Etude de la diversité génétique d'Aspergillus fumigatus et de Chlamydophila psittaci chez les oiseaux et mise au point de modèles expérimentaux aviaires

Simon Thierry

▶ **To cite this version:**

Simon Thierry. Etude de la diversité génétique d'Aspergillus fumigatus et de Chlamydophila psittaci chez les oiseaux et mise au point de modèles expérimentaux aviaires. Microbiologie et Parasitologie. AgroParisTech, 2011. Français. NNT : 2011AGPT0015 . pastel-00603770

HAL Id: pastel-00603770

https://pastel.hal.science/pastel-00603770

Submitted on 27 Jun 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.

ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture
Agriculture
Alimentation
Food
Biologie
Biology
Environnement
Environment
Santé
Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

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

(AgroParisTech)

Spécialité : Microbiologie

présentée et soutenue publiquement par

Simon THIERRY

le 10 Février 2011

Etude de la diversité génétique et du pouvoir pathogène d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydophila psittaci* chez les oiseaux

Directeur de thèse : **Pr Jacques GUILLOT**
Co-encadrement de la thèse : **Dr Karine LAROUCAU et Dr Pascal ARNE**

Jury

Mme Annie RODOLAKIS, Directrice de recherche, IASP, INRA	Rapporteur
M. Jacques CHANDENIER, Professeur, Parasitologie, Faculté de Médecine de Tours	Rapporteur
Mme Nadia HADDAD, Professeur, UMR Bipar, ENVA	Examinateur
Mme Christine POURCEL, Directrice de recherche, Institut de Génétique et Microbiologie, Paris Sud	Examinateur
M. Xavier MAHLER, Professeur, Zootechnie et Economie, Oniris	Examinateur
Mme Karine LAROUCAU, Chargée de recherche, UZB, ANSES	Co-directrice
M. Pascal ARNE, Maître de Conférences, UMR Bipar, ENVA	Co-directeur
M. Jacques GUILLOT, Professeur, UMR Bipar, ENVA	Co-directeur

AgroParisTech
UMR Biologie moléculaire et immunologie parasitaires et fongiques (Bipar)
23, avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein des unités UMR Bipar et UZB de l'ANSES, sous la direction conjointe du Docteur Karine Laroucau et du Professeur Jacques Guillot et financé par une bourse de l'ANSES. Je souhaite vivement remercier Karine et Jacques pour leur dévouement à mon apprentissage, leurs conseils ainsi que pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Je remercie le directeur du Laboratoire de Santé Animale, Pascal Boireau, de m'avoir accueilli au sein de son établissement.

Je souhaite remercier Madame Annie Rodolakis et Monsieur Jacques Chandenier pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Mes remerciements vont aussi à Madame Nadia Haddad pour avoir accepté de présider le jury ainsi qu'à Madame Christine Pourcel et Monsieur Xavier Maller pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur Pascal Arné pour son encadrement, ses conseils et sa grande disponibilité, merci beaucoup pour toutes ces réponses ainsi que pour l'aide apportée en de nombreuses reprises sur ce travail de thèse. Merci au Professeur René Chermette pour son temps passé à mon apprentissage et pour toutes ces connaissances transmises.

Je souhaite remercier Madame Isabelle Virlogieux-Payant ainsi que Madame Isabelle Kempf pour leurs conseils lors de mon comité de pilotage. Je remercie Monsieur Jean Pierre Tafani et Madame Marie Spulkova pour leur aide et leurs conseils dans ce projet. Merci à Messieurs Michel Boutet, Luc Giard et Etienne Meissonier de la société Janssen pour leur soutien et leurs conseils et je remercie aussi Monsieur Théo Kanellos et la société Pfizer pour leur soutien.

J'adresse tous mes remerciements à Fabien Vorimore, Krystel De Cruz, Nicolas Versillé, Aleksandar Zocevic et Julien Portier pour leur présence, leur bonne humeur et aussi leurs conseils. Merci à vous

du fond du cœur, j'ai passé trois années extraordinaires en votre compagnie, autant professionnellement que personnellement j'ai beaucoup appris grâce à vous.

Je tiens aussi à remercier Manjula Deville ainsi qu'Adélaïde Niéguitsila pour m'avoir fait découvrir ce merveilleux monde des champignons ainsi que pour leur bonne humeur constante. Merci à Dongying Wang pour son aide lors de ce projet.

Je remercie tous les personnels de l'UMR Bipar, de l'UZB et des services de Parasitologie et de Microbiologie de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort pour toutes les choses qu'ils m'ont apprises et tous ces bons moments passés ensemble.

Un très grand merci à mes parents pour m'avoir soutenu dans ce projet. Merci à mon frère d'être là et d'être ce qu'il est. Merci aussi à toute ma famille pour leur présence.

Enfin je remercie ma magnifique femme Laure pour sa présence à mes côtés, sa patience ainsi que pour m'avoir supporté durant ce projet et j'espère pour bien plus longtemps encore.

RESUME

Le champignon filamenteux *Aspergillus fumigatus* et la bactérie *Chlamydophila psittaci* sont deux agents pathogènes majeurs chez les oiseaux d'élevage. Bien que phylogénétiquement très distants, ces deux micro-organismes partagent un même mode de transmission par voie aérienne. La mortalité et la morbidité associées aux aspergilloses ou aux chlamydioses ont un impact économique qui n'est pas négligeable, en particulier dans les élevages de dindes. En France, les investigations autour de cas humains de chlamydiose identifient fréquemment un lien avec des élevages de canards, chez lesquels l'infection par *C. psittaci* s'apparente à un portage intestinal asymptomatique.

Pour analyser la circulation des agents pathogènes dans les élevages avicoles, nous avons tout d'abord étudié la diversité génétique d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydophila psittaci*. Pour cela, deux nouvelles méthodes de typage moléculaire MLVA (*Multiple Locus VNTR Analysis*) ont été mises au point. Ces méthodes se sont révélées très discriminantes, rapides et faciles à mettre en œuvre. Dans le cas d'*A. fumigatus*, la méthode MLVA a permis de regrouper les génotypes en fonction de leur origine géographique. Elle a également permis d'analyser les modes de contamination d'un couvoir de dindes.

Dans un second temps, nous avons analysé le pouvoir pathogène de ces deux microorganismes chez les oiseaux. Pour cela, deux modèles d'infections expérimentales ont été développés. Le premier modèle a permis de reproduire une aspergillose chez des poussins de 1 jour après inhalation d'un aérosol contenant des conidies d'*A. fumigatus*. Lors de la mise au point du modèle, l'impact de l'immunodépression et de la lignée de poulet a été évalué. Pour *C. psittaci*, un modèle reproduisant un portage intestinal de la bactérie chez des canetons mulards de 1 jour a été obtenu.

ABSTRACT

The filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* and the bacteria *Chlamydophila psittaci* are two major pathogens in poultry. Although phylogenetically distant, these two microorganisms share the same aerial transmission. Mortality and morbidity associated to aspergillosis and chlamydiosis are responsible for economic losses, in particular in turkey farms. In France, investigations on human cases of chlamydiosis frequently reveal a link with duck farms. The bacteria *C. psittaci* is carried in the gut of ducks without any clinical signs.

In order to investigate the circulation of *Aspergillus fumigatus* and *Chlamydophila psittaci* in avian farms, we studied the genetic diversity of the two pathogens. Two new MLVA (Multiple Locus VNTR Analysis) typing methods were set up. These methods revealed to be very discriminant, rapid and easy to use. In the case of *A. fumigatus*, the MLVA method made it possible to cluster the genotypes according to their geographic origin. It also permitted the analysis of contamination modes in a turkey hatchery.

In order to analyze the pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* and *Chlamydophila psittaci* in birds, two experimental infection models were developed. The first model was designed to reproduce aspergillosis in one-day old chickens inoculated with airborne *A. fumigatus* conidia. During this experiment, the impact of immunosuppression and of chicken lineage was evaluated. For *C. psittaci*, a model reproducing an intestinal carriage of the bacteria in one-day old mule ducks was obtained.

TABLE DES MATIERES

RESUME 1

ABSTRACT 3

AVANT-PROPOS 11

LISTE DES ABREVIATIONS 13

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE 15

Chapitre 1 : Les oiseaux et les filières avicoles en France 15

1. Les oiseaux 17

1.1. Appareil respiratoire des oiseaux 20

1.1.1. Anatomie 20

1.1.2. Physiologie 22

1.1.3. Mécanismes de défense 23

1.2. Tractus digestif des oiseaux 25

1.2.1. Anatomie 25

1.2.2. Physiologie 30

1.2.3. Mécanismes de défense 31

2. Les filières avicoles en France 32

2.1. Organisation des filières 32

2.1.1. Volailles de chair 33

2.1.2. Volailles de ponte 35

2.1.3. Foie gras 36

2.2. Filières en chiffres 37

2.2.1. Volailles de chair 37

2.2.2. Œufs de consommation 42

2.2.3. Foie gras 43

Chapitre 2 : Les *Aspergillus* et les aspergilloses 45

1. Les champignons du genre *Aspergillus* 47

1.1. Historique 47

1.2. Systématique 48

1.3. Caractères macroscopiques et microscopiques 50

1.4. Cycle de développement 54

1.5. Facteurs de virulence 55

2. Les aspergilloses 56

2.1. Historique 56

2.1.1. Historique des aspergilloses chez l'homme 56

2.1.2. Historique des aspergilloses aviaires 57

2.2. Epidémiologie 58

2.2.1. Epidémiologie descriptive 58

2.2.2. Epidémiologie analytique 58

2.3. Signes cliniques et lésions 62

2.3.1. Chez l'homme 62

2.3.2. Chez les oiseaux 64

2.4. Diagnostic 67

2.4.1. Diagnostic clinique et épidémiologique 67

2.4.2. Signes radiologiques et résultats de l'examen endoscopique 67

2.4.3. Mise en évidence des éléments fongiques par examen direct et culture 68

2.4.4. Examen histologique 69

2.4.5. Sérologie 69

2.4.6. Diagnostic post-mortem 70

2.5. Typage d'*Aspergillus fumigatus* 71

2.5.1. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 71

2.5.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) sans hybridation 71

2.5.3. RFLP avec hybridation 72

2.5.4. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 72

2.5.5. Microsatellites ou Short Tandem Repeats (STR's) 72

2.5.6. Multilocus Sequence Typing (MLST) 73

2.5.7. Cell Surface Protein Typing (CSP Typing) 73

Chapitre 3 : Les *Chlamydiaceae* et les chlamydioses 75

Les bactéries de l'ordre des *Chlamydiaceae* 77

1.1. Historique 77

1.2. Systématique 79

1.2.1. Classification 79

1.2.2. Diversité des *Chlamydiaceae* et de leurs hôtes 80

1.3. Caractéristiques biologiques 85

1.3.1. Différentes formes de *Chlamydiaceae* 85

1.3.2. Cycle de développement 86

2. Les infections à *Chlamydophila psittaci* 88

2.1. Chez l'Homme 88

2.1.1. Signes cliniques 88

2.1.2. Epidémiologie 89

2.2. Chez les oiseaux 90

2.2.1. Signes cliniques 90

2.2.2. Lésions 91

2.3. Importance de la chlamydiose aviaire en élevage 93

2.4. Epidémiologie en élevage 94
2.4.1. Sources et modes de contamination 94
2.4.2. Causes favorisantes 95
2.5. Diagnostic de laboratoire 96
2.5.1. Direct 96
2.5.2. Indirect 99
2.6. Typage de *Chlamydophila psittaci* 100
2.6.1. Sérotypage par microimmunofluorescence 100
2.6.2. PCR-RFLP 101
2.6.3. Séquençage 101
2.6.4. Les puces à ADN 101

OBJECTIFS 103

ETUDE EXPERIMENTALE 105
Chapitre 1 : Diversité génétique d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydophila psittaci* 105
1. La technique MLVA 107
1.1. Historique 107
1.2. Principe 108
2. Le typage d'*Aspergillus fumigatus* par MLVA 109
2.1. Mise au point de la méthode 109
2.2. Application de la technique de typage dans un couvoir de dindes 119
2.2.1. Introduction 119
2.2.2. Matériels et méthodes 120
2.2.3. Résultats et discussion 121

3. Le typage de *Chlamydophila psittaci* par MLVA 125

Chapitre 2 : Modèles expérimentaux d'aspergillose et de chlamydiose aviaires 139

1. Les modèles expérimentaux d'aspergillose 142

1.1. Modèles utilisant des mammifères 142

1.2. Modèles aviaires 142

1.3. Mise au point d'une infection expérimentale chez le poulet 145

2. Les modèles expérimentaux de chlamydiose (*C. psittaci*) 159

2.1. Modèles utilisant des mammifères 159

2.2. Modèles aviaires 159

2.3. Mise au point d'un modèle de portage intestinal chez le canard mulard 160

2.3.1. Matériels et méthodes 161

2.3.2. Résultats 165

2.3.3. Discussion 168

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 171

REFERENCES 181

ANNEXES 203

AVANT-PROPOS

L'aspergillose et la chlamydiose sont des infections d'importance majeure en élevage aviaire. L'aspergillose est due à des moisissures banales de l'environnement qui, dans certaines circonstances, sont capables d'exprimer un pouvoir pathogène opportuniste. La chlamydiose aviaire est une zoonose due à une bactérie à Gram négatif, parasite intracellulaire obligatoire.

Les oiseaux, et plus particulièrement les oiseaux d'élevage comme la dinde ou le canard, sont réceptifs et sensibles à ces deux types d'agents pathogènes transmis par voie aérienne. Même si l'on ne connaît pas avec précision l'impact économique de l'aspergillose et de la chlamydiose en élevage aviaire, ces infections sont à l'origine de pertes de production par diminution de la croissance, de mortalités chez les animaux et de saisies à l'abattoir. La chlamydiose est aussi un important problème de santé publique, notamment chez les professionnels au contact des oiseaux infectés.

Pour mettre en place des méthodes de lutte efficaces dans les élevages, la compréhension des mécanismes de circulation des agents pathogènes semble indispensable. Pour cela, nous avons besoin d'outils de typage moléculaire discriminants qui permettent de suivre la contamination de l'environnement, des animaux ou de l'homme. La première partie de mon travail de thèse a consisté à développer une méthode de typage originale (MLVA) pour les deux agents pathogènes *Aspergillus fumigatus* et *Chlamydophila psittaci*. Par la suite, la technique de typage pour *A. fumigatus* a été appliquée au suivi des souches en élevage.

La connaissance des interactions entre les agents pathogènes et leurs hôtes est un prérequis pour le choix et la mise en place des méthodes de lutte. L'étude de ces interactions peut se faire par le biais de modèles expérimentaux. Dans le cas de l'aspergillose, de nombreux modèles utilisant des rongeurs ont été décrits. Les résultats obtenus avec ces modèles ne sont que très difficilement transposables chez les oiseaux compte tenu de leurs particularités anatomiques et physiologiques. Dans le cas de la chlamydiose, des modèles reproduisant des maladies aiguës chez les oiseaux ont été mis en place. Or, chez le canard, l'infection s'apparente à un portage asymptomatique et un tel modèle n'a encore jamais été développé. La deuxième partie de mon travail de thèse a donc consisté à développer des modèles d'infection par *Aspergillus fumigatus* et *Chlamydophila psittaci* chez des oiseaux.

LISTE DES ABREVIATIONS

A3	Animalerie de niveau de biosécurité 3
AB	Agriculture Biologique
ABPA	Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AI	Aspergillose Invasive
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire
AOC	Appellation d'Origine Contrôlée
ARN	Acide Ribonucléique
ARP	Avian Respiratory Macrophages or Phagocytes
BALT	Bronchus-Associated Lymphoid Tissues
BGM	Buffalo Green Monkey
CBH	Cutaneous Basophil Hypersensitivity
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CE	Corps Elémentaires
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CI	Corps Intermédiaire
CIRE	Cellules Interrégionales d'Epidémiologie
CNR	Centre National de Référence
CR	Corps Réticulés
CSP	Cell Surface Protein
DDASS	Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales
DDSV	Direction Départementale des Services Vétérinaires
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENITA	Ecole Nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles de Bordeaux
EOPS	Exempt d'Organisme Pathogène Spécifié
FARM	Free Avian Respiratory Macrophages
FC	Fixation du Complément
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissues
GPIC	Guinea Pig Inclusion Conjunctivitis
HES	Hémalun Eosine Safran
IgA	Immunoglobuline d'isotype A
IgG	Immunoglobuline d'isotype G
IgM	Immunoglobuline d'isotype M
INPREST	Installations Nationales Protégées pour la Recherche sur les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
InVS	Institut de Veille Sanitaire

IST	Infection Sexuellement Transmissible
LBA	Lavage Broncho-Alvéolaire
LGV	Lymphogranulomatose Vénérienne
LPS	Lipopolysaccharide
MADO	Maladie Animale à Déclaration Obligatoire
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissues
MIF	Micro-Immunofluorescence
MLP	Microsatellite Length Polymorphism
MLST	Multilocus Sequence Typing
MLVA	Multiple Locus VNTR Analysis
MMAD	Mass Median Aerodynamic Diameter
MOMP	Major Outer Membrane Protein
MSA	Mutualité Sociale Agricole
MST	Minimum Spanning Tree
OAC	Œuf A Couver
OEA	Ovine Enzootic Abortion
OIE	Office International des Epizooties
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Open Reading Frame
OTC	Oxytétracycline
PAS	Periodic Acid of Schiff
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-Q	Polymerase Chain Reaction Quantitative
PHA	Phytohémagglutinine
PI	Post-inoculation/infection
PLT	Psittacosis-Lymphogranuloma venereum-Trachoma
PPM	Partie Par Million
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
REA	Restriction Enzyme Analysis
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RPM	Rotation Par Minute
SPF	Specified Pathogen Free (EOPS)
TEC	Tonne Equivalent Carcasse
TECoq	Tonne Equivalent Coquille
TRF	Tandem Repeat Finder
UFC	Unité Formant Colonie (CFU)
UFI	Unité Formant Inclusion (IFU)
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
Vero	African Green Monkey Kidney
VNTR	Variable Number Tandem Repeat

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les oiseaux et les filières avicoles en France

1. Les oiseaux

Les oiseaux sont des vertébrés tétrapodes dont le corps est recouvert de plumes et qui pondent des œufs. Près de 9700 espèces d'oiseaux ont été décrites à ce jour, très différentes tant par leur écologie que par leur biologie. La classe des Oiseaux compte 27 ordres, dont le plus important est l'ordre des Passériformes (5712 espèces) et le plus réduit celui des Struthioniformes (une seule espèce : l'autruche *Struthio camelus*) (King et McLelland, 1984 ; Livezey et Zusi, 2007). Une dizaine d'espèces ont été domestiquées par l'Homme. La domestication des animaux est définie comme « l'acquisition, la perte ou le développement de caractères morphologiques, physiologiques ou comportementaux nouveaux et héréditaires, résultant d'une interaction prolongée, d'un contrôle voire d'une sélection délibérée de la part des communautés humaines ». La reproduction, les soins et l'alimentation des animaux sont ainsi contrôlés plus ou moins étroitement par l'homme. Les premières espèces d'oiseaux qui ont fait l'objet d'un élevage ont été le poulet, l'oie, la pintade et le canard entre 6000 et 1000 ans avant notre ère, puis la dinde au moyen âge et l'autruche au début du 19ème siècle (Wood-Gush, 1958 ; Mignon-Grasteau *et al.*, 2005) (figures 1 et 2).

