, J.P.M.** (1993). Phase variation of lipopolysaccharide directs interconversion of invasive and immuno-resistant phenotypes of *N.gonorrhoeae*. *EMBO J.* 12:4043-4051.
- Vanhee LM, Symoens F, Jacobsen MD, Nelis HJ, Coenye T.** (2009) Comparison of multiple typing methods for *Aspergillus fumigatus*. *Clin Microbiol Infect.*15(7):643-50.
- Van Tooren, R.M., Van Leusen, R., Bosch, F.H.** (2001) Culture negative endocarditis combined with glomerulonephritis caused by *Bartonella* species in two immunocompetent adults. *Neth. J.Med.* 59: 218-224.
- Velho, P.E., Cintra, M.L., Uthida-Tanaka, A.M., De Moraes, A.M., Mariotto, A.** (2003) What do we (not) know about the human bartonellosis?. *Braz.J.Infect.Dis.* 7:1-6.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R.** (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19(24): 6823-31.
- Virji, M., Weiser, J.N., Lindberg, A.A., and Moxon, E.R.** (1990) Antigenic similarities in lipopolysaccharides of *Haemophilus* and *Neisseria* and expression of a digalactoside structure also present on human cells. *Microb.Pathog.* 9: 441-50.
- Vu-Thien, H., Corbineau, G., Hormigos, K., Fauroux, B., Corvol, H., Clement, A., Vergnaud, G. Pourcel, C.** (2007) Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 45:3175-83.
- Wade, N.K., Levi, L., Jones M.R., Bhisitkul R., Fine, L., Cunningham, E.T.Jr.** (2000) Optic disk edema associated with peripapillary serous retinal detachment: an early sign of systemic *Bartonella henselae* infection. *Am. J.Ophthalmol.* 130: 327-334.
- Walls, T., Moshal, K., Trounce, J., Hartley, J., Harris, K. and Davies, G.** (2006) Broad-range polymerase reaction for the diagnosis of *Bartonella henselae* endocarditis. *J. Paediatr. Child Health.* 42: 469-471.

- Weiser, J.N., Love, J.M. and Moxon, E.R.** (1989) The molecular mechanism of phase variation of *H. influenzae* lipopolysaccharide. *Cell*. 59: 657–665.
- Weiser, J.N., Maskell, D.J., Butler, P.D., Lindberg, A.A. and Moxon, E.R.** (1990) Characterization of repetitive sequences controlling phase variation of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 172: 3304-3309.
- Weiss, E., Mamay, H.K. and Dash, G.A.** (1982) Ornithine metabolism in the genus *Rochalimaea*. *J Bacteriol.* **150**(1):245-50.
- Welch, D.F., Carroll, K.C., Hofmeister, E.K., Persing, D.H., Robinson, D.A., Steigerwalt, A.G. and Brenner, D.J.** (1999) Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii* subsp. *Arupensis*, from a cattle rancher: identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among naturally mice. *J Clin Microbiol.* **37**(8): 2598-601.
- Welch, D.F., Hensel, D.M., Pickett, D.A., San Joaquin, V.H., Robinson, A., Slater, L.N.** (1993) Bacteremia due to *Rochalimaea henselae* in a child: practical identification of isolates in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 31:2381-2386.
- Welch, D.F., Pickett, D.A., Slater, L.N., Steigerwalt, A.G. and Brenner, D.J.** *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillar angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. *J. Clin. Microbiol.* 30:275-280.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. et Tingey, S.V.** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Wise J.K., Heathcott, B.L, Gonzalez, M.L.** (2002) Results of the AVMA survey on companion animal ownership in US pet-owning households. *J Am Vet Med Assoc.* 221: 1572-1573.
- Witonski, D., Stefanova, R., Ranganathan, A., Schutze, G.E., Eisenach, K.D. Cave, M.D.** (2006) Variable-number tandem repeats that are useful in genotyping isolates of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovars *Typhimurium* and *Newport*. *J Clin Microbiol* 44 :3849-54.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* **51**(2):221-71.
- Woude, M.W., Van der , Baumler, M.J.** Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* **17**(3): 581-611.
- Yamamoto, K., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Hew, C., M., Weber, D.K., Lee, W.I.** (2002) Experimental infection of specific pathogen free (SPF) cats with two different strains of *Bartonella henselae* type I: a comparative study. *Vet Res.* 3:669-684.
- Yates, M.T.** (1997) Ease of isolation and semiquantitative culture of *Bartonella henselae* from cats in Melbourne. *Pathology.* **29**(3):333-4.
- Yogev, D., Rosengarten, R., Watson, R. and Wise, K.S.** (1991). Molecular basis of *Mycoplasma* surface antigenic variation: a novel set of divergent genes undergo spontaneous mutation of periodic coding regions and 59 regulatory sequences. *EMBO J.* 10:4069-4079.
- Yother, J. and Briles. D.E.,** (1992) Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. *J. Bacteriol.* 174:601-609.