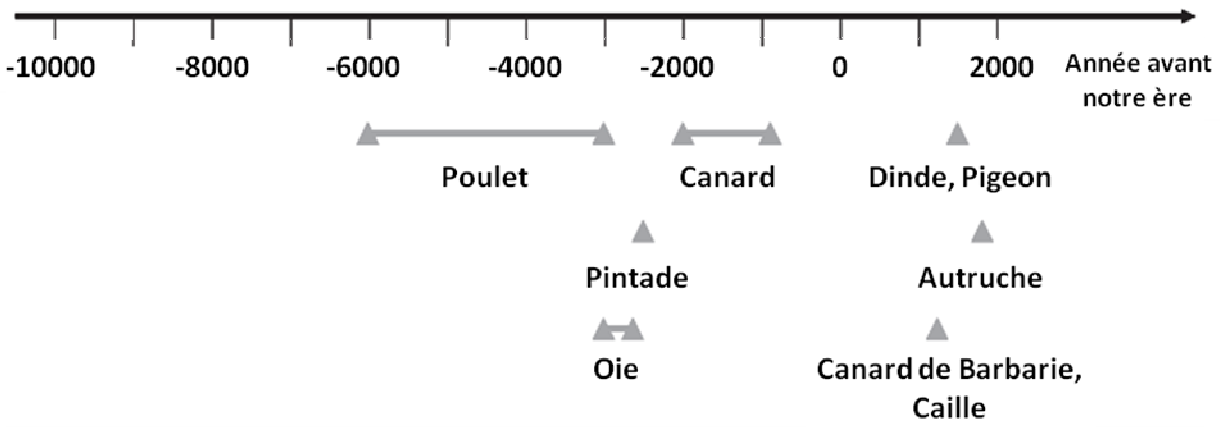


Figure 1. Chronologie de la domestication des principales espèces d'oiseaux d'élevage (adapté de Mignon-Grasteau *et al.*, 2005).

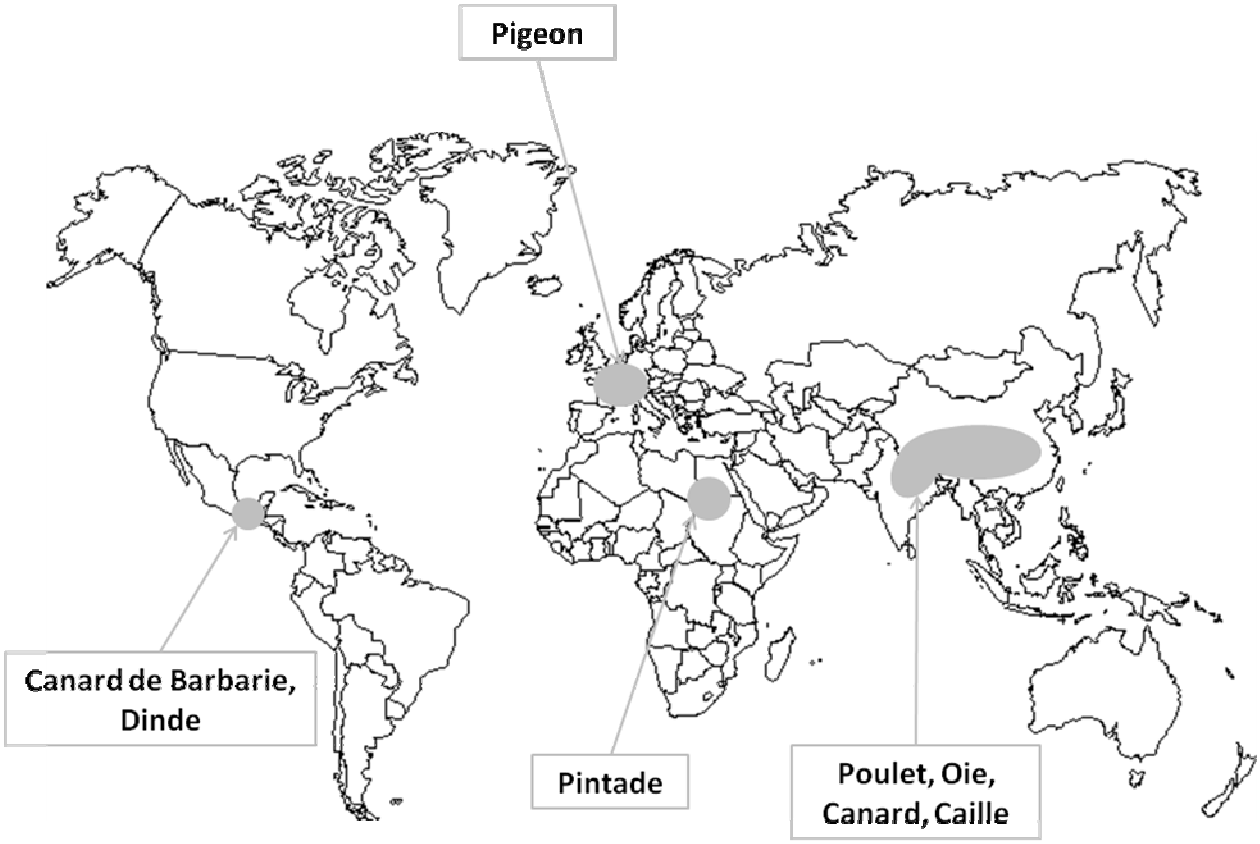


Figure 2. Localisation géographique des différents foyers de domestication des principales espèces d'oiseaux d'élevage (adapté de Mignon-Grasteau *et al.*, 2005).

En fait, de multiples espèces d'oiseaux ont été capturées et élevées par l'homme à différentes fins. Les élevages ont été constitués pour contribuer à la sécurité alimentaire des communautés humaines, pour l'agrément ou encore pour la conservation d'espèces aviaires. Certains oiseaux ont aussi été utilisés dans le cadre de l'expérimentation animale. Le tableau 1 présente les principales espèces d'oiseaux qui font l'objet d'un élevage.

Tableau 1. Principales espèces d'oiseaux qui font l'objet d'un élevage.

Ordre	Famille ou espèce	Finalité de l'élevage			Modèle d'infection expérimentale	
		Consommation	**Agrément**	**Conservation**	Aspergillose	Chlamydiose
Galliformes	Poulet (*Gallus gallus*)	▨	▨		▨	▨
	Faisan de Colchide (*Phasanius colchicus*)	▨	▨			
	Caille du Japon (*Coturnix japonica*)	▨			▨	
	Dinde (*Meleagris gallopavo*)	▨			▨	▨
	Pintade (*Numida meleagris*)	▨			▨	▨
Ansériformes	Oie (*Anser anser*)	▨	▨			
	Canard commun et de Barbarie (*Anas platyrhynchos, Cairina moschata*)	▨	▨		▨	▨
Psittaciformes	Psittacidés		▨			▨
Columbiformes	Pigeon biset (*Columba livia*)	▨	▨		▨	
	Autres Columbidés		▨			
Passériformes	Canari (*Serinus canaria*)		▨			
	Autres Passereaux		▨			
Falconiformes	Falconidés		▨	▨		

Les oiseaux, à de rares exceptions près, ont la faculté de voler et présentent de ce fait des adaptations anatomiques, physiologiques et comportementales variées. Leur métabolisme est élevé, avec une température interne de 40 à 42°C en général. Ils possèdent un système respiratoire et un système digestif très différents de ceux des mammifères. Ces différences semblent en partie responsables de la plus grande réceptivité et sensibilité des oiseaux vis-à-vis des infections comme l'aspergillose et la chlamydiose.

Nous présenterons dans un premier temps les particularités anatomo-physiologiques de l'appareil respiratoire puis du tractus digestif des oiseaux afin de mieux comprendre la physiopathologie des maladies qui seront développées ultérieurement. Par souci de simplification, les espèces d'intérêt (Galliformes et Anatidés d'élevage) seront retenues en priorité pour illustrer ces particularités anatomiques et physiologiques.

1.1. Appareil respiratoire des oiseaux

1.1.1. Anatomie

Parmi les particularités de l'appareil respiratoire des oiseaux, on mentionnera l'existence de deux poumons associés à des sacs aériens et l'absence de diaphragme. Les poumons des oiseaux sont proportionnellement plus petits que ceux des mammifères. Ils sont rigides et leur volume demeure constant lors du cycle respiratoire. Ce sont les sacs aériens qui jouent le rôle de soufflets et créent un flux d'air unidirectionnel à travers les parabronches du parenchyme pulmonaire (figures 3 et 4). La physiologie très particulière du système respiratoire est liée à l'aptitude au vol qui implique une consommation en dioxygène très importante assurée par des échanges gazeux dix fois plus efficaces chez les oiseaux que chez les mammifères au travers d'une surface d'échange plus importante de 20 % à poids vif équivalent (Tell, 2005 ; O'Malley *et al.*, 2005).

1.1.1.1. Sacs aériens

Les sacs aériens sont de fins sacs extensibles et transparents recouverts d'un épithélium squameux simple. Ils représentent 80 % du volume respiratoire total et occupent un espace non négligeable de la cavité abdominale, ainsi que dans les os pneumatisés (Lasiewsky *et al.*, 1972 ; Maina et Africa, 2000). Ils ne jouent aucun rôle dans les échanges gazeux proprement dits et ne sont pas vascularisés (Dyce *et al.*, 2002 ; Fedde, 1993). La majorité des oiseaux possède 8 sacs aériens : 3 sacs pairs (sacs thoraciques craniaux, sacs thoraciques caudaux et sacs abdominaux) et 2 sacs impairs (un sac interclaviculaire et un sac cervical). Chez certaines espèces, comme le poulet et le canard, le sac cervical est dédoublé ce qui conduit à un total de 9 sacs aériens (Scheid et Piiper, 1989). Chaque sac est connecté aux bronches secondaires par un *ostium*, qui se situe le long du bord latéroventral des poumons.

1.1.1.2. Poumons

Les poumons des oiseaux sont rigides, petits et compacts. Les bronches primaires (figure 4), aussi appelées *mesobronchi*, courent sur toute la longueur des poumons pour s'aboucher aux sacs aériens caudaux. En entrant dans un poumon, chaque bronche primaire se subdivise en 4 groupes de bronches secondaires dénommées en fonction de leur trajet : médiodorsales, médioventrales,

latérodorsales et latéroventrales (figure 4). Elles se divisent en une multitude de petits conduits parallèles, les parabronches paléopulmonaires, lesquelles présentent des invaginations, les *atria* qui mènent à un labyrinthe de microscopiques capillaires aériens (8 à 13 µm de diamètre) qui se trouvent en étroite contiguïté avec de fins capillaires sanguins, l'ensemble constituant la surface d'échange gazeux (King et Molony, 1971 ; Scheid et Piiper, 1972 ; Evans, 1996).

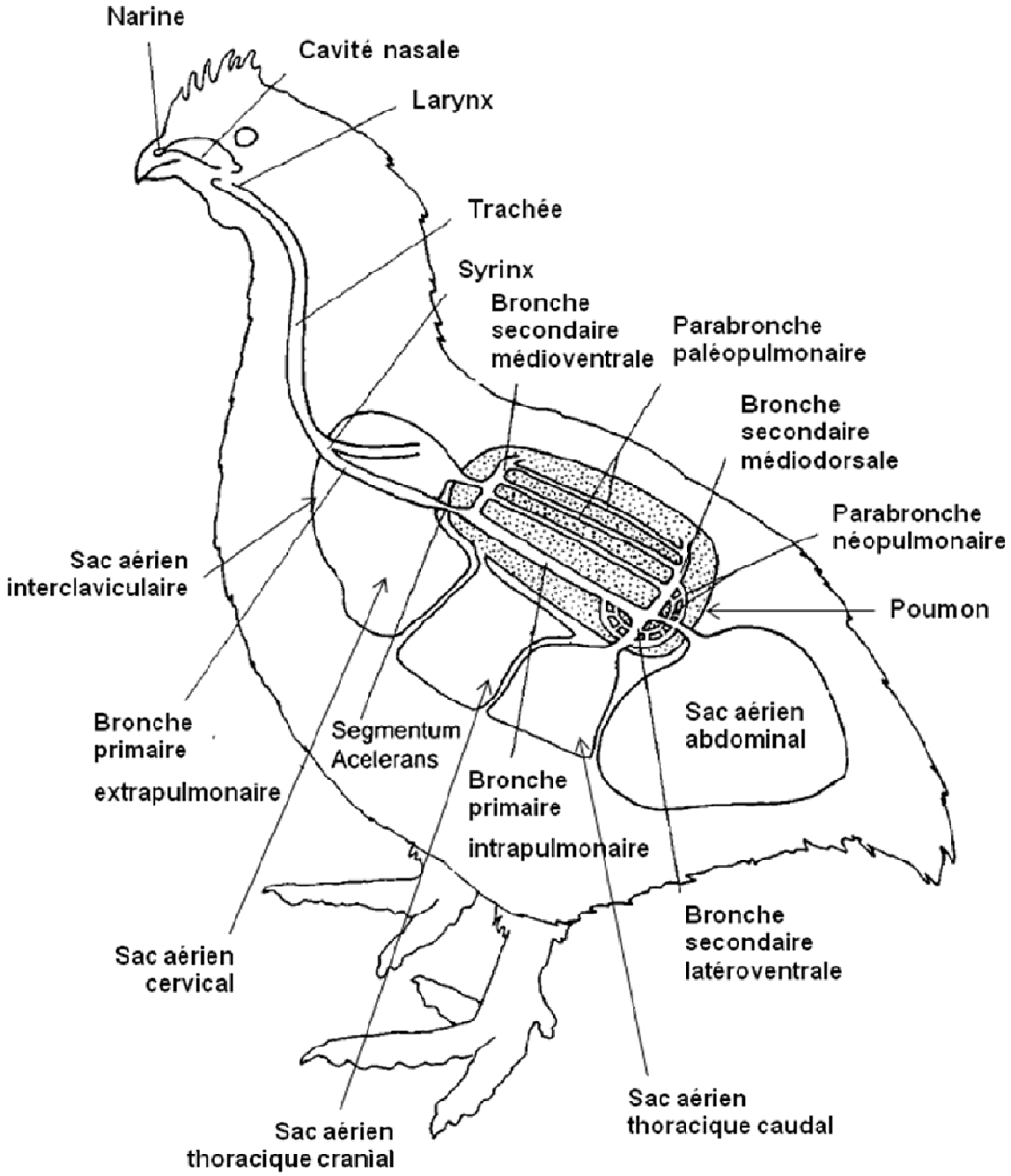


Figure 3. Anatomie de l'appareil respiratoire des oiseaux (adapté de Fedde, 1998).

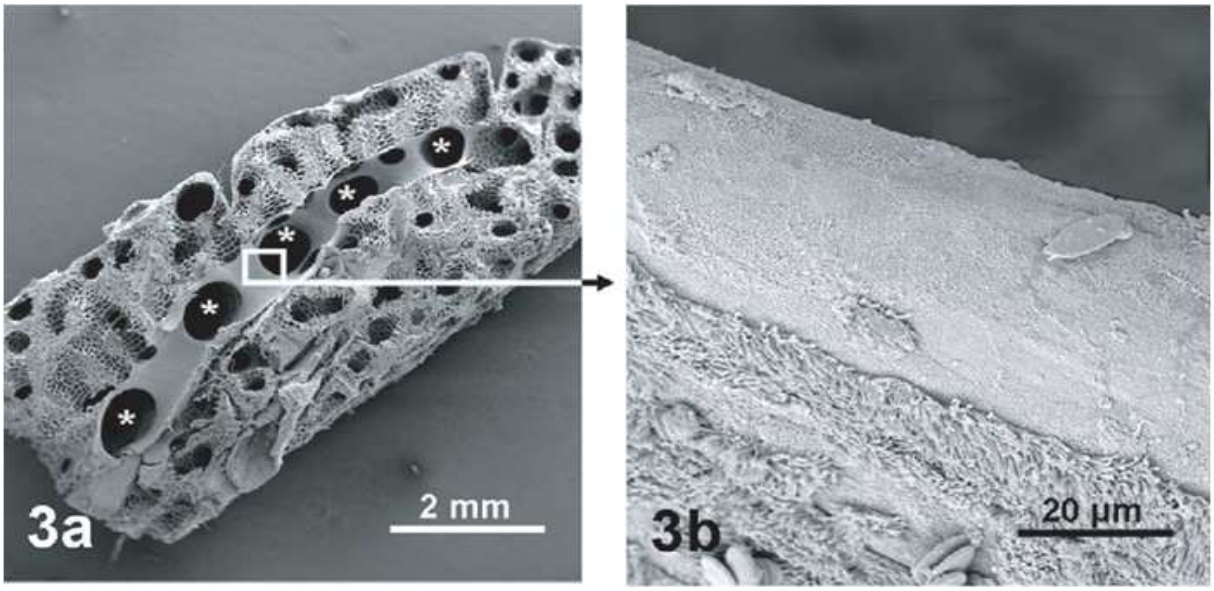


Figure 4. (a) Image au microscope électronique à balayage d'une bronche primaire de poulet (section longitudinale) montrant les ouvertures les bronches secondaires médiodorsales (*). (b) Insert : Image au microscope électronique à balayage d'une ouverture vers les bronches secondaires médiodorsales (adapté de Reese *et al.*, 2006).

1.1.2. Physiologie

La circulation unidirectionnelle de l'air dans les parabronches est assurée par la création de différences de pression à différents niveaux de l'appareil respiratoire (Brackenburry, 1987 ; McLelland et Molony, 1983 ; Scheid et Piiper, 1971). Pendant l'inspiration, sous l'action des muscles inspiratoires et en l'absence de diaphragme, le volume des sacs antérieurs et postérieurs s'accroît car le sternum s'avance en s'abaissant et les vertèbres se décalent crânialement d'où une diminution consécutive de pression. L'air rentre alors par les narines, traverse successivement les cavités nasales, puis les choanes et la fente palatine avant de se diriger vers la glotte. Il emprunte ensuite la trachée puis les deux bronches primaires au niveau de la syrinx. La majorité de l'air inspiré (figure 5) passe ensuite directement dans les sacs aériens postérieurs (thoracique caudaux et abdominaux). En parallèle, l'air que contenaient les poumons gagne les sacs aériens antérieurs (interclaviculaire, cervical et thoraciques craniaux).

Au contraire, pendant l'expiration, les cavités thoracique et abdominale se contractent d'où une augmentation de la pression de l'air dans les sacs aériens. L'air est donc chassé des sacs postérieurs vers les poumons, puis il passe par les sacs antérieurs et est évacué par la bronche secondaire médioventrale puis par la bronche primaire et enfin par la trachée (Maina et Africa, 2000 ; Scheid et Piiper, 1989).

Il faut ainsi deux cycles respiratoires complets pour renouveler la totalité de l'air présent dans l'appareil respiratoire. Ce flux d'air unidirectionnel à l'inspiration comme à l'expiration, approvisionne constamment les poumons avec un air riche en dioxygène puisqu'il n'y a pas de mélange avec l'air vicié ce qui optimise l'efficacité des échanges gazeux (McLelland et Molony, 1983).