- Zangwill, K.M., Hamilton, D.H., Perkins, BA.**(1993) Cat-scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test. *N Engl. J. Med.* 329: 8-33.
- Zaror, L., Ernst, S., Navarette, M., Ballesteros, A., Boroscheck, D., Ferres, M., Thibaut, J.** (2002) Serologic detection of *Bartonella henselae* in cats in the city of Valdivia, Chile. *Asch. Med. Vet.* 34:103-110.
- Zbinden, R., Hochli, M., Nadal, D.** (1995) Intracellular location of *Bartonella henselae* cocultivated with Vero cells and used for an indirect antibody test. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2(6): 693-5.
- Zeaiter, Z., Fournier, P.E., Ogata, H., Raoult, D.** (2002) Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing groEL sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52(Pt 1):165-71.
- Zeaiter, Z., Fournier, P.E., Raoult, D.** (2002) Genomic variation of *Bartonella henselae* strains detected in lymph nodes of patients with cat scratch disease. *J Clin Microbiol.* 40(3):1023-30.
- Zeaiter, Z., Liang, Z., Raoult, D.** (2002) Genetic classification and differentiation of *Bartonella* species based on comparison of partial *ftsZ* gene sequences. *J Clin Microbiol.* 40(10):3641-7.
- Zheng, X., Teng, L., Watson, H.L., Glass, J.I., Blanchard, A. and Cassell. G.H** (1995) Small repeating units within the *Ureaplasma urealyticum* MB antigen gene encode serovar specificity and are associated with antigen size variation. *Infect. Immun.* 63:891-898.
- Zhu, Y., Queller, D., Strassmann, J.E.** (2000). A phylogenetic perspective on sequence evolution in microsatellite loci. *J. Mol. Evol.* 50:324-338.
- Yong Zhu, Pierre-Edouard Fournier, Hiroyuki Ogata, and Didier Raoult** (2005) Multispacer Typing of *Rickettsia prowazekii* Enabling Epidemiological Studies of Epidemic Typhus. *Journal of Clinical Microbiology.* 43(9):4708-4712
- Ziebuhr, W., Ohlsen, K., Karch, H., Korhonen, T. and Hacker. J.** (1999). Evolution of bacterial pathogenesis. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 56:719-728

ANNEXES

**Annexe 1 : Tableau récapitulatif des espèces et sous espèces de Bartonella validés
par la comité**

<i>Bartonella spp</i>	Réservoir	Vecteur	Hôte accidentel	Pathologies	Distribution géographique	1 ^{ère} description
<i>B. alsatica</i>	Lapin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Inconnu	Homme	Endocardite	Europe	Heller <i>et al.</i> , 1999
<i>B. bacilliformis</i>	Homme	Phlébotome	Inconnu	Maladie de Carion	Cordillères des Andes	Barton 1909
<i>B. bovis</i>	Ruminants, Bovin (Bos taurus)	<i>Hippoboscidae</i>	Homme, Chat ?	Endocardite	Amérique nord Europe	Bermond <i>et al.</i> , 2002
<i>B. birtlesi</i>	<i>Apodemus</i> sp	Puces (<i>Ctenocephalimus nobilis</i>)	Inconnu	?	Europe	Bermond <i>et al.</i> , 2002
<i>B. capreoli</i>	Chevreuil Chèvre (<i>Capreolus capreolus</i>)	<i>Hippoboscidae</i>	Inconnu	?	Europe	Bermond <i>et al.</i> , 2002
<i>B. chomelii</i>	Ruminants	Inconnu	Inconnu	?	Europe	Maillard <i>et al.</i> , 2004
<i>B. clarridgeiae</i>	Chat (<i>Felis catus</i>)	<i>Ctenocephalides felis</i>	Homme, Chien	MCG	Amérique du nord Europe	Lawson and Collins 1996
<i>B. doschia</i>	Campagnol agreste	Inconnu	Inconnu	?	Europe	Birtles <i>et al.</i> , 1995
<i>B. elizabethae</i>	Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	<i>Xenopsylla cheopis</i>	Homme, Chien	Endocardite	Amérique du nord	Daly <i>et al.</i> , 1993
<i>B. grahamii</i>		Puce	Homme	Neurorétinite	Europe	Bermond <i>et al.</i> , 2002
<i>B. henselae</i>	Chat (<i>Felis catus</i>)	<i>Ctenocephalides felis</i>	Homme, Chien, Cheval	MCG	Mondiale	Slater <i>et al.</i> ,
<i>B. koehlerae</i>	Chat	<i>Ctenocephalides felis</i>	Homme	Endocardite	Amérique du nord	Droz <i>et al.</i> , 1999
<i>B. phoceensis</i>	Rat (<i>Rattus rattus</i> ?)	Puce ?	Inconnu	?	Europe	Gundi <i>et al.</i> , 2004
<i>B. quintana</i>	Homme	<i>Pediculus humanis corporis</i>	Inconnu	Fièvre de tranchée	Mondiale	Schminke <i>et al.</i> , 1917
<i>B. rattimassiliensis</i>	Rat (<i>Rattus rattus</i> ?)	Puce ?	Inconnu	?	Europe	Gundi <i>et al.</i> , 2004
<i>B. rochalimae</i>	Renards roux et gris	Inconnu		?	Pérou	Eremeeva <i>et al.</i> , 2007
<i>B. schoenbuchensis</i>	Chevreuil Chèvre <i>Capreolus capreolus</i>	<i>Hippoboscidae</i> ?	Inconnu	?	Europe	Dehio <i>et al.</i> , 2001
<i>B. talpae</i>	Taube	Inconnu	Inconnu	?	Europe	Birtles <i>et al.</i> , 1995
<i>B. tami</i>	Tamias	Inconnu		?		
<i>B. tribocorum</i>	Rat (<i>Rattus rattus</i> ?)	Puce ?	Inconnu	?	Europe	Heller <i>et al.</i> , 1998
<i>B. taylori</i>	Rongeurs	Inconnu	Inconnu	?	Europe	Birtles <i>et al.</i> , 1995
<i>B. vinsonii</i>	Rongeurs	Inconnu	Inconnu	?	Amérique du nord	Weis and Dash 1982
<i>Subsp. Berkhoffii</i>	Coyote (<i>Canis latrans</i>)	Inconnu (<i>Ixodes</i> spp ?)	Homme	Endocardite	Europe, Amérique	Kordick <i>et al.</i> , 1996
<i>Subsp. Arupensis</i>	<i>Peromyscus leucopus</i>	Inconnu (puce ? tiques)	Homme	Endocardite	Amérique du nord	Welch <i>et al.</i> , 1999
<i>B. waschoensis</i>	Ecureuil (<i>Spermophilus beecheyii</i>)	Inconnu (puce ?)	Inconnu	Endocardite		

ANNEXE 2 : Caractéristiques de 5 enzymes polymérases testées

Taq Takara	Taux faible de mutation, amplification de fragments génomique de 20 k.b
Taq Eppendorf	Thermostable, utilisé en PCR standard, Haut rendement, bonne spécificité, taux de Mg ²⁺ auto-ajustable
Polymérase Q Biogen (Isis <i>Pyrococcus</i>)	issue de l'archéobactérie <i>Pyrococcus abyssi</i> , haut rendement, amplification des grands fragments d'ADN , Bonne relecture.
Taq Triple Master	Amplification des produits extrêmement longs, rendement élevé, faible taux d'erreur assuré par la relecture, pratique et économique, un taux de Mg ²⁺ auto-ajustable
Taq Invitrogen Pfx <i>Platinum</i> (Invitrogen)	Haute fidélité, bonne relecture, « Hot start »

ANNEXE 3 : Protocoles PCR Pour les 5 Taqs testés

dNTP à 10mM
Primers à 10mM

Mix Takara :

Réactifs	Volume (µl)
Tp 10x	2.5
dNTP	2
primer R	2
primer F	2
Taq Takara Ex 0,75µl	0.15
ADN lysat	5
Eau qsp	25

Mix Eppendorf normal :

Réactifs	Volume (µl)
Tp 10x	2.5
dNTP	2
primer R	2
primer F	2
Taq Eppendorf	0.2
ADN lysat	5
Eau qsp	25

Mix Eppendorf Master :

Réactifs	Volume (µl)
Master Mix	10
primer R	2
primer F	2
AND purifié	2
Eau qsp	15

Mix Eppendorf Triple Master : protocole haute fidélité :

Réactifs	Volume (µl)
buffer HF	3.2
primer R	2
primer F	2
dNTP	2
Taq pol	0.4
ADN lysat	5
Eau qsp	10

Mix Eppendorf Triple Master : protocole G-C rich :**Mix 1:**

Réactifs	Vol (µl)
Eau qsp	10
DMSO 3%	0.6
Buffer HF	1.5
Primer R	2
Primer F	2
DNA lysat	5

Mix 2:

Réactifs	Vol (µl)
eau qsp	10
buffer HF	3.2
dNTP	2
Taq pol	0.2
DNA lysat	5

Mix Taq maison à 1unité/µl :

Réactifs	Vol (µl)
Tp 10x Takara	2,5
primer R	2
primer F	2
dNTP	2
Taq polymérase	1
ADN	5
Eau qsp	25

Mix PCR Invitrogen :**Mix 1**

Réactifs	Volume (µl)
Tp 10x Takara	2.5
dNTP Takara	2.0
MgSO4	0.5
primer R	2.0
primer F	2.0
Taq pol 1u	0.4
Enhancer buffer	2.5
ADN purifié	2
Eau qsp	25

Mix 2

Réactifs	Volume (µl)
Tp 10x	2.5
dNTPInvitrogen	0.5
MgSO4	0.5
primer R	2.0
primer F	2.0
Taq pol 1u	0.4
Enhancer buffer	2.5
ADN purifié	2
Eau qsp	25

CAS PARTICULIER :**Polymérase Q Biogen : ISIS Pyrococcus (volume 50µl)****Pas d'élongation terminale****Concentration en dNTP et présence de DMSO variables**

Réactifs	Volume (µl)
Tp 10x	5
dNTP	0,8
primer R	5
primer F	5
Isis 1u	1
Eau qsp	45
ADN	5

Réactifs	Volume (µl)
Tp	5
dNTP	2
primer R	5
primer F	5
Isis 1u	1
M5O 1,5%:	1
Eau qsp	45
ADN	5