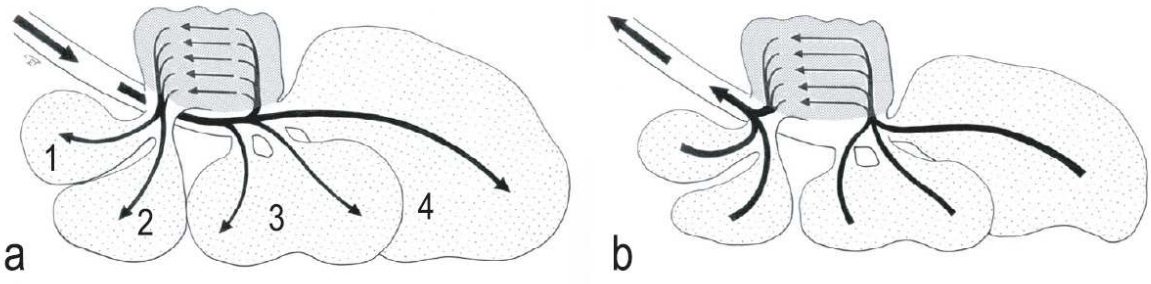


Figure 5. Circulation de l'air dans l'appareil respiratoire des oiseaux pendant l'inspiration (a) et pendant l'expiration (b) : (1) Sac aérien interclaviculaire, (2) Sac aérien cervical, (3) Sacs aériens thoraciques cranial et caudal, (4) Sac aérien abdominal (adapté de Reese *et al.*, 2006).

1.1.3. Mécanismes de défense

Le système respiratoire supérieur possède des mécanismes protecteurs contre l'inhalation des particules étrangères. La première barrière est constituée par la couche de mucus qui recouvre les cellules épithéliales ciliées de la muqueuse nasale. Les particules inhalées de gros diamètre (> 4 µm) peuvent s'y trouver piégées et sont ainsi redirigées vers le pharynx à la vitesse de 10 mm/min. Elles sont ensuite dégluties et éliminées dans les fientes (Hayter et Besch, 1974).

La trachée, les bronches primaires et les racines des bronches secondaires sont également recouvertes de cellules épithéliales ciliées. Les cils vibratils semblent acheminer la couche de mucus en direction de la cavité orale.

En revanche, contrairement aux mammifères, les oiseaux ne possèdent pas d'épiglotte qui limite l'entrée des particules dans l'appareil respiratoire inférieur. Ils sont également dépourvus de diaphragme, lequel s'avère particulièrement important lors de la mise en œuvre du réflexe de toux (Fedde, 1998). Enfin, le nombre de cellules ciliées constituant l'escalator mucociliaire est plus faible. Pour toutes ces raisons, les oiseaux évacuent moins efficacement les particules inhalées que les mammifères.

Le deuxième type de défense du système respiratoire contre les agents pathogènes est représenté par les défenses immunitaires qui comprennent trois principales composantes : les tissus lymphoïdes associés aux bronches appelés BALT (*Bronchus-Associated Lymphoid Tissues*), le système immunitaire interstitiel et le système phagocytaire.

Les BALT font partie des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses appelés MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissues*), parmi lesquels on trouve aussi les tissus lymphoïdes associés au tube digestif (GALT, *Gut Associated Lymphoid Tissues*) et inclut aussi les tissus lymphoïdes salivaires, nasopharyngés et génito-urinaires. Les BALT sont des structures lymphoïdes organisées présentes dans la muqueuse des bronches (Bienenstock *et al.*, 1973 ; Kaiser, 2010). Ces agrégats lymphoïdes sont très similaires aux plaques de Peyer et aux tissus lymphoïdes associés au tractus digestif appelés GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissues*). Les structures BALT du poulet et de la dinde sont localisées à la jonction des bronches primaires et secondaires (Fagerland et Arp, 1993b ; Van Alstine et Arp, 1988) ainsi qu'au niveau des *ostia*, zones de jonction avec les sacs aériens. La proportion comme la localisation des différents types cellulaires présents peuvent varier en fonction du degré de maturité du tissu et de son niveau de stimulation par l'environnement. Chez les poussins âgés d'un jour, il y a peu ou pas de lymphocytes présents dans les bronches (Fagerland et Arp, 1993a, 1993b). Durant les premières semaines de vie, les leucocytes CD45+ commencent à migrer vers les bronches primaires (Jeurissen *et al.*, 1989) et de petits infiltrats lymphocytaires sont observés au niveau de l'ouverture des bronches secondaires. Dans les 3 à 4 semaines suivantes, les nodules lymphoïdes se développent à ces endroits et des plasmocytes produisant des IgA, IgG et IgM sont aussi détectés à l'instar des lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Fagerland et Arp, 1993a). Les BALT matures sont composés d'agrégats de lymphocytes recouverts par une couche de cellules épithéliales (Fagerland et Arp, 1993b). Le développement des BALT est similaire chez des animaux EOPS (Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiés) et chez des animaux conventionnels.

En complément des BALT, une infiltration diffuse de leucocytes, hétérophiles et lymphocytes dans les tissus interstitiels des poumons est observée laquelle constitue le système immunitaire interstitiel (Jeurissen *et al*, 1989).

Le dernier volet des défenses immunitaires du système respiratoire est représenté par les cellules phagocytaires présentes dans les poumons. Chez les mammifères, les macrophages résidents dans les alvéoles pulmonaires constituent une importante ligne de défense de la surface d'échange gazeux. Peu de données sont disponibles quant à l'existence de cellules équivalentes chez les oiseaux. Dans la littérature, ces cellules sont identifiées comme « macrophages » ou « phagocytes respiratoires aviaires » (ARP, *Avian Respiratory Macrophages or Phagocytes*) ou encore comme « macrophages respiratoires aviaires libres » (FARM, *Free Avian Respiratory Macrophages*). Des cellules phagocytaires sont également présentes dans les sacs aériens. Cependant, ces cellules n'y

sont pas présentes en grand nombre et la majeure partie des défenses cellulaires est assurée par le système immunitaire interstitiel représenté en majorité par les hétérophiles (cellules polynucléaires équivalent des neutrophiles des mammifères) et par un petit nombre de lymphocytes (Crespo *et al*., 1998). Un afflux de macrophages dans les parabronches peut être provoqué par l'injection de substances étrangères (LPS, glucane, adjuvant Incomplet de Freund) (Toth *et al.*, 1987).

On constate donc qu'il existe plusieurs systèmes de prise en charge des particules étrangères au niveau de l'appareil respiratoire. Cependant, en dépit de ces différentes lignes de défense et du fait de la configuration anatomique de leur appareil respiratoire supérieur, les oiseaux semblent inhaler plus de particules en suspension dans l'air environnant que les mammifères tout en étant moins aptes à les éliminer. Cela induit une plus grande sensibilité aux agents pathogènes à tropisme respiratoire.

1.2. Tractus digestif des oiseaux

L'anatomie et la physiologie du tractus digestif varient considérablement en fonction du régime alimentaire des oiseaux. Nous ne présenterons ici que les particularités spécifiques des granivores.

1.2.1. Anatomie

Le système digestif est relativement court et de faible volume (figure 6). En conséquence, la prise alimentaire se caractérise par l'ingestion fréquente de petites quantités d'aliments associée à une digestion rapide et efficace. Le temps de transit peut varier selon les espèces de quelques minutes à plusieurs heures. La quantité d'excréments s'avère minime compte tenu de la quantité d'aliments ingérés (Hill, 1971 ; King et McLelland, 1984 ; Evans, 1996 ; McLelland, 1979 ; Duke, 1993).

1.2.1.1. Œsophage

L'œsophage, situé du côté droit du cou, est fin et présente des replis longitudinaux qui le rendent plus extensible que celui des mammifères. Il est recouvert par un épithélium squameux stratifié associé à des glandes muqueuses dont les sécrétions favorisent la progression des aliments (Hill, 1971 ; King et McLelland, 1984 ; Evans, 1996 ; McLelland, 1979 ; Duke, 1993).

1.2.1.2. Jabot

Le jabot correspond à une dilatation en cul-de-sac de l'œsophage localisée à la base du cou. Il a la même structure épithéliale que l'œsophage et permet de stocker la nourriture lorsque l'estomac est plein et aussi de poursuivre la prédigestion chimique débutée sous l'action de l'amylase salivaire (Hill, 1971 ; King et McLelland, 1984 ; Evans, 1996 ; McLelland, 1979 ; Duke, 1993). Particulièrement développé chez les Galliformes et les Columbiformes, le jabot est rudimentaire chez d'autres oiseaux comme les oies et les canards.

1.2.1.3. Proventricule

Le proventricule est la portion glandulaire de l'estomac. Sa fonction principale est la production de sucs gastriques ainsi que l'acheminement de l'aliment vers le gésier. Les glandes spécialisées, régulées par des facteurs hormonaux et neurologiques y sécrètent un mélange composé d'enzymes digestives, d'acide chlorhydrique et de mucus. L'acide chlorhydrique active les enzymes digestives (pepsinogénases) et le mucus protège la paroi du proventricule contre l'action de l'acide chlorhydrique (Hill, 1971 ; King et McLelland, 1984 ; Evans, 1996 ; McLelland, 1979 ; Duke, 1993).

1.2.1.4. Ventricule

Le ventricule ou gésier est un organe à parois épaisses. Il est le site de la digestion protéique et du broyage mécanique de la nourriture. Chez les espèces granivores, il peut contenir des gravillons ou « grit » qui facilitent ce broyage (Hill, 1971 ; King et McLelland, 1984 ; Evans, 1996 ; McLelland, 1979 ; Duke, 1993).
Le ventricule est relié à l'intestin grêle par le pylore.

1.2.1.5. Intestin grêle

L'intestin grêle est l'organe principal de la digestion et de l'absorption des aliments. Court et très torsadé chez les granivores, il est divisé en trois sections : le duodénum, le jéjunum et l'iléon.
Sa muqueuse est structurée en villosités formant des digitations irriguées par de nombreux capillaires sanguins et lymphatiques, et entre lesquelles sont situées les cryptes intestinales. La surface est constituée d'un épithélium composé de cellules épithéliales, les entérocytes, dont le sommet est recouvert de prolongements cellulaires, les microvillosités, formant la bordure en

brosse. Il contient aussi des cellules à mucus et il repose sur un tissu conjonctif, la *lamina propria*, qui assure un rôle mécanique de soutien, nutritif et de défense. Cet épithélium intestinal assure l'absorption des nutriments et il synthétise des enzymes capables de décomposer les glucides complexes en sucres élémentaires et permettant la digestion des protéines (Hill, 1971 ; King et McLelland, 1984 ; Evans, 1996 ; McLelland, 1979 ; Duke, 1993).
Il reçoit aussi la bile hépatique et le suc pancréatique.

1.2.1.6. Gros intestin

Le gros intestin, relativement court, se compose d'un côlon et d'un rectum. Il constitue le lieu d'absorption de nutriments, d'eau et d'électrolytes. Il héberge une microflore bactérienne qui permet la digestion d'une partie des aliments non digérés en amont et qui synthétise des vitamines K et B. Certaines espèces ont en plus des cæca pairs plus ou moins développés qui hébergent une flore cellulolytique notamment (figure 6) (Hill, 1971; McLelland, 1979 ; King et McLelland, 1984 ; Duke, 1993 ; Evans, 1996).

1.2.1.7. Pancréas

La partie exocrine du pancréas synthétise le suc pancréatique, qui contient une solution tampon de bicarbonates, laquelle neutralise l'action des acides gastriques ainsi que plusieurs enzymes digestives. Ces enzymes décomposent les lipides, les protéines, et les glucides complexes dont l'amidon principalement. Les îlots de Langerhans qui composent la partie endocrine du pancréas produisent l'insuline et le glucagon qui contrôlent les concentrations de glucose dans le sang (Hill, 1971 ; King et McLelland, 1984 ; Evans, 1996 ; McLelland, 1979 ; Duke, 1993).

1.2.1.8. Foie

Le foie d'un oiseau est composé de deux lobes dont une des fonctions est la production de la bile. La bile est une solution aqueuse contenant des sels biliaires, des pigments dont la bilirubine -produit de la dégradation de l'hémoglobine, du cholestérol, des phospholipides et des électrolytes. Elle émulsionne les graisses en les décomposant physiquement en particules plus facilement digestibles par les enzymes intestinales et pancréatiques. Cet organe détoxifie les substances toxiques pour l'organisme, dégrade certaines hormones et fabrique certaines substances essentielles pour

l'organisme (cholestérol, protéines du sang, protéines de la coagulation et lipoprotéines) (Hill, 1971 ; King et McLelland, 1984 ; Evans, 1996 ; McLelland, 1979 ; Duke, 1993).

1.2.1.9. Vésicule biliaire

La vésicule biliaire est le lieu de stockage de la bile. Elle est reliée au duodénum par le canal cystique. La bile est concentrée par déshydratation et est libérée dans le duodénum lorsque les graisses stimulent une réponse hormonale. Certaines espèces aviaires (pigeon, autruche, etc.) en sont dépourvues (Hill, 1971 ; King et McLelland, 1984 ; Evans, 1996 ; McLelland, 1979 ; Duke, 1993).

1.2.1.10. Cloaque

Il est divisé en trois parties : le *coprodaeum* (qui collecte la partie fécale des fientes d'origine intestinale), l'*urodaeum* (qui reçoit l'urine et les urates des reins par l'intermédiaire des uretères ainsi que le sperme et les œufs du tractus génital) et le *proctodaeum* (stocke temporairement et expulse les fientes). L'anus est doté d'un sphincter musculaire qui en contrôle la fermeture (Hill, 1971 ; King et McLelland, 1984 ; Evans, 1996 ; McLelland, 1979 ; Duke, 1993).

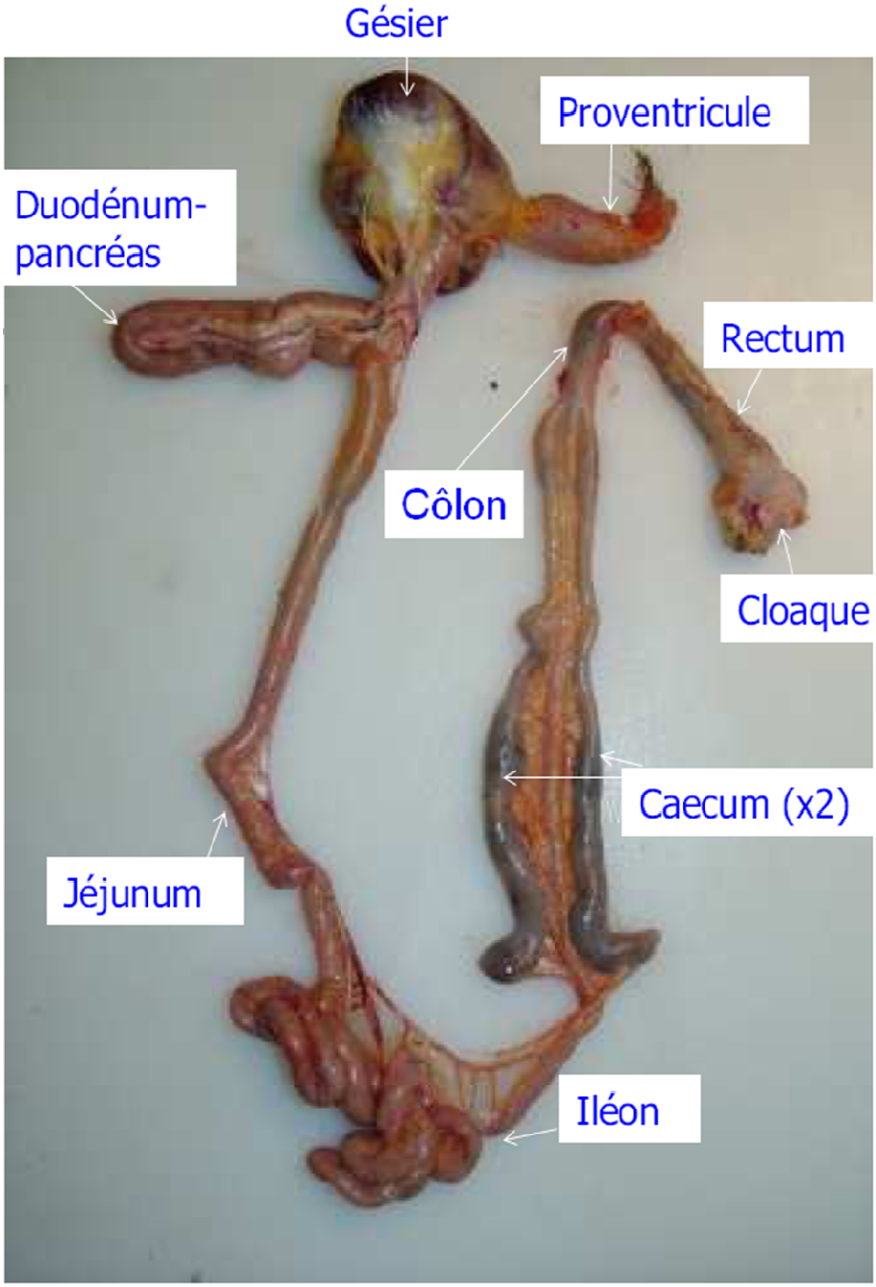


Figure 6. Tube digestif d'un poulet (adapté de Guérin, 2010).

1.2.2. Physiologie

Lors de la déglutition, le bol alimentaire est lubrifié par la salive riche en mucus, ce qui facilite son passage vers l'œsophage. Les contractions péristaltiques des muscles œsophagiens permettent ensuite sa progression vers le jabot chez les oiseaux qui en sont dotés. Là, il reste en attente et se ramollit avant de gagner l'estomac. Les Psittacidés par exemple utilisent cette nourriture ramollie pour la régurgiter à leurs jeunes, alors que les Columbidés produisent un "lait de jabot" destiné à alimenter les oisillons durant leurs premiers jours de vie.

Dans l'estomac glandulaire, ou proventricule, débute la digestion sous l'effet des sucs gastriques. C'est le début de la digestion chimique des protéines.

Le bol alimentaire rejoint ensuite le second estomac ou ventricule. Le gésier sert de filtre en séparant les éléments non digestibles pendant que les parties digestibles sont dirigées par des contractions musculaires vers l'intestin. Le ventricule exerce une action mécanique puissante sur les aliments ingérés permettant leur fragmentation et promouvant ainsi l'action des sucs gastriques. Les aliments peuvent circuler si nécessaire dans les deux sens, du proventricule au ventricule et vice-versa pour une meilleure dégradation de la nourriture.

Des petites quantités de nourriture franchissent ensuite le pylore et entrent dans l'intestin grêle. Le duodénum reçoit la bile et le suc pancréatique et l'aliment passe par le reste de l'intestin grêle où est absorbée la majeure partie des nutriments simples issus de la digestion.

Les nutriments restants sont ensuite absorbés par les capillaires sanguins au niveau du gros intestin et des cæca (dans les espèces où ils existent), et transportés vers le foie.

Le foie métabolise presque tous les nutriments. Il absorbe les acides aminés, les acides gras et le glucose, prélevant ce dont ses cellules ont besoin, stockant l'excédent et mobilisant ses réserves dans le circuit pour les autres cellules du corps. Il joue également un rôle dans le contrôle de la glycémie. Le glucose est en effet stocké sous forme de glycogène hépatique. Quand sa concentration sanguine diminue, le glycogène est hydrolysé pour libérer du glucose. La néoglucogenèse permet à l'organisme de synthétiser du glucose à partir des protéines ou des lipides lorsque les réserves de glycogène sont épuisées.

La fraction non digestible des aliments est acheminée vers le cloaque, puis évacuée.

1.2.3. Mécanismes de défense

Chez les oiseaux comme chez les mammifères, il existe un système immunitaire propre au tractus digestif composé de plusieurs effecteurs, appelé système immunitaire commun des muqueuses (Lillehoj et Trout, 1996).

Ce système est fait d'effecteurs tissulaires comme les GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissues*). Ces tissus effecteurs sont principalement constitués de cellules T, majoritairement mémoires et effectrices, mais ils contiennent aussi un grand nombre de lymphocytes B et de plasmocytes, principalement de l'isotype IgA (Lillehoj et Trout, 1996).

Le système immunitaire du tractus digestif comprend aussi des effecteurs cellulaires tels que les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, lymphocytes B) ainsi que des cellules immunorégulatrices et effectrices (lymphocytes B et T) homologues à celles du système immunitaire systémique.

Des études ont montré que l'exposition de ces tissus lymphoïdes à des antigènes étrangers entraîne une activation des lymphocytes T auxiliaires et des cellules B précurseurs d'IgA dans les GALT. Ces cellules migrent ensuite vers les sites effecteurs de la muqueuse comme la *lamina propria* de l'intestin afin d'induire une réponse IgA sécrétoire antigène-spécifique (Lillehoj et Trout, 1996).

Le système immunitaire commun des muqueuses est donc constitué de deux parties séparées mais connectées, les sites inductifs de la muqueuse, incluant les GALT, localisés à l'endroit de la première détection des antigènes environnementaux et les sites effecteurs de la muqueuse, incluant la *lamina propria* de l'intestin.

Un autre composant important du système immunitaire commun des muqueuses est le transport intra-épithélial des immunoglobulines sécrétoires du sang vers la muqueuse du tractus gastro-intestinal. Ceci est la principale source d'anticorps circulants dans les intestins (Lillehoj et Trout, 1996).

2. Les filières avicoles en France

2.1. Organisation des filières

Une filière est définie comme « un ensemble d'activités liées à la production, la transformation et la distribution d'un produit donné ». Les filières avicoles sont composées de plusieurs acteurs et l'organisation peut varier d'une filière à l'autre (ENITA, 2002).

Au sein de ces filières on peut distinguer deux grandes parties : une partie élevage et une partie production. La partie élevage est organisée de façon pyramidale avec une suite d'activités spécialisées selon le type de produits terminaux. Cela commence avec les sélectionneurs qui vont être responsables du progrès génétique par la création historique de « races » puis de lignées spécialisées en fonction du produit terminal recherché, par exemple des volailles pour la production de viande ou d'œufs de consommation ou encore des canards prêts à gaver pour la production de foie gras. Ensuite, interviennent les multiplicateurs qui sont en charge de la diffusion du progrès génétique et de la multiplication des animaux fournis par les sélectionneurs. Des croisements entre lignées peuvent intervenir à cet étage. Il en est ainsi de l'obtention du canard mulard, utilisé dans la production de foie gras, qui est le croisement intergénérique d'un canard de Barbarie avec une cane commune. Les multiplicateurs produisent donc des œufs à couver (OAC) qui vont ensuite être envoyés en couvoirs (ENITA, 2002). Les couvoirs vont alors stocker ces œufs à couver, puis les mettre en incubation (dont la durée va varier selon l'espèce) et enfin les œufs incubés vont être transférés dans les éclosoirs pour leur éclosion. Les couvoirs vont donc produire des animaux de 1 jour qui seront envoyés dans les élevages de production, lesquels présentent des typologies très variées en fonction de l'espèce élevée, des produits terminaux et de l'adhésion éventuelle à un signe de qualité (figure 7). L'élevage peut s'effectuer en bâtiments sur caillebotis ou litière et être associé ou non avec un parcours extérieur. En général, les bâtiments sont remplis en une fois par un lot de poussins âgés d'un jour et vidés également le même jour. Cette conduite en bandes dite en « tout plein tout vide » permet d'avoir des lots d'animaux très homogènes et limite les risques sanitaires car les bâtiments sont systématiquement décontaminés entre deux bandes successives. Il existe une forte segmentation de la production de volailles en fonction des signes de qualité (certification de conformité des produits, labels, Appellation d'Origine Contrôlée, agriculture biologique, marques, etc.) qui détermine selon le cas des conditions plus ou moins bien définies dans le cadre de cahiers des charges des modalités d'élevage des oiseaux (matières premières alimentaires, surfaces allouées aux animaux, accès à des parcours extérieurs…).

En amont du maillon « élevage » au sens large, on retrouve les fournisseurs d'intrants matériels (alimentation, litières, traitements, bâtiments, etc.) et immatériels (conseillers divers, techniciens spécialisés, vétérinaires, banques etc.).

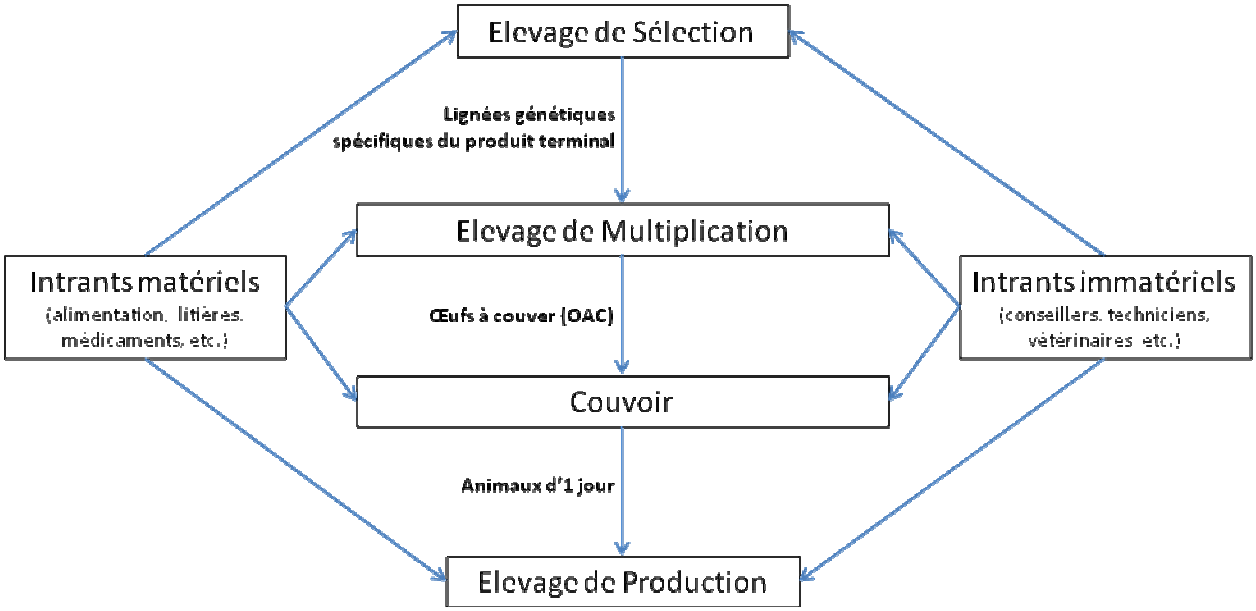


Figure 7. Spécialisation et organisation du maillon « élevage » des filières avicoles.

La deuxième grande partie des filières avicoles va de la production de produits terminaux (élevage de production) jusqu'à la distribution et la consommation. Les étapes successives de transformation et de commercialisation, des différentes filières avicoles varient en fonction des produits terminaux qu'ils génèrent ; nous ne présenterons ici que trois grands types de production : la production de volaille de chair (figure 8), la production d'œufs de consommation (figure 9) et la production de foie gras de canard (figure 10).

2.1.1. Volailles de chair

Dans le cas de la production de volailles de chair, l'élevage des animaux proprement dit comprend trois phases successives durant lesquelles les paramètres zootechniques tels que l'alimentation, la surface par animal ou l'accès à des parcours extérieurs peuvent varier. Le premier temps d'élevage, appelé démarrage, correspond à la période d'adaptation des animaux de 1 jour reçus du couvoir; elle nécessite une température ambiante élevée et un éclairement contrôlé ainsi que de nombreux accès

à l'alimentation et à l'eau. Durant le deuxième temps, appelée phase de croissance, la température ambiante et l'éclairement vont diminuer. L'alimentation fournie est plus riche et contribue à une forte croissance des oiseaux. La troisième et dernière phase avant abattage, est appelée phase de finition. Elle consiste en l'abaissement de la température ambiante ainsi que de la teneur énergétique des aliments (Guérin, www.avicampus.fr). Les durées de chacune de ces phases varient selon l'espèce aviaire (figure 8).

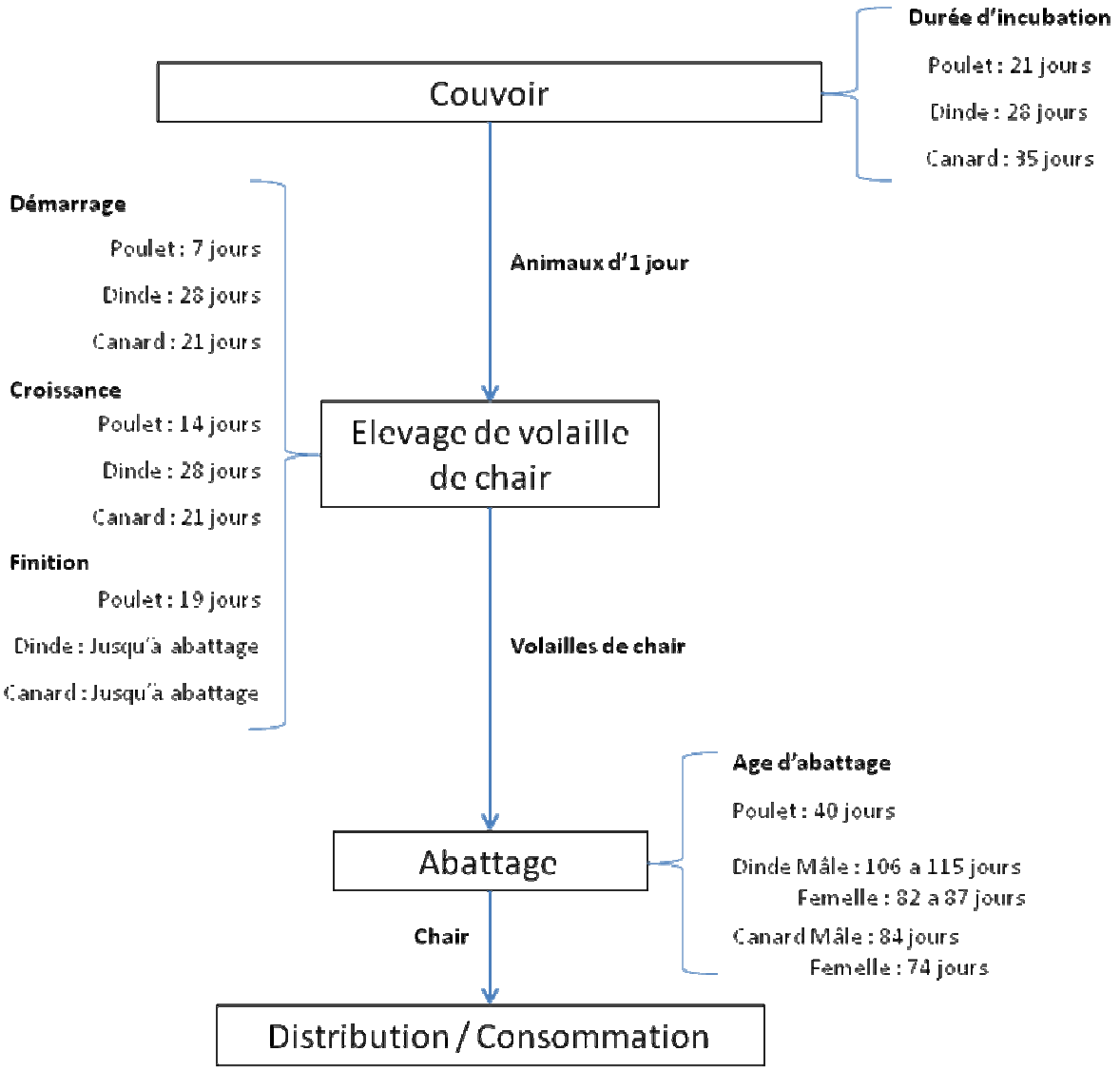


Figure 8. Production de volailles de chair (adapté de ENITA, 2002).

2.1.2. Volailles de ponte

La production d'œufs de consommation ne nécessitant que des femelles, un sexage des animaux de 1 jour est effectué au couvoir. Ensuite, l'élevage de ces poulettes d'un jour se déroule schématiquement en trois étapes. La phase de démarrage des futures poules pondeuses ou poulettes est relativement semblable à celle des volailles de chair. La phase de croissance doit fournir un équilibre alimentaire permettant une croissance optimale de l'animal tout en évitant un développement trop important du système digestif (Guérin, www.avicampus.fr). Durant cette phase, la photopériode (durée d'éclairage) est augmentée progressivement afin de contrôler l'apparition de la maturité sexuelle chez les poules. La troisième et dernière phase est appelée phase de ponte. C'est durant cette période que les poules vont produire des œufs. Une fois la période de ponte terminée (environ à l'âge de 65 semaines chez la poule), les animaux sont réformés et envoyés à l'abattage (figure 9). Les œufs sont envoyés directement vers la distribution dans le cas d'œufs de consommation, mais ils peuvent aussi être envoyés vers une casserie. Une casserie est une entreprise qui va fabriquer des ovoproduits à partir d'œuf de consommation. Ils sont obtenus à partir de l'œuf entier, de ses différents composants ou de leurs mélanges, après élimination de la coquille et des membranes, et sont destinés à la consommation humaine (Magdelaine, 2003, 2005).

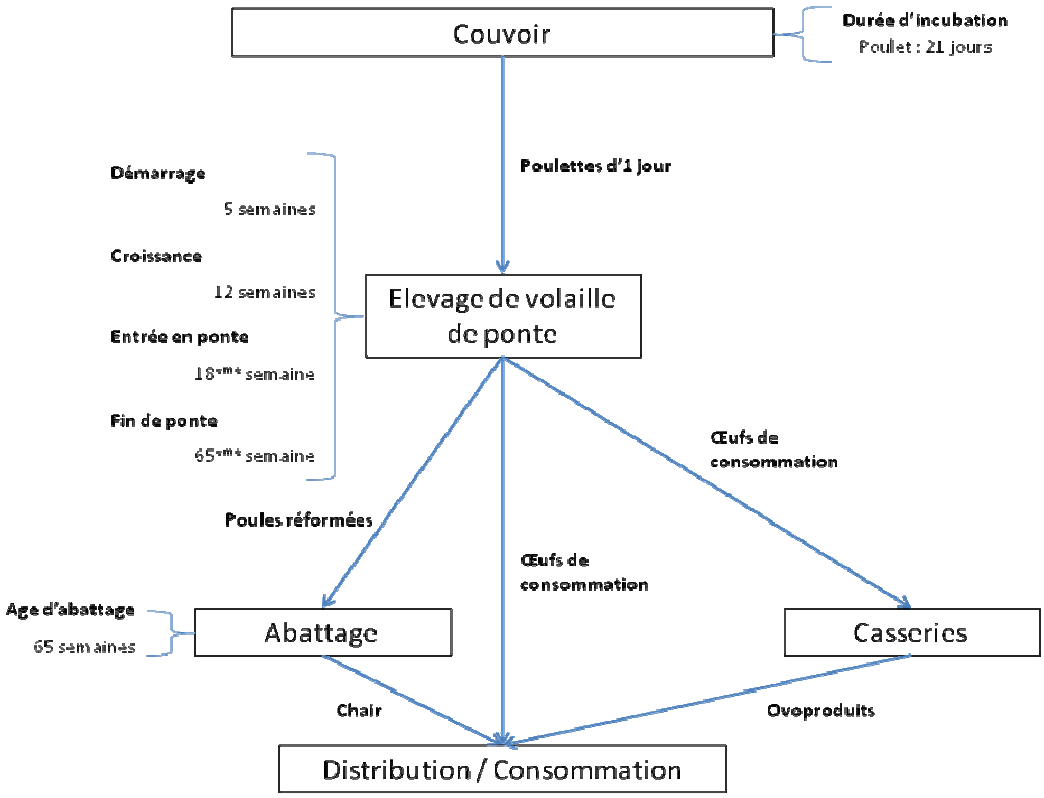


Figure 9. Production d'œufs de consommation et d'ovoproduits (adapté de ENITA, 2002).

2.1.3. Foie gras

Pour la production de foie gras, le canard représente la majorité de la production (98 %), le reste de la production étant représentée par l'oie (2 %). Dans le cadre de cette production, on retrouve un type d'élevage très semblable à celui de la volaille de chair avec la différence que seuls les canards mâles sont utilisés ce qui impose un sexage des animaux de 1 jour au couvoir. On retrouve les trois premières étapes : démarrage, croissance (avec accès à un parcours) et finition. Cependant, lors de la troisième étape, appelée aussi pré-gavage, un rationnement horaire et quantitatif de l'aliment est effectué afin de préparer les animaux au gavage. Le gavage correspond à un forçage alimentaire lié à l'ingestion contrôlée d'une ration hyperénergétique et hypoazotée, entrainant une stéatose hépatique réversible. Après cette période de gavage de 12 à 18 jours, les animaux sont envoyés à l'abattoir (Guérin, www.avicampus.fr) (figure 10).