ANNEXE 4 : Carte montrant la prevalence de *B. henselae* chez les chats en Thaïlande

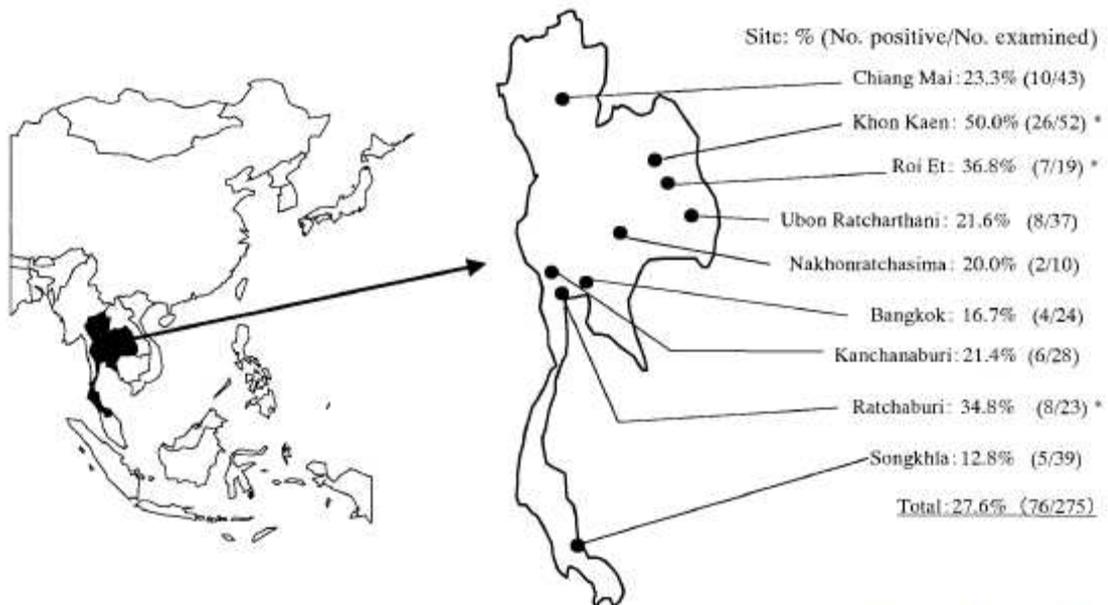
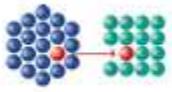


FIGURE 1. Prevalence of *Bartonella* species among domestic cats in Thailand. *Statistically significant from the rate of Songkhla site ($P < 0.05$)

ANNEXE 5 : Caractéristiques des amorces des VNTRs localisées dans trw

Nom du VNTR	Séquences des amorces
Trw N	F :CGACATACAAGAATCATCGG R :AATCAGAGAGAGACACGC
trwL4	F : CGTGATTATCGCTGGTTC R :GCTATGACAACACCTATTCC
TrwL5	F :GGAATAGGTGTTGTCATAGC R :GACGCCAATAGCCAC
TrwL6a	F :CCATCAGTTGTAGATAAGCC R :TTTCTTCAGACTGCCGAGA
TrwL6b	F :CTCCTATCCATCAGTTGTAG R :TCCTTTTCAATGTAACGCC
TrwL7	F : CGGTGTTTTTTAGGGGTAG R : AATGACAACGCCAATAGCC
TrwL8a	F :AAAGGTTTAGAAATCCTCATAGG R :GGAAATGCTTCGTGTTTTGTG
TrwL8 b	F :CAACAAGCAAAGGTTTAGAAATCC R :GCTATGAGCCACAAGAAGAT
TrwJ1a	F :CCGTTTGGGAGATACTTG R : GCAAAAATGTTAGCCGACG
TrwJ1b	F :CGATAAAGCCGTAAGTTTTCAA R :TTGTTCTGCGTTGCGTAG
trwJ1a	F :AATCCGACACAAGGAACAC R : CGATGATGAAGAATGGTCC
trwI1a	F :AATGTCGGTTACACGCTTG R : GGCAAATGACTCTTGATAATACG
trwG	F : CAACGCAACAATACAACAGC R : GTTACATAGCGAATGCGATG
trwI1b	F :AATGTCGGTTACACGCTTG R : GGCAAATGACTCTTGATAATACG
trwE	F : GACTCATCGTCATAGTAGC R : CATCAAATGTGGTGGCATC
TrwF	F :CTACAGTTCCGTAATGACC R :TTGTCCCAAGCGTTTATCG

ANNEXE 6 : Le dernier chapitre de la thèse



Association Bernard Gregory
De la thèse à l'emploi

*Valorisation des compétences des docteurs
« un nouveau chapitre de la thèse ® »*

Ecole doctorale : ABIES (Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé)

Organisme de rattachement : Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro ParisTech)

Mentor : Mr Eric Birlouez

**Thème du projet de recherche ayant servi
de support à la thèse :**

**Séquences répétées chez *Bartonella henselae* : outils
de typage moléculaire et de recherche de mécanismes
adaptatifs aux différents hôtes vertébrés et
invertébrés**

Sujet académique de la thèse : Séquences répétées chez *bartonella henselae* par la technique MLVA et recherche des gènes adaptatifs aux différents hôtes vertébrés et invertébrés

Directrice de thèse : Mme Nadia HADDA

Date probable de soutenance de la thèse : Mai 2010

I. Cadre général et enjeux de la thèse

Parmi les nombreuses bactéries transmises par des arthropodes (tiques, puces, poux ...), les bartonelles sont des bactéries émergentes, qui infectent essentiellement l'homme et de nombreux mammifères tels que les carnivores domestiques (chiens, chats) ou sauvages (lions renards), les rongeurs (souris, écureuils, rats), les lagomorphes (lapins) et les ruminants (bovins). Dix espèces et sous-espèces sont pathogènes pour l'homme. Parmi elles, *Bartonella henselae* peut occasionner diverses maladies chez les personnes immunocompétentes, notamment la maladie dite « des griffes du chat » ; chez 5-10% de patients, cette bactérie peut provoquer des manifestations cliniques sévères : endocardites, encéphalites, neurorenites, osthéomélites. Chez les immunodéprimés, *B. henselae* peut induire une angiomatose bacillaire ou une péliose hépatique, affections graves voire mortelles. Les chiens infestés peuvent également présenter de graves manifestations cliniques.

Les chats jouent un rôle primordial dans le cycle de transmission de *B. henselae* puisqu'ils en sont à la fois le réservoir naturel et les vecteurs passifs. En effet, les contacts avec les chats, notamment en cas de griffure ou de morsure constituent un facteur de risque majeur pour l'infection humaine par *B. henselae*. Or, jusqu' à 40% des chats d'une région peuvent être porteurs de bartonelles durant une longue période de temps, sans manifester aucun signe clinique. La transmission entre chats fait intervenir des arthropodes, essentiellement des puces. Ces dernières peuvent aussi jouer un rôle dans la transmission de *B. henselae* à l'homme. Cependant l'absence d'outils de typage moléculaire appropriés n'a pas permis de démontrer de façon incontestable que la puce du chat était impliquée dans l'infection humaine. En outre, le rôle direct d'une source féline a rarement été démontré. Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à mettre au point un outil de différenciation moléculaire applicable à *B. henselae*, par le développement d'une technique MLVA (Multi-locus VNTR Analysis) pour *B. henselae*. La détermination de la diversité des souches et des marqueurs devait alors

permettre d'utiliser cet outil à des fins épidémiologiques, afin de rechercher la présence des marqueurs géographiques et de l'appliquer à des fins de traçabilité ; par ailleurs, l'outil pouvait répondre à des objectifs de recherche plus fondamentale : explorer les modalités

de transmission à l'homme, les interactions entre hôtes et bactéries ainsi les liens phylogénétiques qui pourraient exister entre les différentes souches.

2. La thèse dans son contexte

L'équipe au sein de laquelle j'ai réalisé ma thèse (890) fait partie d'une unité mixte de recherche (UMR BIPAR, Biologie moléculaire et immunologie parasitaires et fongiques), constituée de trois équipes. Cette unité, située sur le site de Maisons Alfort, dépend de trois tutelles :

Institut National de la recherche Agronomique (INRA)

Agence Française de Sécurité Alimentaire (AFSSA)

École Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA).

L'équipe 890 est centrée sur la thématique « Bactéries transmises par les arthropodes ». Ses différents axes de recherche sont les suivants :

- Déterminer les mécanismes moléculaires liés à la persistance de *Bartonella* sp. dans son hôte réservoir en utilisant le modèle d'infection homologue, *B. birtlesii* /souris.
- Étudier le portage des bactéries pathogènes dans leur vecteur hématophage. Étudier l'infection des herbivores par *Bartonella bovis*;
- Identifier des marqueurs moléculaires pour le typage des isolats de *B. henselae* et l'exploration de la diversité au sein de cette espèce.

Le groupe auquel j'appartenais dans l'équipe 890 s'intéresse plus particulièrement à la dernière thématique. En effet, les techniques déjà développées lorsque nous avons entamé notre travail étaient soit difficilement reproductibles et très lourdes, comme la technique d'ECP, soit coûteuses car basées sur le séquençage de neuf séquences intragéniques

(MLST). En outre, leur pouvoir discriminant était peu performant, surtout pour la technique MLST.

Notre groupe est constitué de deux enseignants chercheurs, d'un ingénieur de recherche et d'un étudiant en master 2.

Ma thèse a été encadrée par le docteur Nadia Haddad, enseignant chercheur à l'école Nationale Vétérinaire D'Alfort.