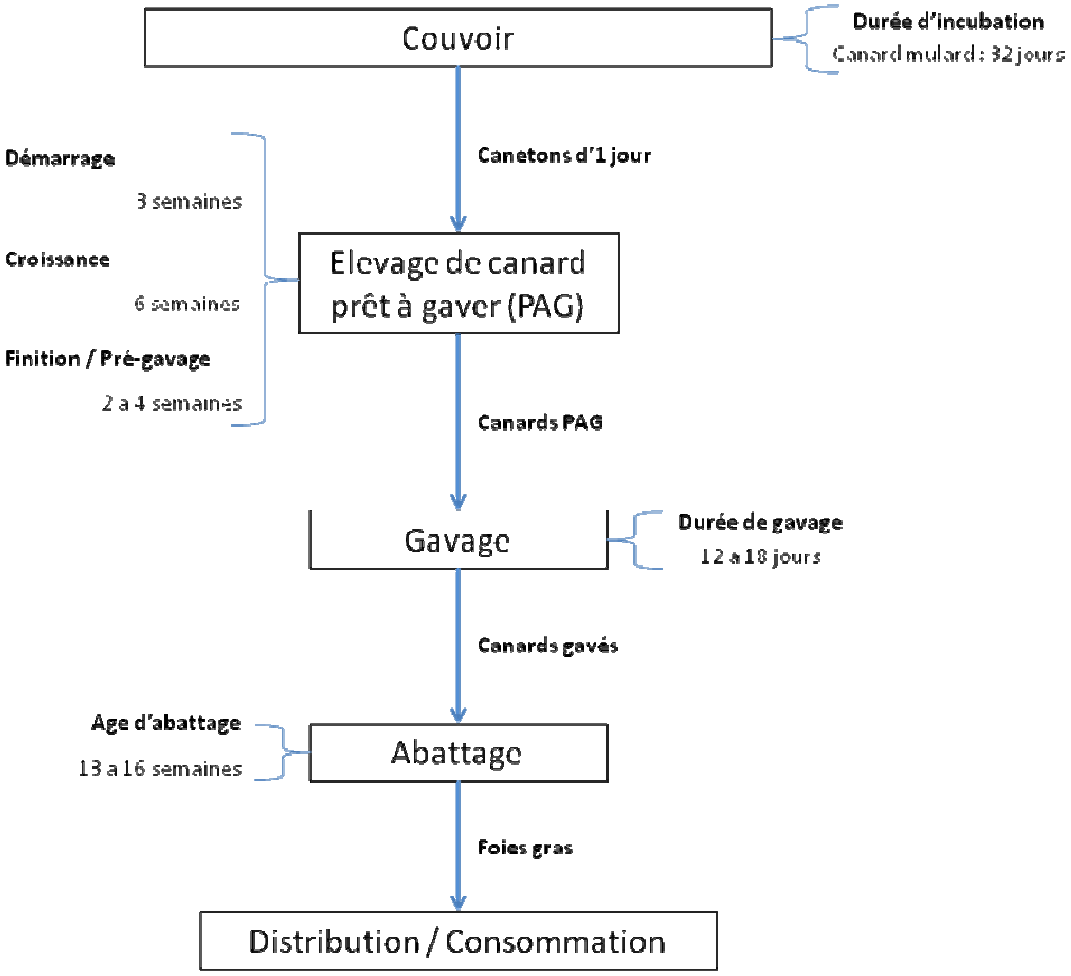


Figure 10. Description de la filière foie gras de canard (adapté de ENITA, 2002).

2.2. Filières en chiffres

En 2009, la France compte plus de 21000 élevages de plus de 500 volailles toutes espèces confondues. La partie abattage de la filière comprend à elle seule près de 190 entreprises de plus de 20 salariés et emploie près de 30000 salariés (Fédération des Industries Avicoles, www.fia.fr).

2.2.1. Volailles de chair

Avec près de 1,8 millions de tec (Tonnes Equivalent Carcasses) produites, la France est le plus gros producteur de volailles de chair en Europe (FranceAgriMer, 2010 ; Pendaries *et al.*, 2010 ; ITAVI, 2010 ; Magdelaine, 2003, 2005). Cette production est principalement représentée en volumes par le poulet (57 %) et la dinde (23 %) (figure 11).

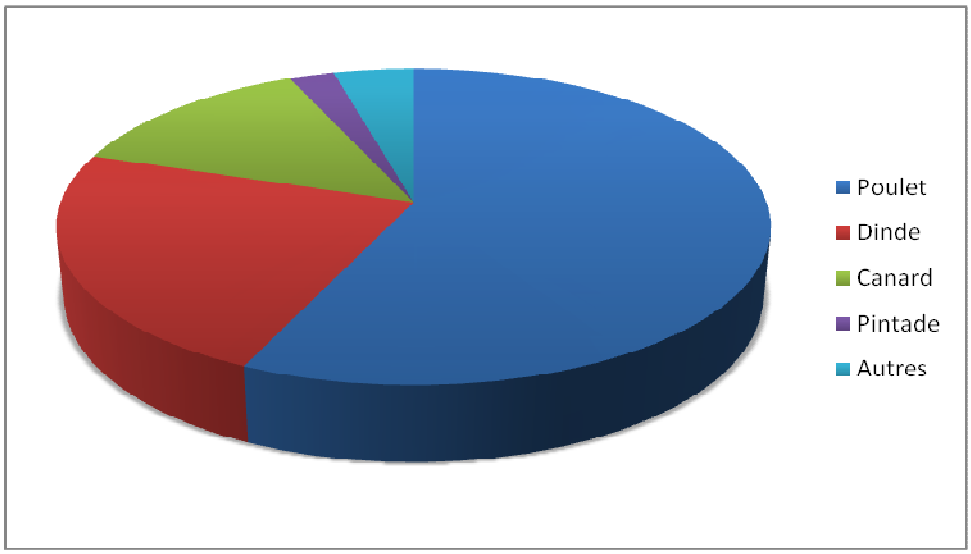


Figure 11. Production française de volaille de chair par espèce en 2009 (modifié de FranceAgriMer, 2010).

La production de volailles de chair est concentrée géographiquement. Deux régions, la Bretagne et les Pays de la Loire totalisent près de 80 % de la production nationale (figure 12).

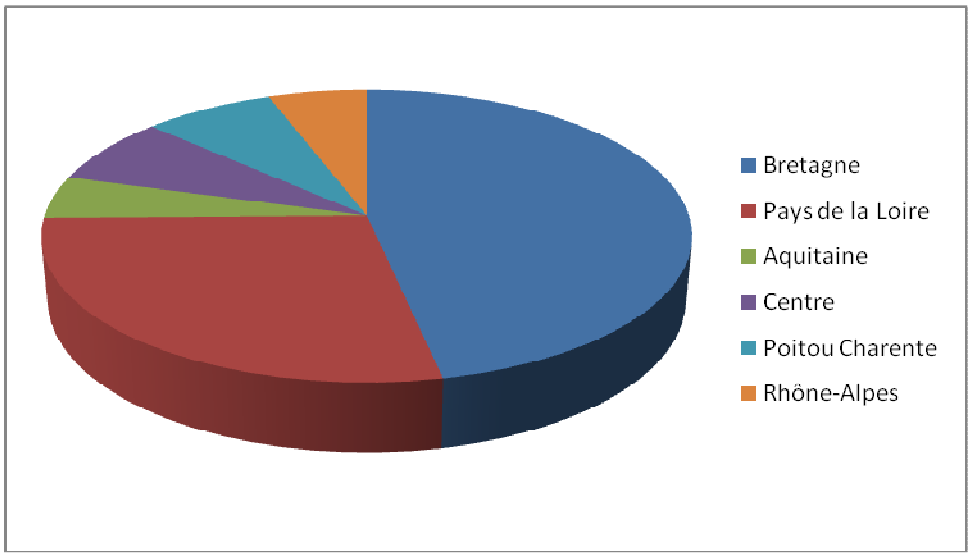


Figure 12. Production de volaille de chair française par région Française en 2009 (adapté de FranceAgriMer, 2010).

En 2009, la France possède un niveau d'autosuffisance de 114 %, ce qui signifie que la production de volailles de chair est supérieure à la consommation soit, 1,8 et 1,6 millions de tec respectivement (FranceAgriMer, 2010) (figure 13).

La volaille de chair en France est un marché de plus d'un milliard d'euros annuel, importations et exportations d'animaux vivants et de viandes confondues (figure 14).

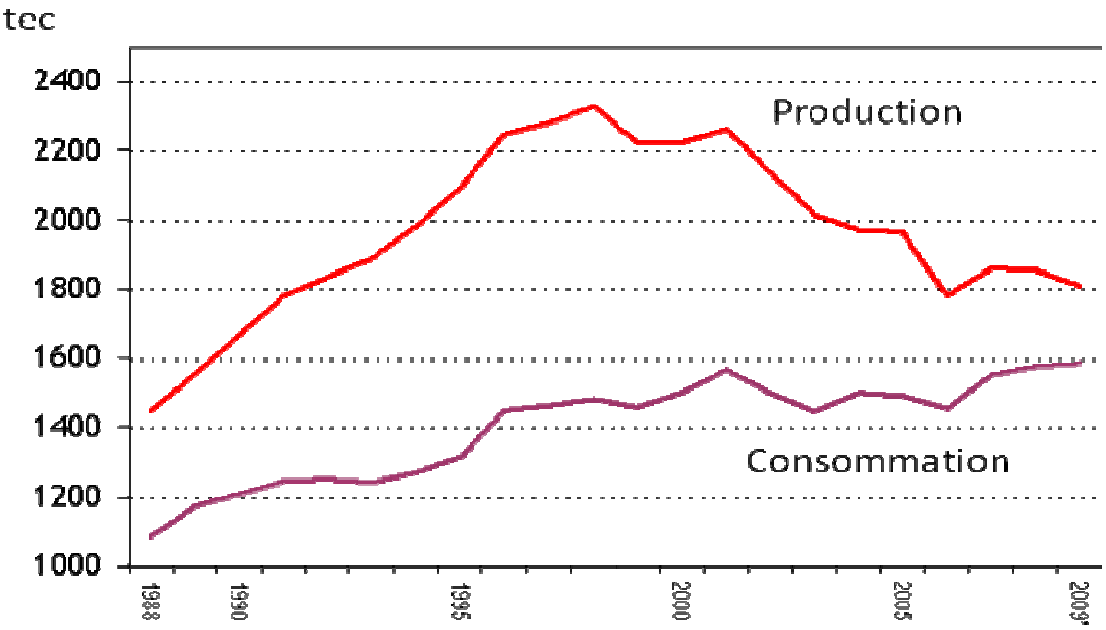


Figure 13. Production et consommation de volaille de chair en France de 1988 à 2009 (adapté de FranceAgriMer, 2010).

Plus de 50 % des exportations françaises de volailles de chair en Europe ont lieu vers le Royaume-Uni, l'Allemagne et l'Espagne (figure 15) alors que près de 75 % des importations européennes proviennent des Pays-Bas, de la Belgique et du Royaume-Uni (figure 16). En dehors de l'Union européenne, le principal pays importateur de viande de volailles de chair française est l'Arabie Saoudite avec 102.900 tec en 2009. Les exportations françaises de volailles de chair représentent en 2008 la valeur de 1,1 milliards d'euros alors que les importations ont été estimées à 713 millions d'euros (figure 14).

La distribution de la viande de volailles est majoritairement réalisée par les grandes et moyennes surfaces (62 %) loin devant la restauration (25 %) et les circuits spécialisés (figure 14).

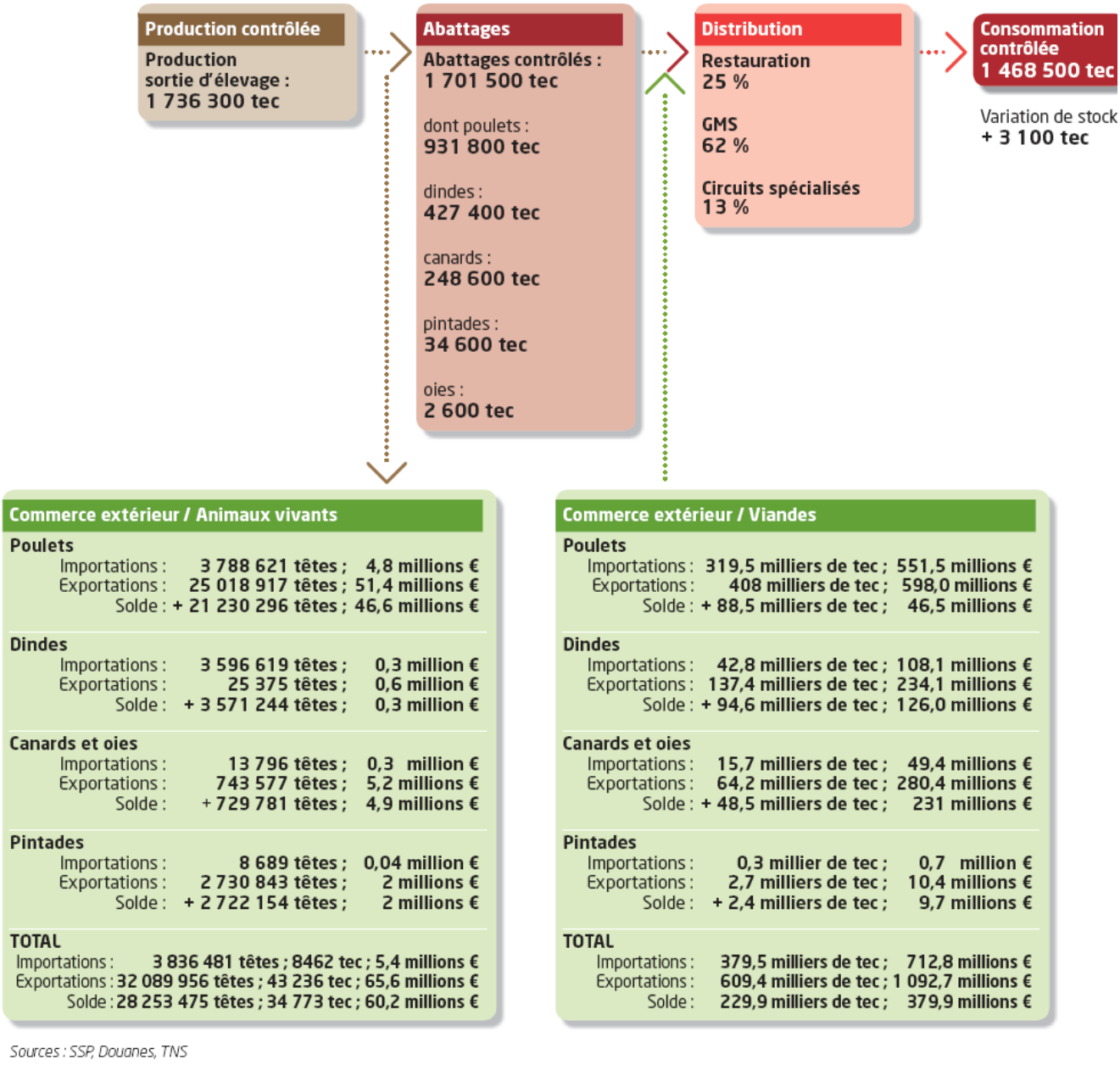


Figure 14. Résumé en chiffres de la filière volailles de chair française en 2008 (FranceAgriMer, 2009).

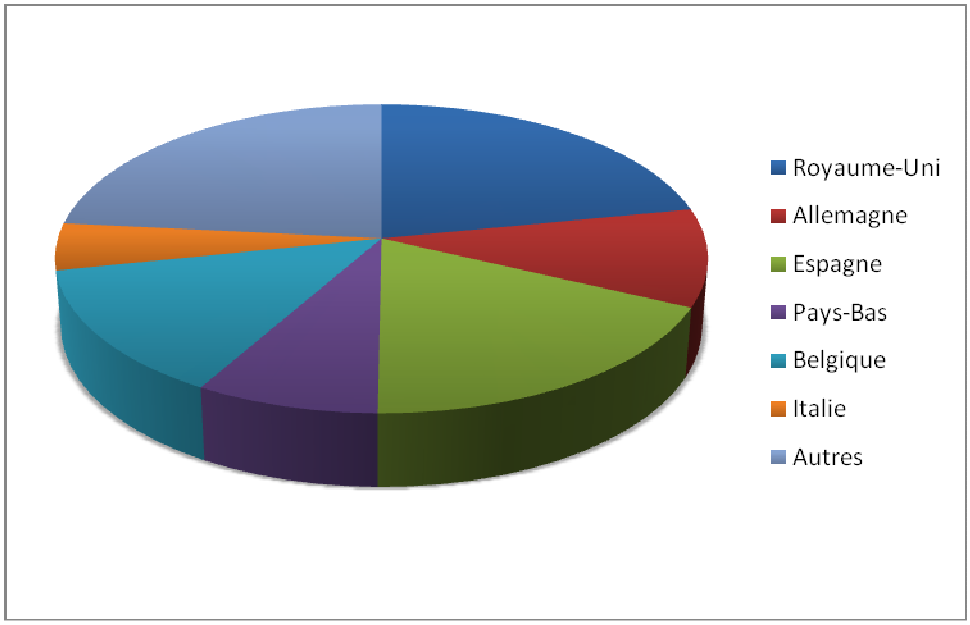


Figure 15. Exportations de volailles de chair françaises dans l'Union européenne en 2009 (adapté de FranceAgriMer, 2010).

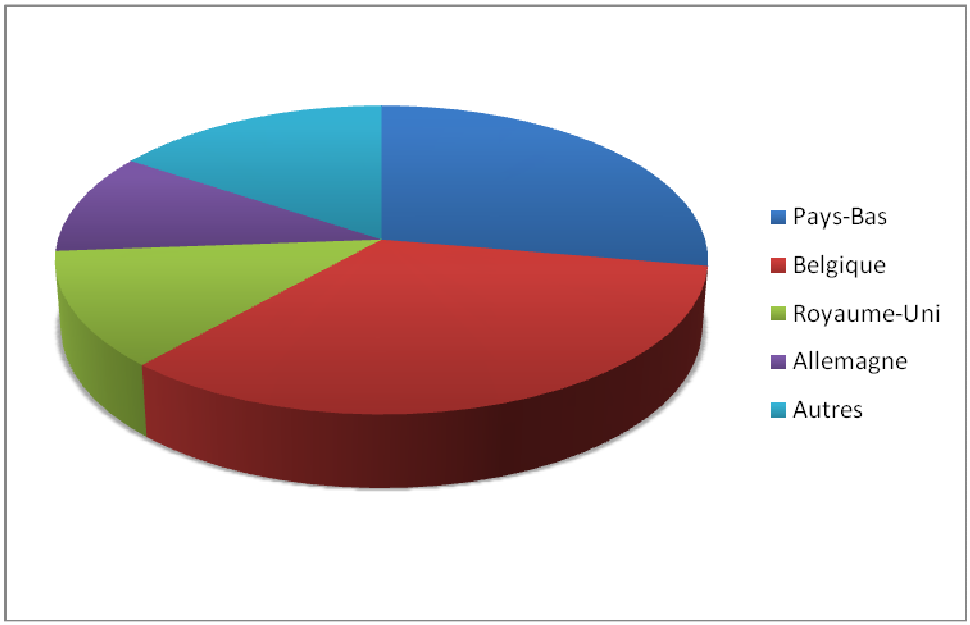


Figure 16. Importations par la France de volaille de chair provenant de l'Union européenne en 2009 (adapté de FranceAgriMer, 2010).

2.2.2. Œufs de consommation

En 2009, la production française d'œufs de consommation tous systèmes de production confondus se serait établie autour de 918300 Tonnes équivalentes Coquille (tecoq) ce qui correspond à 13,8 milliards d'œufs.

La consommation alimentaire d'œufs en 2009 serait d'environ 866 700 tecoq correspondant à une moyenne de 230 œufs moyens par habitant et de 13,1 milliards d'œufs au total (FranceAgriMer, 2010 ; Pendaries *et al.*, 2010). La France possède en 2009 un niveau d'autosuffisance de 105,9 %.

Le marché des œufs en France (exportation et importations confondues) pèse plus de 250 millions d'euros en 2009, comprenant les œufs de consommation et les ovoproduits) (FranceAgriMer, 2010).

Les exportations d'œufs en coquilles représentent plus de 26 000 tecoq dont près de 70 % sont destinées à la Belgique, aux Pays-Bas, à l'Allemagne et au Royaume-Uni (figure 17). Les importations sont estimées à 86 000 tecoq et 99 % proviennent de Belgique, des Pays-Bas et d'Espagne (FranceAgriMer, 2010).