3. Ma propre insertion dans le contexte

Ma famille m'a toujours motivée à faire de longues études. Mon intérêt pour les sciences et plus particulièrement pour la biologie m'ont incitée à réaliser un cursus universitaire dans ce domaine. En 2001, j'ai obtenu mon diplôme de maîtrise en sciences naturelles (Faculté des sciences de Sfax - Tunisie) puis j'ai décidé de continuer mes études en France. Je me suis tout d'abord inscrite en maîtrise de biologie cellulaire et physiologie, qui a été validée par une expérience professionnelle de trois mois au sein du CNRS (laboratoire du centre de génétique moléculaire à GIF sur Yvette). Intéressée par l'activité de recherche, j'ai ensuite choisi de m'engager dans un master 2 recherche intitulé "Hôte - agent infectieux" à l'université de Versailles Saint Quentin et Évry Val d'Essonne. Cette formation a été suivie de six mois de stage à l'UMR BIPAR, unité dans laquelle j'ai ensuite réalisé ma thèse. En effet, au cours de mon stage de master 2, j'ai commencé à mettre au point la technique de typage par MLVA chez *B. henselae* et, à l'issue de ce travail de recherche, mon responsable m'a proposé dans le cadre d'un projet de thèse, de développer les applications de cette technique afin d'utiliser cet outil à des fins épidémiologiques et de recherche fondamentale. La perspective de poursuivre le travail de recherche que j'avais initié m'a séduite et j'ai donc accepté de m'engager dans la thèse proposée.

Je n'ai pas participé à la définition et à la programmation du projet car ce dernier avait été déjà défini avant mon arrivée dans l'unité. Cependant, j'ai participé assez précocement à sa mise en œuvre : J'ai pu, dès mon stage de master suivre l'évolution du projet et participer à ses inflexions, en assistant à la

plupart des réunions organisées par les différents membres de l'équipe lors de l'élaboration de mon futur sujet de thèse.

II. Déroulement, gestion et coût du projet

1-Cadrage du projet

Les facteurs de succès de ce projet reposaient essentiellement sur la mise au point de la technique (typage par MLVA) car toutes les recherches qui seront développées après dépendent totalement de cette dernière.

Les risques du projet de thèse étaient donc liés aux difficultés susceptibles d'empêcher ou de retarder la mise au point de cette technique. Parmi ces risques, on peut citer le choix de la polymérase (on a essayé plusieurs polymérases), les conditions de la PCR (T° d'hybridation, nombre de cycle, quantité et la qualité d'ADN) le choix des amorces...

Nous avons tenté d'anticiper ces risques ou d'en limiter l'impact négatif en sélectionnant seulement cinq souches pour la mise au point de la technique. Nous nous sommes aussi inspirés des autres travaux de typage moléculaire utilisant la technique MLVA effectués dans d'autres laboratoires sur d'autres bactéries (*Brucella*, *Yersinia*, *Bacillus* ...)

Pour identifier la diversité de *B. henselae* dans le monde, nous avons eu besoin d'un grand nombre de souches provenant de différentes régions du monde. Pour cela, nous avons établi un réseau de collaborations internationales, nos partenaires jouant le rôle des fournisseurs de matériels (souches/isolats/ADN). Ces partenaires ont joué aussi un rôle fondamental dans l'avancement du projet en contribuant aux réflexions sur le sujet. D'une part, tous sont des spécialistes de *B. henselae*, d'autre part, la plupart d'entre eux ont l'expérience d'au moins une des techniques de typage antérieurement développées.

2- Conduite du projet

Pour le bon déroulement et l'aboutissement du projet, plusieurs réunions ont été organisées pour mettre en place puis suivre mon travail. On peut citer :

- ✓ Des réunions scientifiques au sein de l'UMR associant enseignants-chercheurs, chercheurs, ingénieurs et étudiants. Deux ou trois fois par an j'ai présenté mes travaux à l'ensemble du laboratoire dans le cadre de ces réunions.

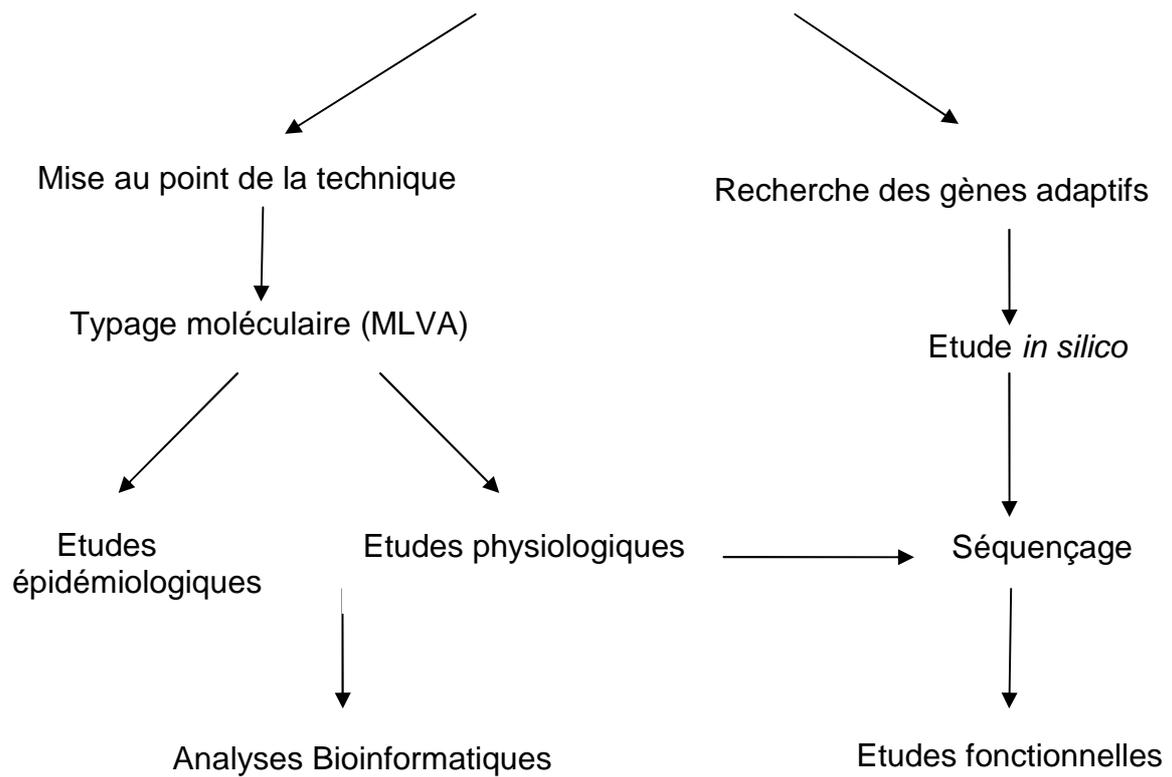
- ✓ Des réunions mensuelles de l'équipe, qui ont pour but le suivi de l'avancement des projets des divers membres de l'équipe dont le mien. Ces réunions sont aussi l'occasion de faire des comptes rendus des congrès ou des colloques, de s'informer sur les congrès nationaux et internationaux auxquels les étudiants peuvent participer afin de valoriser leur travail. Ces réunions servent aussi à discuter de divers aspects liés à la vie dans le laboratoire (nouveaux projets, mobilité des personnels, financements...)

- ✓ Un comité de pilotage a été mise en place pour superviser mes travaux de recherche. Il s'est réunit au moins une fois par an. Ses membres étaient mon encadrant de thèse, un spécialiste en bioinformatique (AFSSA), une spécialiste de la technique MLVA (Orsay – Paris Sud), un bactériologiste (Pr) de bactériologie(ENVA) et un Pr de parasitologie (ENVA).

- ✓ Des réunions hebdomadaires étaient organisées avec ma directrice de thèse, me permettant de faire très régulièrement le point sur mon travail. Nous nous réunissons une à deux fois par semaine selon la nécessité.

Les grandes étapes de la thèse

Structures répétées chez *Bartonella henselae*



Dès le départ, le projet de thèse a été élaboré sur trois ans mais vu que le financement que j'ai eu a été seulement sur deux ans donc, il ya eu des ajustements par rapport aux objectifs fixés au départ. Ces ajustements sont essentiellement des nouvelles stratégies que nous avons adoptées en fonction des résultats obtenus au cours de la thèse. Ces nouvelles orientations nous a permis d'aller creuser plus afin de découvrir d'autres pistes.

En effet, lors de ma première réunion de ma comité de thèse, les différents membres de cette dernière m'ont conseillé de négliger une partie et de se focaliser essentiellement sur une seule partie à condition de la bien détailler afin de tirer le maximum des résultats.

3. Evaluation du coût de mon projet

Cinq personnes participent au projet dans le groupe. Je suis la seule personne concentrée à temps plein sur ce projet, les autres personnes participent à ce travail de façon très ponctuelle car elles travaillent sur d'autres projets transversaux en parallèle

Catégorie	Salaire net (3 ans)(k euros)	% du temps
Doctorant	32.4	100
Étudiant en master 2	10.8	40
Ingénieur d'étude	64	20
Enseignant chercheur	1188	30

Matériels	Coût (K euros)
Consommables laboratoires	3
Réactifs chimiques	10
Logiciels informatiques	1
Appareils techniques	6
Formations	3

Le financement de ce projet provient de quatre tutelles de notre UMR qui est difficilement estimable. Ce financement permet l'achat des réactifs chimiques, des appareils, des logiciels de traitement des données, du matériel bureautiques et du consommable du laboratoire.

III. Les compétences

Pendant toute la durée de ma thèse, j'ai acquis en plus des compétences scientifiques des compétences « autres » qui peuvent être déclinées en "savoirs faire" compétences relationnelles qualités personnelles et professionnelles...

1. Les compétences scientifiques

Au cours de ma thèse, j'ai développé mes connaissances scientifiques à la fois dans le champ disciplinaire de mon travail et dans d'autres domaines (parasitologie, immunologies...).

Sur le plan pratique, j'ai appris à maîtriser un certain nombre de techniques de biologie moléculaire, d'analyse bioinformatique...

Esprit de synthèse et esprit de critique : La réalisation d'études bibliographiques a développé ma capacité à chercher l'information à savoir les sélectionner au regard de leur pertinence par rapport à mon sujet, à les classer et les organiser. La veille bibliographique m'a permis également de développer mon esprit critique et de synthèse.