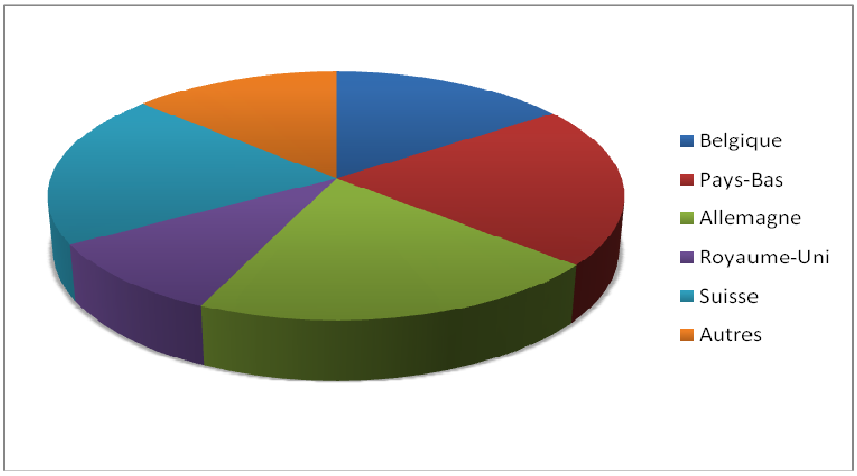
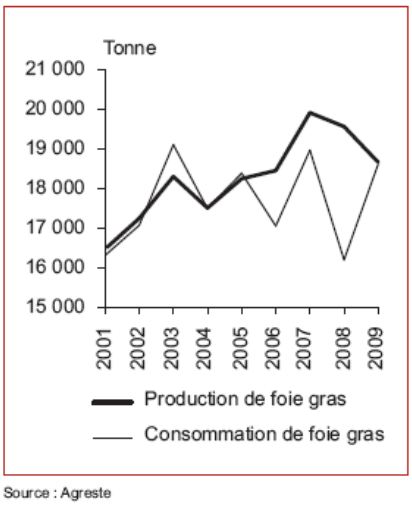


Figure 17. Exportations françaises d'œufs en coquilles en 2009 (en tecoq) (adapté de FranceAgriMer, 2010).

2.2.3. Foie gras

La France réalise 74 % de la production mondiale de foie gras. En 2009, la production diminue par rapport à 2008 suite aux recommandations de modération émises par l'interprofession du foie gras pour soutenir les cours, pour arriver à 18.200 tec. Cette production correspond assez précisément avec la consommation établie de foie gras en 2009 (figure 18). La production de canard gras est dominé par le canard mulard qui représente près de 98 % de la production (FranceAgriMer, 2010 ; Pendaries *et al.*, 2010).



Source : Agreste

Figure 18. Production et consommation de foie gras en France de 2001 à 2009 (FranceAgriMer, 2010).

Le marché du foie gras en France représente 150 millions d'euros en 2009 (Tableau 2).

Tableau 2. Résumé du marché français du foie gras en milliers d'euros (FranceAgriMer, 2010).

	2009
Exportations	**92 043**
réfrigéré	27 620
congelé	19 640
préparations et conserves	44 783
Importations	**55 853**
réfrigéré	23 861
congelé	30 496
préparations et conserves	1 496
SOLDE	**+ 36 190**

Près de 50 % des exportations françaises concernent l'Espagne (36 %), la Belgique (7 %) et le Royaume-Uni (6 %). Les deux principaux pays importateurs hors Union européenne sont la Suisse (21 %) et le Japon (10 %) (figure 19).

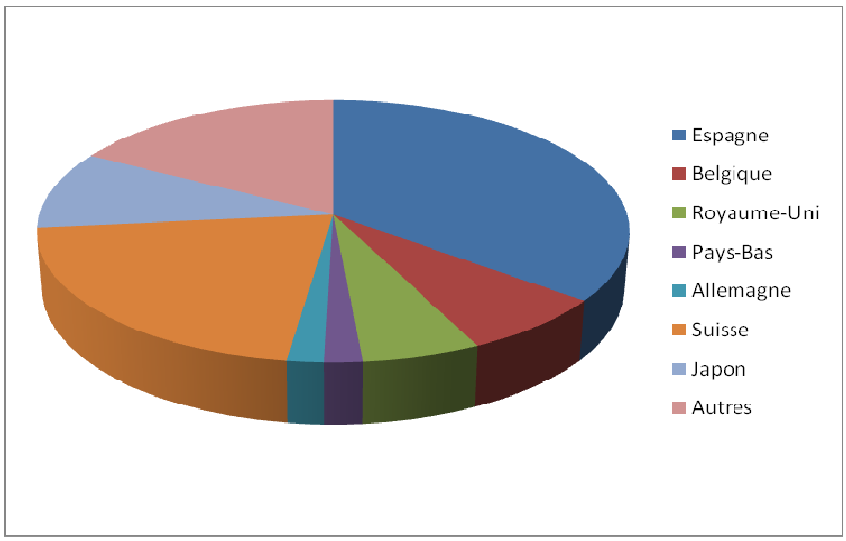


Figure 19. Bilan des exportations de foie gras français en 2009 (adapté de FranceAgriMer, 2010).

Près de 90 % des importations françaises proviennent de Bulgarie (60 %) et de Hongrie (30 %). Le solde commercial est légèrement négatif en 2009 (Tableau 3).

	2009
Exportations	**1 175,2**
UE 27	**687,0**
Espagne	418,3
Belgique	84,9
Royaume-Uni	67,9
Pays-Bas	21,7
Allemagne	20,7
Pays Tiers	**488,2**
Suisse	249,1
Japon	113,3
Importations	**1 184,7**
UE 27	**1 184,7**
Hongrie	358,9
Bulgarie	689,8
Pays Tiers	**0,0**
SOLDE	**-9,5**

Tableau 3. Bilan des exportations et importations de foie gras en France en 2009 (en tonnes) (FranceAgriMer, 2010).

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 2 : Les *Aspergillus* et les aspergilloses

1. Les champignons du genre *Aspergillus*

1.1. Historique

C'est Michelli, qui en 1729, donne le nom d'*Aspergillus* aux moisissures qu'il observe au microscope : il leur trouve une ressemblance très marquée avec le goupillon (« *aspergillus »* en latin) dont on se servait à l'église.

En 1809, Link nomme pour la première un champignon *Aspergillus glaucus*. L'ayant trouvé dans un *herbarium*, il en décrit les premières formes sexuées et les nomme *Eurotium herbariorum*. En 1872, Frésénius nomme pour la première fois *Aspergillus fumigatus*.

L'histoire de ces microorganismes, est ensuite surtout définie au travers de la découverte des affections dont ils sont responsables chez l'homme et l'animal.

En 1994, Pitt propose une nouvelle classification des *Aspergillus*, toujours en place à l'heure actuelle.

En 2005, Nierman *et al* séquencent les huit chromosomes composant le génome d'*Aspergillus fumigatus*.

En 2006, Balajee *et al.* montrent, grâce à une nouvelle méthode de typage moléculaire, qu'une identification strictement phénotypique peut conduire à des erreurs d'identification. Pour tenir compte des résultats de caractérisation moléculaire, un changement de classification est proposé avec la création de « sous-genres » appelés « sections ».

Une des dernières découvertes d'importance concernant *A. fumigatus*, est la description de son mode de reproduction sexuée en 2009 (O'Gorman *et al.*, 2009).

1.2. Systématique

Les champignons du genre *Aspergillus* sont des moisissures, autrement dit des champignons microscopiques filamenteux, qui vivent en saprobiose dans de très nombreux écosystèmes. L'ensemble des filaments (ou hyphes) constitue le mycélium dont le développement habituel comprend une phase végétative avec croissance et nutrition, et presque simultanément, une phase de multiplication asexuée au cours de laquelle se forment des spores (ou conidies) qui assurent la dispersion. La germination des spores est à l'origine de la formation d'un nouveau mycélium. De plus, une multiplication sexuée (reproduction) est connue chez certaines espèces aspergillaires.

Classiquement, les champignons sont regroupés, au sein des êtres vivants, dans un règne distinct, celui des Mycètes ou Fungi (Whittaker, 1969 ; Hibbett *et al.* 2007) caractérisé par des organismes eucaryotes à structure syncytiale, sans chloroplastes, avec présence de chitine dans la paroi et d'ergostérol dans la membrane plasmique, et pour la plupart dépourvus d'éléments mobiles. Les études récentes concernant la phylogénie moléculaire des eucaryotes aboutissent à diverses propositions de classification : par exemple la division des eucaryotes en six super-groupes [*Amoebozoa, Archaeplastida, Chromalveolata, Excavata, Opisthokonta, Rhizaria*] (Simpson et Roger 2002, 2004 ; Adl *et al,* 2005) ou en deux clades primitifs bikontes et unikontes (Cavalier-Smith, 2002 ; Kim et Graham 2008) ; mais quels que soient les systèmes proposés et les discussions qu'ils suscitent, les champignons (*Fungi*) apparaissent comme un groupe proche de celui des animaux (*Metazoa*) partageant des racines communes au sein des *Opisthokonta* (Steenkamp *et al* 2006 ; Roger et Simpson 2009 ; Rogozin *et al*. 2009).

Le mode de reproduction sexuée est l'un des critères de la classification des champignons. Ce critère, qui définit la forme téléomorphe du champignon, permet de reconnaître quatre groupes principaux : les Chytridiomycètes, les Zygomycètes, les Basidiomycètes et les Ascomycètes. Cependant, certains champignons sont le plus souvent, voire exclusivement, rencontrés à un stade de multiplication asexuée, dit anamorphe. Lorsque la reproduction n'est pas connue, ces organismes sont alors classés d'après le mode de production des spores asexuées (conidies) dans un groupe à part, celui des Deutéromycètes ou *Fungi imperfecti.* La plupart des moisissures qui prolifèrent dans les bâtiments d'élevage se retrouvent dans des circonstances de croissance favorisant uniquement le stade asexué. La réalité est en fait plus complexe comme le démontrent les analyses moléculaires ; par souci d'actualisation, on se réfèrera à la synthèse publiée par Hibbett et collaborateurs en 2007.

Il apparaît donc que, au sein du règne des *Fungi*, les *Aspergillus* appartiennent à l'embranchement des *Ascomycota* qui regroupe des champignons à mycélium cloisonné (champignons septomycètes) présentant une reproduction sexuée avec formation d'asques contenant des ascospores. Les

champignons du genre *Aspergillus* sont inclus dans le sous-embranchement des *Pezizomycotina*, la classe des *Eurotiomycetes*, la sous-classe des *Eurotiomycetidae*, et l'ordre des *Eurotiales* qui est caractérisé par des asques contenus dans des ascocarpes de type cléistothèce ou plus rarement gymnothèce, et par une multiplication asexuée par phialides produisant des phialoconidies (Hibbett *et al.* 2007 ; Bennett, 2010).

Le genre *Aspergillus* est caractérisé morphologiquement par la présence de filaments conidiophores renflés à leur sommet par une vésicule partiellement couverte de phialides fixées ou non à des métules, le tout formant une entité spécifique appelée « tête aspergillaire » (figure 20) (Chermette et Bussiéras, 1993).

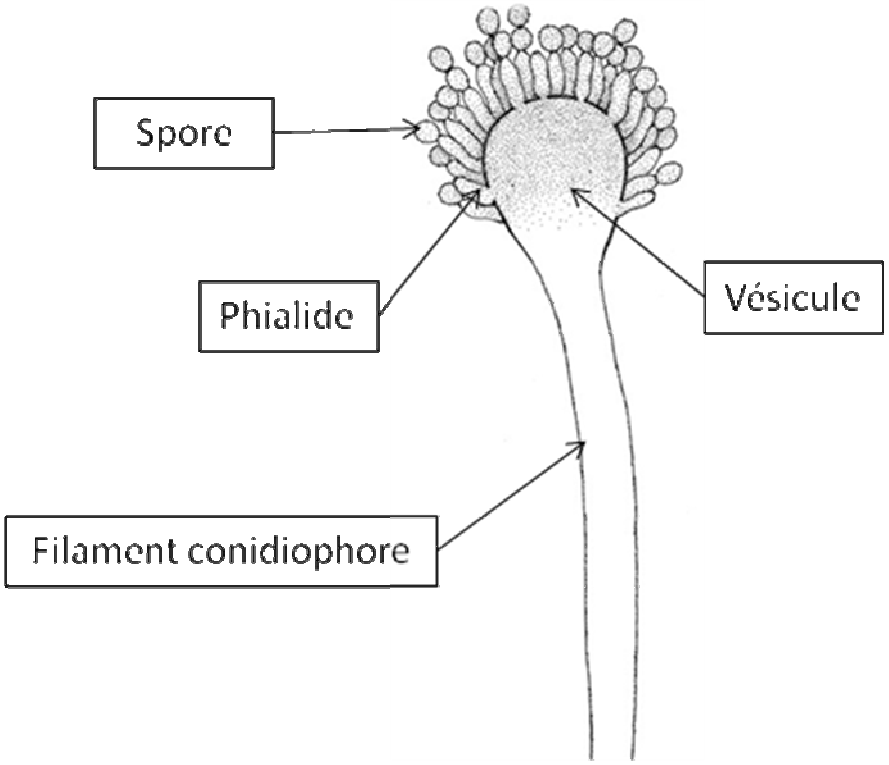


Figure 20. Représentation d'une tête aspergillaire (modifiée d'après De Hoog *et al.*, 2000).

Plus de 300 espèces appartenant au genre *Aspergillus* ont été décrites. Les critères d'identification sont principalement morphologiques. Cependant, l'application des outils de caractérisation moléculaire a montré que cette identification strictement phénotypique pouvait conduire à des erreurs d'identification et que certains regroupements d'espèces n'avaient pas de fondement (Balajee *et al.*, 2006). Pour tenir compte des résultats de caractérisation moléculaire, des « sous-genres » appelées « sections » ont été créés. Les sections regroupent toutes les espèces

morphologiquement semblables mais génétiquement différentes. Les moisissures du genre *Aspergillus* (et des genres correspondant aux téléomorphes) sont actuellement réparties dans 6 sections principales : *Usti*, *Flavi*, *Nigri*, *Circumdati*, *Clavati* et *Fumigati*. La section *Fumigati* regroupe 33 espèces (23 du genre *Neosartorya* et 10 du genre *Aspergillus*). Elle inclut *Aspergillus fumigatus* ainsi que *Aspergillus lentulus*, une espèce récemment identifiée grâce à l'analyse de séquences partielles des gènes de la ß-tubuline et de la calmoduline (Balajee *et al.*, 2005).

Parmi les espèces responsables d'aspergillose chez l'homme et chez les oiseaux, *Aspergillus fumigatus* est la plus communément rencontrée (Chute *et al.*, 1956 ; Ghori et Edgar, 1973, 1979 ; Kunkle, 2003). Les espèces *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* ainsi qu'*Aspergillus nidulans* et *Aspergillus terreus* sont incriminées comme agents pathogènes possibles mais dans une moindre mesure en zone tempérée (Jones et Orosz, 2000).

1.3. Caractères macroscopiques et microscopiques

Afin d'identifier une espèce d'*Aspergillus*, il convient dans un premier temps d'observer l'aspect macroscopique de la culture. Les caractères phénotypiques à apprécier sont la taille, la texture et la couleur des colonies. Les milieux de culture utilisés pour la diagnose sont le milieu Sabouraud et le milieu Malt. Par ailleurs, pour identifier précisément l'espèce, il est indispensable de faire une observation microscopique d'un fragment de mycélium et d'observer les critères morphologiques relatifs aux têtes aspergillaires et aux filaments conidiophores.

Les colonies d'*Aspergillus fumigatus* sont extensives à croissance rapide (environ 4 cm en 7 jours à 25-37 °C). Elles présentent un aspect en gazon blanc puis vert ou gris et enfin brun sombre avec un aspect de fumée, le dessous de la culture est de couleur foncée (Schmidt et Wolff, 1997) (figure 21).

Figure 21. Aspect d'une colonie d'*Aspergillus fumigatus* sur milieu de Sabouraud (adapté de http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/)

Le conidiophore est court, lisse, incolore et se termine par une vésicule en forme de massue dont la taille varie entre 20 et 30 µm. Les phialides en forme de bouteille à col rétréci, parallèles, sont disposées directement sur la vésicule (absence de métules) et leur implantation est limitée à la partie supérieure de cette vésicule (disposition en colonne des chaînes de phialoconidies). Les conidies sont globuleuses, échinulées, de taille homogène (2,5 à 3 µm) et pigmentées en gris-vert à maturité (figure 22).

Figure 22. Aspect microscopique de têtes aspergillaires d'*Aspergillus fumigatus* (adapté de Latgé et Steinbach, 2009).

Par ailleurs, la localisation des *Aspergillus* sur des coupes histologiques peut se faire à l'aide de colorations telles que les colorations à l'acide périodique Schiff (PAS) qui fait apparaître les éléments fongiques en rouge-rosé (figure 23), la coloration argentique de Gomori-Grocott qui colore les éléments fongiques en noir (figure 24). Les filaments aspergillaires, septés, ont un diamètre assez constant et présentent des ramifications dichotomiques régulières. Des têtes aspergillaires sont parfois observées dans certaines lésions. Des techniques d'immuno-histochimie sont également utilisables (figure 25) (Olias *et al*, 2010).

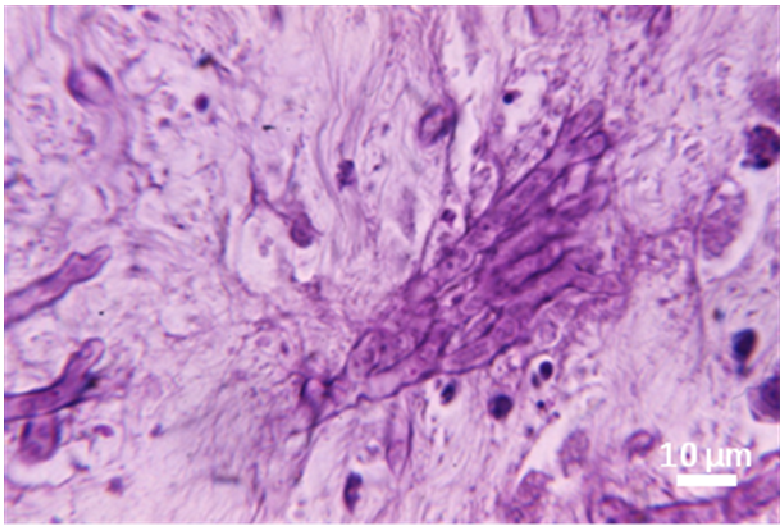


Figure 23. Coloration à l'acide périodique Schiff (PAS) d'une coupe histologique. Les filaments fongiques apparaissent en mauve (Service de Parasitologie ENVA).