Présenter par écrit et argumenter des résultats scientifiques : En dehors du manuscrit de thèse et des publications, j'ai élaboré des nombreux rapports (rapports annuels d'avancement de la thèse pour l'École doctorale) et comptes rendus : comptes rendus des réunions de l'UMR, comptes rendus scientifiques (formations, séminaires, congrès...). La rédaction de ces différents types de

documents nécessite un plan clair permettant de mettre en valeurs les résultats obtenus, de les argumenter, de les justifier, d'être rigoureux tout en respectant un cahier des charges (e.g. pour les publications : nombre des mots, des références...).

Partager les acquis de sa recherche (communication orale): J'ai présenté oralement mes travaux lors des colloques (journées des doctorants à l'école doctorale (ABIES), journées des doctorants de l'INRA et de congrès nationaux (journées du département de santé animale de l'INRA, juin 2006 à Tours) et internationaux (5th International Meeting on *Rickettsiae* and Rickettsial Diseases, mai 2008 à Marseille).

2. Gestion de projet

Acteur de son projet : Au cours de ma thèse, je suis rapidement devenue autonome sur le plan technique. Mais, j'ai su également solliciter de temps en temps l'expérience des autres pour résoudre certains problèmes ponctuels.

Planifier les étapes de son projet : Pour une bonne organisation de mon travail, Je me suis efforcée, en lien avec mon responsable d'établir des plannings permettant de clarifier les différentes étapes et de définir des priorités. Certaines priorités et orientations ont évolué en fonction des résultats obtenus et des réflexions qui en ont résulté.

Négocier des prix et Commander des produits : J'ai appris aussi à gérer mes propres commandes tout en suivant certaines démarches et procédures : Etablir une prévision de dépenses, contacter des fournisseurs, négocier le prix, établir des bons de commandes...).

Gérer le stress : Le stress est un facteur inévitable tout au long de la thèse. Pour être efficace dans mon travail, il fallait que j'apprenne à le gérer de façon à ce qu'il ne se répercute pas sur mon « rendement » et sur mes prestations orales.

3. Compétences relationnelles

Travailler en équipe : Je me suis rendu compte qu'il n'est pas toujours facile de travailler dans un laboratoire, car nous sommes toujours en interaction les un(e)s avec les autres, d'autant plus que nous partageons les mêmes espaces et les mêmes matériels. Ceci nous amène à être plus respectueux vis-à-vis des autres. L'utilisation des matériels communs m'a appris à être diplomate, très attentive aux besoins des autres et à m'adapter à leurs impératifs et à toujours bien m'organiser dans mon planning.

Encadrer et transmettre: J'ai eu l'opportunité de participer à l'encadrement d'étudiants et des jeunes chercheurs dans le cadre de leur initiation à la technique MLVA : Il s'agissait :

- ✓ De stagiaires de notre UMR : un étudiant en M1, un étudiant en M2 , une étudiante en licence Pro , une jeune chercheuse polonaise .
- ✓ Des étudiants en M2, module biologie moléculaire : J'ai participé à la préparation puis à l'animation de séances de TD portant sur cette technique.

Ces petites expériences m'ont permises d'être capable de motiver les personnes avec lesquelles on travaille, de s'adapter avec leur niveau de connaissance et de pouvoir transféré tes savoirs et tes savoirs faire.

4. Qualités personnelles

Ma thèse m'a appris à être patiente car dans la recherche on n'atteint pas facilement les résultats espérés dès la première tentative. Il a fallu refaire les expériences plusieurs fois pour aboutir à des résultats fiables. Avant d'entamer

le projet, il m'a également fallu attendre cinq mois pour obtenir le financement exigé par l'école doctorale pour les étudiants qui veulent faire une thèse.

Je me suis investie avec un grand plaisir dans ce projet que j'ai commencé et apprécié lors de mon stage de master. Je suis très disponible pour mon travail et suis capable d'adapter mon calendrier aux exigences et aux imprévus de mon projet.

J'ai appris également à être très prudente et modeste sur les interprétations à apporter à mes résultats. Ceci a été apprécié lors des présentations aux congrès qui réunissent de nombreux spécialistes du domaine.

IV- Résultats, impact de la thèse

Sur le plan scientifique, ce travail a permis d'approfondir la connaissance de cette bactérie et de comprendre sa dynamique évolutive que ce soit à l'échelle de l'individu ou à l'échelle de la population et sur le plan technique, ma thèse a permis également de mettre au point un outil de typage moléculaire très efficace chez cette bactérie.

Projet professionnel

À l'issue de ma thèse, j'aimerais faire un post-doctorat que ce soit en France ou bien dans un autre pays anglophone qui me permettra d'une part de voir un autre mode de fonctionnement de laboratoire européen et d'autres part de bien maîtriser l'anglais qui est devenu une langue internationale .

Le métier d'enseignant chercheur m'intéresse aussi car ça me permettra d'exercer l'enseignement qui était mon rêve depuis longtemps. A l'issue de ma

thèse, j'envisage donc de préparer les concours de l'enseignement supérieur et de la recherche (INRA).

Malgré que ce travail a été basé que sur la recherche fondamentale je n'écarte pas la possibilité de travailler dans le secteur R & D et surtout au sein des petites ou moyenne entreprise (PME) car ces dernières peuvent me permettre d'accéder rapidement à des niveaux de responsabilité importants : Concevoir et piloter un projet, définir et gérer la politique qualité...