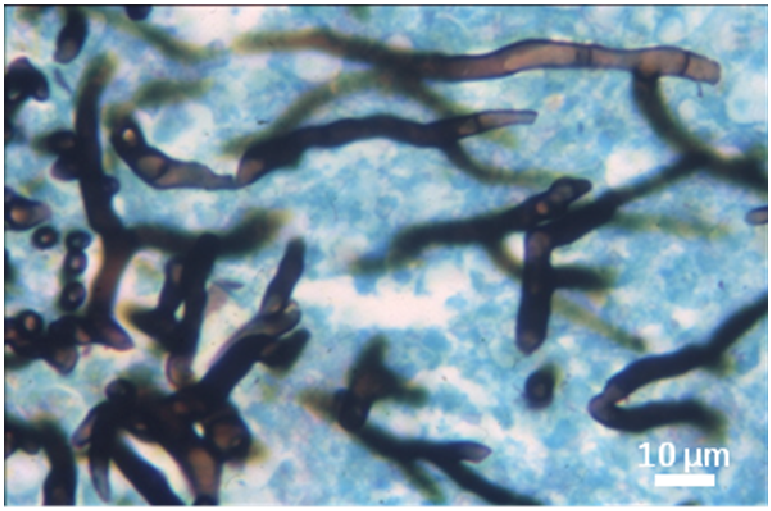


Figure 24. Coloration argentique d'une coupe histologique. Les filaments fongiques apparaissent en brun sombre (Service de Parasitologie ENVA).

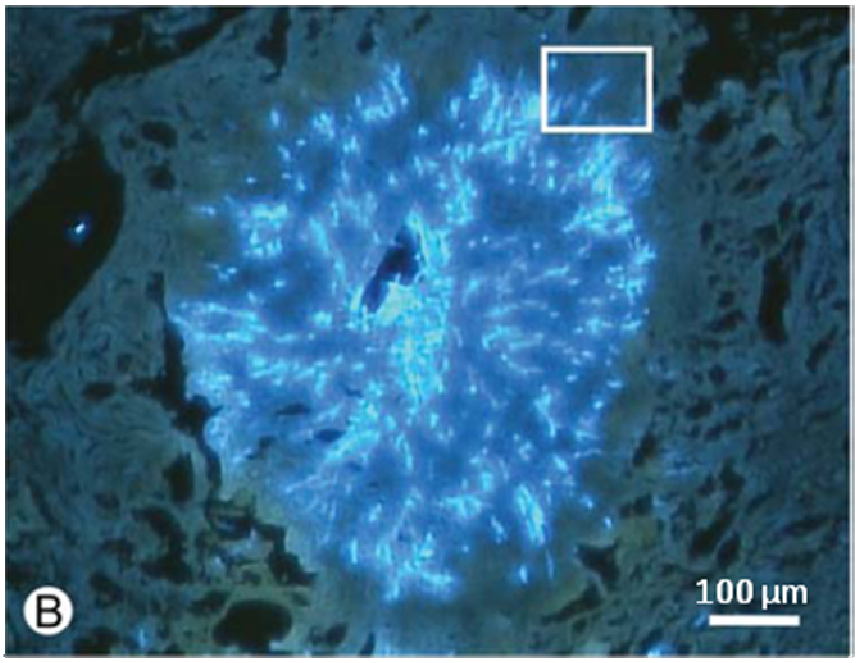


Figure 25. Coloration de Fontana Masson couplée avec un marquage fluorescent des éléments fongiques par le Blankophor (Olias *et al*, 2010).

1.4. Cycle de développement

Les champignons du genre *Aspergillus* vivent en saprobiose dans le sol, sur la matière organique en décomposition où ils jouent un rôle important dans le cycle du Carbone et de l'Azote organiques (Haines, 1995). Cependant les *Aspergillus* sont également capables d'exprimer un pouvoir pathogène et ont donc également un cycle de développement au sein d'organismes vivants.

L'espèce *A. fumigatus* croît dans une large gamme de température (de 12 à 57°C avec un optimum situé autour de 38°C). Elle peut survivre à des températures atteignant 70°C et à des taux d'humidité relative variant entre 11 et 96 % (Pasanen *et al*, 1991).

Dans l'environnement, les *Aspergillus* se multiplient presque exclusivement sur un mode asexué. Dans les conditions optimales de développement et de multiplication, les conidies germent (C) et le mycélium ainsi obtenu (D) se couvre de têtes aspergillaires (E) qui produisent des milliers de conidies microscopiques (B) (figure 26) (Adams, 1994 ; Adams *et al.,* 1998).

Les conidies sont libérées dans l'air. Leur caractère hydrophobe et leur faible diamètre (2,5 à 3 µm pour *A. fumigatus)* favorisent la dissémination aérienne des conidies (Latgé, 1999).

Certaines espèces comme *A. nidulans, A. fisherianus* et *A. fumigatus* ont aussi un mode de reproduction sexuée avec formation d'asques et d'ascospores (Kunkle, 2003 ; O'Gorman *et al*, 2009).

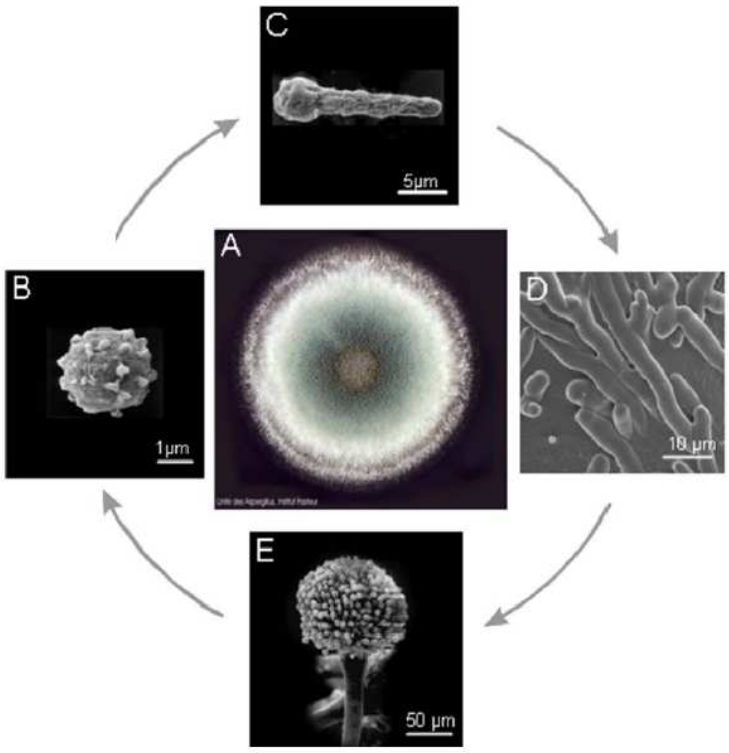


Figure 26. Cycle de développement des champignons du genre *Aspergillus* (adapté de Desoutter, 2008).

1.5. Facteurs de virulence

Le développement des *Aspergillus* au sein d'un organisme vivant nécessite une capacité d'adaptation importante. Cette capacité est la clé de sa virulence, c'est-à-dire sa faculté à se multiplier dans l'organisme et à résister aux défenses de l'hôte.

Plusieurs types de facteur de virulence ont été décrits chez *A. fumigatus* comme des adhésines, des toxines et certains pigments mais aussi toutes les enzymes du métabolisme permettant le développement du champignon au sein de l'hôte (Askew, 2008).

Pour coloniser l'hôte, *Aspergillus fumigatus* doit être capable d'adhérer et de pénétrer le système respiratoire. Des adhésines et des hydrophobines localisées à la surface des conidies favorisent les interactions entre les protéines et/ou les cellules de l'hôte (Bromley et Donaldson, 1996 ; Bouchara *et al.*, 1997 ; Madan *et al.*, 1997 ; Upadhyay *et al.*, 2009).

Une fois que les conidies ont adhéré à la surface de l'épithélium respiratoire, le champignon doit résister aux défenses immunitaires. Les hydrophobines sont des molécules situées à la surface des conidies et qui leurs confèrent leur hydrophobicité. Des souches mutées au niveau de ces protéines ont un caractère invasif atténué (Thau *et al.*, 1994 ; Parta *et al.*, 1994). Ces protéines semblent empêcher la reconnaissance des conidies par le système immunitaire (Aimanianda *et al.*, 2009). Par ailleurs les conidies d'*A. fumigatus* et d'*A. flavus*, mais pas celles d'autres espèces aspergillaires (*A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*), ont la capacité d'inhiber l'apoptose de cellules épithéliales respiratoires (Berkova *et al.,* 2006 ; Féménia *et al.,* 2009). L'espèce *A. fumigatus* peut synthétiser plusieurs mycotoxines, notamment la gliotoxine, molécule immunosuppressive et cytotoxique et le verruculogène qui provoque des modifications *in vitro* des cellules de l'épithélium respiratoire de l'homme (Khoufache *et al.*, 2007). La gliotoxine inhibe la phagocytose par les macrophages et induit l'apoptose de ces mêmes cellules. Elle est aussi capable de bloquer l'activation des lymphocytes B et T et la production de lymphocytes CD8+ (Eichner *et al.*, 1986 ; Mullbacher *et al.*, 1985 ; Sutton *et al.*, 1994, 1996).

Aspergillus fumigatus est capable de synthétiser un très grand nombre d'enzymes (Hogan *et al.*, 1996). On décrit la présence d'enzymes collagénolytiques ou élastinolytiques facilitant la colonisation du tissu pulmonaire (Monod *et al.*, 2002 ; Rementeria *et al.*, 2005), mais aussi celle de RNases capable de cliver les ribosomes de cellules eucaryotes et ainsi d'entrainer la mort de la cellule (Fando *et al.*, 1985 ; Lamy *et al.*, 1991 ; Ok *et al*, 2009).

Le rôle inhibiteur de la phagocytose par des pigments des conidies (comme le dihydroxynaphthalène-mélanine) a été démontré lors de plusieurs études (Jahn *et al.*, 1997 ; Tsai *et al.*, 1998). De ce fait, les souches dépigmentées sont moins virulentes que les souches possédant des conidies vertes.

La diversité génétique des souches circulant dans l'environnement est considérable et chacune de ces souches semble être capable de provoquer une aspergillose chez des hôtes qui peuvent être très différents (Duarte-Escalante *et al.*, 2009). Cela démontre à l'évidence que la pathogénie des aspergilloses dépend non seulement de facteurs de virulence de l'agent pathogène mais aussi et surtout de l'état immunitaire de l'hôte.

2. Les aspergilloses

Les *Aspergillus*, et plus particulièrement *Aspergillus fumigatus* en zone tempérée, sont capables de se développer et d'exprimer un pouvoir pathogène chez beaucoup d'espèces animales comme les ruminants, les équidés, le chien, le chat, le porc, les lagomorphes, les rongeurs, les primates et certains mammifères marins (Jones et Orosz, 2000 ; Kunkle, 2003 ; Tell, 2005 ; Lepage *et al.*, 2004 ; Meler, 2008). Cependant, les animaux les plus sensibles à l'aspergillose demeurent les oiseaux. Et les mêmes souches du champignon sont capables d'infecter des hôtes différents (Féménia *et al.*, 2009).

2.1. Historique

2.1.1. Historique des aspergilloses chez l'homme

Le premier cas répertorié d'infection fongique humaine est attribué à Bennett (1842). L'auteur décrit la présence de champignons dans les crachats, les cavernes et les masses tuberculeuses pulmonaires d'un patient. D'autres descriptions furent publiées à la même époque : Rayer en 1842 rapporte un cas de mycose se développant dans la plèvre d'un patient souffrant de pneumothorax. Remak trouve des fragments mycéliens dans les crachats de patients atteints d'une pneumopathie (1845). Dans toutes ces publications, la description du champignon demeure imprécise et il est impossible de savoir quelle espèce fongique est précisément en cause.

Le premier cas de « pneumomycose », dans lequel la présence d'un *Aspergillus* est avérée, est dû à Sluyter *et al.* (1847). Les auteurs décrivent le cas d'une patiente chez qui une masse noire, adhérente, composée de filaments mycéliens a été trouvée dans une caverne pulmonaire. Sur quelques filaments émergeant de cette masse, les auteurs décrivent une quantité considérable de cellules ovales correspondant à des spores. Ils identifient une mucorale mais Virchow, analyse les échantillons de façon détaillée en 1856 et conclut qu'il s'agit d'une aspergillose.

La mise en évidence en 1928 par Louis-Pasteur Vallery-Radot d'anticorps précipitant dans le sérum de sujets présentant une aspergillose pulmonaire marque le début de la détection sérologique de cette affection.

Dévé publie en 1938 (Levin, 1956) une observation de masse fongique qu'il appelle « mégamycétome intrabronchique ». Cette observation s'intègre dans le cadre des aspergillomes bronchiectasiants, entité décrite quelques années plus tard en 1951 par Monod, Pesle et Segretain (Monod *et al*, 1951).

La forme invasive de l'aspergillose humaine fut reconnue en 1951 par Eshougues et la forme allergique est décrite en 1952 par Hinson *et al*.

Ce n'est que 8 ans après la découverte de Monod *et al*, qu'ont été découverts par Pepys *et al* des anticorps précipitant anti-aspergillaires spécifiques (1959). Cette découverte sérologique permit de multiplier le nombre de cas dépistés y compris les formes cliniques latentes. A partir des années 1960, la bibliographie sur les aspergilloses s'enrichit considérablement.

En 1961, Drouhet démontre l'action de l'amphotéricine B sur les mycoses profondes permettant un traitement au long cours mais non dénué d'effets secondaires.

L'incidence des aspergilloses invasives a été multipliée par 4 depuis les années 1990 (Steinbach *et al.*, 2003). Cette augmentation est le reflet de l'augmentation du nombre d'allogreffes de moelle osseuse et de l'intensification des chimiothérapies anti-leucémiques. Dans le cas de greffe, le risque d'infection est diminué grâce aux autogreffes (Fabry *et al.*, 2000).

2.1.2. Historique des aspergilloses aviaires

Dans son livre intitulée « Etude sur l'aspergillose chez les animaux et chez l'homme», soutenue en 1890, le Dr Rénon dresse un historique précis des premiers cas d'aspergillose aviaire. Selon cet auteur, c'est en 1815 que, pour la première fois, Mayer décrit des moisissures dans les bronches, les sacs aériens et les poumons d'un geai (*Garrulus glandarius*). L'année suivante, le même type d'observation est rapporté par Jaeger chez un cygne tuberculé (*Cygnus olor*). Entre 1826 et 1841, plusieurs descriptions sont répertoriées chez des oiseaux ; Deslongchamps en 1841, détaille précisément le cas d'un canard eider (*Somateria mollissima*) qui succomba à une affection évoluant sur 6 mois : les bronches, les sacs aériens, les os du bassin et des membres supérieurs étaient tapissés d'une moisissure verte (sans doute *A. fumigatus*).

Dans son *Histoire naturelle des végétaux parasites*, Robin (1853) rapporte une nouvelle observation chez un faisan de Colchide (*Phasianus colchicus*) mort apparemment d'une tuberculose mais dont l'examen détaillé des tubercules a montré qu'ils contenaient des filaments mycéliens d'une moisissure couvrant les sacs aériens : l'auteur conclut au développement d'un *Aspergillus*.

Frésénius (1872) identifie dans le poumon d'une outarde barbue (*Otis tarda*) un *Aspergillus*, auquel il donne pour la première fois le nom d'*Aspergillus fumigatus*.

Une première description d'aspergillose des œufs en incubation est faite par Dareste en 1892. Cependant un travail plus complet sur le même sujet a été produit par Lucet dans un mémoire présenté à l'Académie nationale de Médecine en 1896.

Depuis ces découvertes, l'aspergillose a été décrite chez de nombreuses espèces d'oiseaux. De nombreux protocoles thérapeutiques ont aussi été développés.

2.2. Epidémiologie

2.2.1. Epidémiologie descriptive

L'aspergillose est une maladie non contagieuse qui touche aussi bien l'homme que les animaux vertébrés et invertébrés.

Chez l'homme, l'aspergillose représente la deuxième cause de la maladie nosocomiale d'origine fongique après les candidoses. Chez les animaux, l'aspergillose est une maladie qui demeure peu fréquente chez les mammifères alors que chez les oiseaux, cette affection est reconnue comme une cause majeure de mortalité (Guillot *et al.*, 2001).

2.2.2. Epidémiologie analytique

2.2.2.1. Sources

Chez l'Homme, la survenue d'une aspergillose est avant tout le résultat d'une contamination de l'air et de l'environnement en général. En milieu hospitalier, on constate fréquemment une augmentation du nombre de cas d'aspergillose invasive à la suite de travaux de construction ou de rénovation à proximité (Bocquet *et al.*, 1995 ; Vonberg et Gastmeier, 2006). D'autre part, l'installation de systèmes efficaces de conditionnement d'air permet de diminuer le nombre de cas d'aspergillose (Fabry *et al.*, 2000).

Aspergillus fumigatus est aussi abondant dans les substances végétales en décomposition (compost, terreau, plantes ornementales). Enfin, il existe un risque lié à certains aliments : les aromates (poivre surtout), le thé, les aliments lyophilisés, les fruits (notamment le kiwi) sont parfois couverts de

conidies aspergillaires et peuvent donc constituer une source de contamination pour le sujet immunodéprimé.

Pour les oiseaux, plusieurs sources ont été décrites. Lors d'aspergillose de couvoir, les principales sources de contamination sont les locaux et les œufs eux-mêmes. Certains œufs arrivent contaminés au couvoir et si leur décontamination n'est pas totale, le champignon peut se développer à la surface et dans la chambre à air. Lorsque la coquille se brise, de nombreuses conidies sont dispersées dans l'air et sur les autres œufs (Sambyal *et al.*, 1981 ; Hamet, 1990) (figure 27).

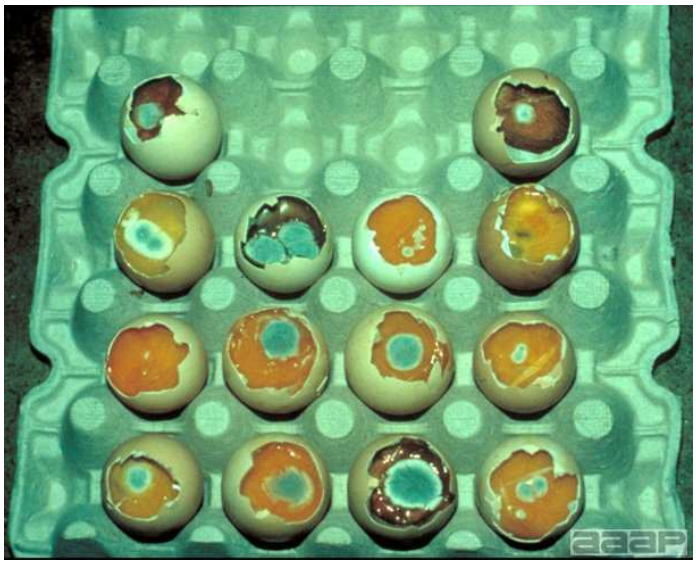


Figure 27. Œufs contaminés par *Aspergillus fumigatus* (American Association of Avian Pathologists)

Dans les bâtiments d'élevage, les sources de contamination sont la litière et l'alimentation. Jusqu'à $4x10^6$ conidies d'*A. fumigatus* par gramme de paille moisie ont pu être dénombrées dans des élevages de dindes présentant des signes cliniques d'aspergillose (Dyar *et al.*, 1984 ; Pinello *et al.*, 1977 ; Lovett *et al.*, 1971 ; Sauter *et al.*, 1981 ; Fulleringer *et al.*, 2006).

La poussière est aussi une source importante. Une étude a montré qu'une diminution de la quantité de poussières et une amélioration de la ventilation des bâtiments d'élevage permettent de réduire de 75 % l'incidence de l'aspergillose aviaire (Bourgeois, 1991).

2.2.2.2. Modes de contamination

La contamination est aérienne dans l'immense majorité des cas d'aspergillose humaine ou animale. Un homme inhale plusieurs centaines de conidies par jour ; la concentration moyenne dans l'air extérieur varie en effet de 2 à 10 conidies par m^3 (Taylor, 2009 ; Morris, 2000).

La contamination chez les oiseaux peut se faire selon différentes voies. Lors d'une aspergillose de couvoir, la contamination transcoquillière peut se produire si des conidies germent sur les œufs et des hyphes pénètrent par les pores de la coquille ou par d'éventuelles fissures (Kunkle, 2003).

Dans les bâtiments d'élevage, les oiseaux peuvent se contaminer directement en inhalant ou en ingérant les conidies provenant d'une litière ou d'aliments contaminés. Il semble toutefois que le niveau de contamination des intrants doive être élevé pour provoquer une aspergillose clinique (Richard *et al*, 1981).

2.2.2.3. Causes favorisantes

Chez l'homme comme chez les oiseaux, la probabilité de contamination est étroitement liée au taux de contamination de l'air ambiant. Ainsi tout ce qui provoque une augmentation de la concentration de conidies peut favoriser l'apparition d'une aspergillose.

Certains facteurs environnementaux tels que la chaleur et une forte humidité relative semblent jouer un rôle très important (Pasanen *et al*, 1991). Des conditions de chaleur humide vont favoriser le développement des moisissures alors qu'une chaleur sèche va faciliter la dispersion des conidies d'*Aspergillus* du fait de leur hydrophobicité et des courants d'air créés.

Chez l'homme, *A. fumigatus* a longtemps été considéré comme un agent faiblement pathogène pouvant être responsable de simples pneumonies allergiques telles que la « maladie du poumon du fermier » ou d'asthme. Ces maladies se déclaraient chez des individus fortement exposés pendant un court laps de temps ou exposés de manière chronique à des conidies ou des antigènes aspergillaires (Latgé, 1999 ; Taylor, 2009). Cependant, dans le cas d'individus très sensibles à l'infection une très faible exposition peut être suffisante (Bocquet *et al.*, 1995 ; Vonberg et Gastmeier, 2006).

En élevage, la contamination aérienne augmente également lorsque les paramètres zootechniques sont mal contrôlés. Ainsi, les mauvaises conditions d'hygiène, les problèmes de distribution et de stockage de la nourriture, les défauts de ventilation, une température ambiante excessive, des cages trop petites ou une densité trop élevée en oiseaux qui brassent air et litière contribuant ainsi à remettre en suspension les conidies sont autant de facteurs favorisants.

2.2.2.4. Sensibilité et réceptivité

La réceptivité est la capacité d'un hôte à laisser un agent pathogène se développer en lui alors que la sensibilité correspond à la propension à exprimer cliniquement une maladie après contact avec le microorganisme en cause.

Chez l'homme, l'inhalation de conidies est généralement sans effet car les éléments fongiques sont efficacement éliminés par les défenses immunitaires innées. Cependant, avec l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés (greffes d'organes et de moelle osseuse, néoplasies à l'origine d'une neutropénie, traitements immunosuppresseurs, syndrome d'immunodéficience acquise), *A. fumigatus* est devenue l'espèce fongique la plus impliquée dans les maladies fongiques associées à l'immunodépression (Latgé, 1999 ; Cornet *et al.*, 2002).

En effet, l'aspergillose invasive survient lorsque la réponse inflammatoire non spécifique est altérée. La neutropénie (ou des anomalies fonctionnelles intéressant les neutrophiles et les macrophages) est un facteur de risque majeur d'aspergillose invasive. Le risque est maximal dans les cas d'agranulocytose prolongée, et particulièrement élevé au cours des neutropénies profondes (< 500/mm^3) et prolongées. Les patients sous corticothérapie prolongée et à forte dose (> 1 mg/kg/j de méthyl-prednisolone ou de prednisone pendant une à trois semaines) sont également à risque d'infection aspergillaire. Ces facteurs de risque sont donc particulièrement retrouvés au cours des hémopathies malignes, surtout en cas de greffes de moelle osseuse, des chimiothérapies anti-cancéreuses, et des transplantations d'organes. Les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) peuvent aussi être atteints. Le pronostic de l'aspergillose invasive est très réservé, avec un taux de mortalité de 50 à 90 % (Baddley, 2010).

La colonisation des voies aériennes supérieures (nez, sinus) et/ou inférieures, ainsi qu'un antécédent d'infection par *Aspergillus* sont des éléments prédictifs d'une aspergillose invasive lors d'un épisode ultérieur de neutropénie ou d'immunosuppression.

Chez les oiseaux, le statut immunitaire joue aussi un rôle très important. Des tumeurs, des infections bactériennes ou de simples traumatismes des voies aériennes peuvent affaiblir les défenses immunitaires et conduire à une aspergillose. Cependant, indépendamment de ces modifications du statut immunitaire, il existe une réceptivité et une sensibilité particulière des oiseaux (Ghori et Edgar, 1973) (Cf Chapitre « Les oiseaux et les filières avicoles en France »). Parmi les oiseaux sauvages et de compagnie, certaines familles sont plus fréquemment atteintes : les Accipitridés (aigles, buses), les Alcidés (guillemots, pingouins), les Anatidés (canards, cygnes, oies), les Psittacidés (perroquets, perruches), les Sphéniscidés (manchots), les Sturnidés (étourneaux, mainates) (Jones et Orosz, 2000).

Parmi les oiseaux d'élevages, il a été montré que la sensibilité peut varier au sein même d'une espèce, par exemple entre différentes lignées génétiques de poulets (Ghori et Edgar, 1979 ; Mazzola-Rossi, 2007). Une telle différence de sensibilité entre plusieurs lignées de la même espèce a aussi été démontré chez la souris (Svirshchevskaya *et al.*, 2009).

2.3. Signes cliniques et lésions

2.3.1. Chez l'homme

Les aspergilloses se présentent sous différentes formes cliniques chez l'homme : de la simple manifestation allergique à l'aspergillose pulmonaire invasive qui demeure la principale et la plus grave des affections dues aux moisissures du genre *Aspergillus* en milieu hospitalier.

2.3.1.1. Signes cliniques

Les conidies d'*Aspergillus* sont considérées comme des allergènes pouvant être à l'origine de plusieurs types de **manifestations allergiques**. La première d'entre elles est l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) ou maladie de Hinson-Pepys. C'est la plus fréquente des atteintes aspergillaires allergiques. Classiquement diagnostiquée chez les patients ayant des antécédents d'asthme souvent atopique, elle est mise en évidence tout particulièrement chez les sujets atteints de mucoviscidose. Il s'agit d'une réponse immunitaire locale à une colonisation aspergillaire trachéo-bronchique chronique (Greenberger et Patterson, 1987 ; Wardlaw et Geddes, 1992).
Les autres manifestations allergiques provoquées par *Aspergillus fumigatus* sont l'asthme bronchique et l'alvéolite allergique extrinsèque ou maladie du poumon de fermier.

L'aspergillome (***ou aspergillose intra-cavitaire***) est observé chez les sujets non immunodéprimés mais souffrant d'une affection pulmonaire sous-jacente. L'aspergillome est une masse arrondie pseudo-tumorale souvent unique constituée de filaments mycéliens réalisant une véritable « truffe » fongique. Elle se développe le plus souvent au sein d'une cavité pulmonaire ou pleurale préformée (cicatrice de caverne tuberculeuse ou d'abcès bactérien par exemple) ou d'une lésion pulmonaire nécrosée (cancer, connectivites, sarcoïdose, infarctus pulmonaire, histoplasmose, etc.). Le développement de cette affection est lent et la dissémination à distance est exceptionnelle.

Cependant, plusieurs complications peuvent survenir, notamment des hémoptysies récidivantes et parfois abondantes (Israel *et al.*, 1982 ; Wollschlager et Khan, 1984 ; Latgé, 1999).

Il existe une **aspergillose semi-invasive**, forme de transition entre l'aspergillome et l'aspergillose invasive des immunodéprimés, qui s'observe chez les sujets à immunité diminuée (terrain éthylique, diabète, traitement par corticoïdes ou immunosuppresseurs).

L'aspergillose invasive est une infection aiguë, avec envahissement mycélien tissulaire et vasculaire. Une telle infection n'est possible que chez un patient dont les défenses immunitaires sont fortement altérées. Cette forme clinique demeure une cause majeure de décès dans les centres de traitement des leucémies et dans les unités de transplantations d'organes (Patel et Paya, 1997). L'aspergillose invasive touche 5 à 25 % des patients atteints de leucémie aiguë, 5 à 10 % des patients ayant subi une transplantation de moelle osseuse et 19 à 26 % des personnes ayant subi une transplantation cœur-poumons. L'aspergillose invasive est difficile à mettre en évidence surtout en début d'évolution. En effet, les symptômes sont peu spécifiques : hyperthermie, toux, douleur thoracique, perte de poids, dyspnée (Verweij et Meis, 2000).

2.3.1.2. Lésions

Lors d'aspergillose invasive, l'étape de colonisation est suivie d'une phase d'invasion. Cette agression se traduit d'abord par une nécrose de l'épithélium respiratoire et par une croissance de filaments mycéliens qui envahissent de proche en proche le parenchyme voisin. Inéluctablement, cette progression finit par gagner les vaisseaux adjacents et la lumière vasculaire. Ce tropisme vasculaire des filaments, obstruant les artères ou les artérioles, entraîne une thrombose responsable d'un infarctus localisé. La lésion se présente alors sous forme de nécrose ischémique entourée d'un liseré hémorragique (Caillot *et al.*, 2001). Dans un second temps, cette nécrose ischémique peut se décoller en périphérie avec formation d'un séquestre. Une telle lésion permet une dissémination dans les voies aériennes contiguës, mais également une dissémination dans tout l'organisme par voie hématogène avec apparition secondaire d'embolies septiques au niveau de divers organes (os, peau, tissu nerveux, endocarde, foie…).

2.3.2. Chez les oiseaux

Les aspergilloses sont des affections fréquentes et graves en élevage avicole. Elles demeurent une cause majeure de morbidité et de mortalité chez de nombreuses espèces d'oiseaux (Arca-Ruibal, 2006 ; Kunkle, 2003).

Les pertes économiques qui en découlent sont importantes notamment dans les élevages de dindes où l'aspergillose est rendue responsable de 5 à 10 % de la mortalité chez les oiseaux les plus jeunes (Richard *et al.*, 1981).

2.3.2.1. Signes cliniques

Plusieurs types d'aspergillose aviaires peuvent être observés en fonction de l'âge des animaux.

Lors d'**aspergillose des œufs,** en couvoir, on observe un développement fongique au niveau de la chambre à air et des membranes coquillères, plus rarement sur le vitellus et l'embryon (Kunkle, 2003). Des plages brunes sont visibles lors du mirage de l'œuf. Il peut en découler une mortalité en coquille ou une aspergillose du jeune poussin appelée **pneumonie des couveuses** dès les premières heures de vie. Cette forme clinique se traduit généralement par une septicémie conduisant à la mort.

La prévalence de l'aspergillose des œufs diminue dans les pays industrialisés du fait de la mise en place de méthodes efficaces de décontamination des locaux et des œufs et de l'élimination systématique des œufs endommagés ou morts (Janssen Animal Health, 2006).

Une forme d'**aspergillose aiguë** survient surtout chez les jeunes animaux mais peut aussi être observée chez les adultes dans certaines conditions. Cette forme se traduit par une détresse respiratoire : dyspnée et efforts respiratoires accrus (bec entrouvert, bâillements, cou tendu, hochements de queue). Des signes généraux sont toujours associés : un abattement, une perte de poids, une anorexie, un état fébrile. Les oiseaux sont « en boule », ébouriffés, tête basse, et yeux clos (Pier et Richard, 1992 ; Kunkle et Rimler, 1996). Ils peuvent ne présenter qu'un seul de ces signes voire mourir brutalement sans signe précurseur.

La mortalité est très élevée (70 à 90 % des effectifs) et rapide (24-48 heures) et le développement des survivants est hétérogène aboutissant généralement à des non-valeurs économiques (Kunkle et Rimler, 1996). Cette forme d'aspergillose, souvent d'aspect épizootique, a de graves conséquences économiques.

Les oiseaux adultes présentent plutôt une **forme chronique d'aspergillose**. La maladie a alors une allure sporadique. Elle se développe suite à l'exposition à une source abondante de conidies aspergillaires chez des oiseaux dont le système immunitaire est déficient et qui ne peut donc pas

contenir l'infection (Richard et Thurston, 1983). Les principales manifestations cliniques sont des troubles respiratoires associés à un amaigrissement qui conduit à une saisie des carcasses à l'abattoir (Kunkle, 2003). En fin d'évolution, peuvent aussi apparaître des signes nerveux centraux : ataxie, torticolis, chute, opisthotonos, convulsions, etc. (Veen, 1973).

En plus de ces formes principales de la maladie, il existe des **formes localisées** qui touchent les cavités nasales, la trachée ou la syrinx (Tsai *et al.*, 1992). Des manifestations digestives (diarrhée blanchâtre, vomissement, stase du jabot, polyurie-polydipsie, ascite), des troubles nerveux (convulsions, état sub-comateux, paralysies) oculaires ou cutanés sont aussi possibles.

2.3.2.2. Lésions

Dans le cas d'une aspergillose aiguë naturelle, les lésions sont présentes au niveau du tractus respiratoire et plus particulièrement dans le tissu pulmonaire (Julian et Goryo, 1990 ; Richard *et al.*, 1984 ; Cacciuttolo *et al.*, 2009). Parfois l'atteinte d'autres organes est observée comme par exemple le cerveau (Richard et Thurston, 1984).

Lors d'aspergillose chronique, l'appareil respiratoire est presque toujours atteint, soit dans sa totalité soit partiellement. On observe très souvent une pneumonie et une aérosacculite surtout des sacs aériens thoraciques postérieurs et abdominaux.

L'aspect des lésions est quasiment le même quel que soit l'organe atteint. Il s'agit de granulomes ou de plaques fongiques de couleur blanc-crème, caséeux et friables, à centre parfois nécrotique et non encapsulé avec éventuellement un « gazon mycélien » verdâtre constitué d'un enchevêtrement d'hyphes ayant sporulé (figure 28 et 29) (Cacciuttolo *et al.*, 2009).

Lorsque les muqueuses sont atteintes, on observe un épaississement inflammatoire associé à un exsudat séro-fibrineux verdâtre (Bauck *et al.*, 1997 ; Cacciuttolo *et al.*, 2009).

Les lésions les plus fréquentes, définies lors d'une étude sur 45 oiseaux présentant une aspergillose spontanée, sont par ordre décroissant : une pneumonie granulomateuse (66 %), une aérosacculite (53 %), une bronchopneumonie (37 %), des lésions trachéobronchiques (20 %), une nécrose aiguë et une thrombose (17 %) (Bauck *et al.*, 1997).

Des formes plus rares peuvent se traduire par une conjonctivite, une kératite, une uvéite, une ostéomyélite, une dermatite ou une omphalite.

L'examen microscopique des granulomes montre en général un centre nécrotique entouré par des macrophages, des granulocytes hétérophiles et des cellules géantes multinucléées. Lorsque les lames sont colorées avec des colorations spéciales, on observe la présence d'hyphes et parfois de conidies dans la partie centrale des granulomes hétérophiliques. Ces éléments fongiques sont plus ou moins

dégradés en fonction du stade de développement de l'infection (Kunkle, 2003 ; Cacciuttolo *et al.*, 2009, Féménia et *al.*, 2007).

Figure 28. Nodules observés à la surface des sacs aériens chez un jeune coq atteint d'aspergillose (adapté de Cacciuttolo *et al.*, 2009).

Figure 29. Multiples nodules caséeux dans le tissu pulmonaire d'un canard atteint d'aspergillose (UMR BIPAR).

2.4. Diagnostic

Le diagnostic d'aspergillose est établi à partir d'un faisceau de preuves s'appuyant sur plusieurs méthodes.

2.4.1. Diagnostic clinique et épidémiologique

Chez l'homme, l'aspergillose se présente le plus souvent comme une pneumopathie aiguë infectieuse, résistante à une polyantibiothérapie de large spectre. Il peut parfois s'agir d'une hyperthermie isolée supérieure à 38°C, d'une toux sèche, d'une dyspnée au repos ou de douleurs thoraciques localisées ou diffuses.

Chez les sujets immunodéprimés, et en particulier chez les sujets transplantés hépatiques, les signes cliniques peuvent être totalement absents. Ainsi, chez un malade présentant des facteurs de risque, la simple suspicion que représente la fièvre résistante au traitement antibiotique doit faire évoquer le diagnostic d'infection fongique, notamment d'aspergillose (Bal et Gould, 2007 ; Sipsas *et al.*, 2005).

Chez les oiseaux, les formes cliniques d'aspergillose sont très variées et le recours aux examens complémentaires est indispensable. Pour établir une suspicion, il est nécessaire de s'intéresser à l'environnement et de rechercher d'éventuelles causes favorisantes. Ainsi, une mauvaise hygiène de la cage ou des locaux, une ventilation inefficace, une alimentation inadaptée ou carencée sont autant de facteurs propices au développement d'une aspergillose aviaire. De même, certaines espèces aviaires sont plus sensibles à cette mycose. L'historique de l'animal fournit également des indications importantes. Dans le cas d'oiseaux domestiques, il est bon de connaître la provenance de l'animal et, dans le cas d'oiseaux sauvages, les conditions de capture et de détention. Il faut systématiquement prendre connaissance de l'état de santé de l'oiseau et des traitements en cours. Ainsi un oiseau dont l'état général se détériore malgré la mise en place d'une antibiothérapie peut être suspecté d'aspergillose.

2.4.2. Signes radiologiques et résultats de l'examen endoscopique

Chez l'homme, au début de l'infection ou lors d'atteintes aspergillaires aiguës purement localisées sur la paroi de l'arbre trachéo-bronchique, le cliché thoracique peut être normal dans 25 % des cas (Kuhlman *et al.*, 1985). Sinon, les clichés thoraciques peuvent mettre en évidence des opacités

diffuses, d'emblée de mauvais pronostic, prenant l'aspect de broncho-pneumonies péri-hilaires, d'infiltrats alvéolaires multiples, de macro ou micro-nodules pulmonaires avec infarctus multiples, avec présence d'éventuels épanchements pleuraux (Ruhnke *et al.*, 2003 ; Segal et Walsh, 2006 ; Sherif et Segal, 2010).

Chez les oiseaux de volières ou de parc zoologique, l'examen radiologique peut être utile. Il est recommandé d'effectuer systématiquement deux clichés de la cavité cœlomique (incidences ventro-dorsale et latéro-latérale). Les signes radiographiques lors d'aspergillose sont : une perte de définition du contour des sacs aériens ainsi qu'une asymétrie de ceux-ci, des opacités focales au niveau de l'appareil respiratoire (sacs aériens, poumons, syrinx, trachée…), une augmentation de l'épaisseur des sacs aériens, une ascite, une hépatomégalie, une néphromégalie.

Chez les oiseaux, l'endoscopie est très utile puisque cet examen fournit un accès visuel direct aux sacs aériens et à une partie des poumons. Lors de la recherche de lésions aspergillaires, il faut examiner grâce à un endoscope rigide les sacs aériens thoraciques et abdominaux gauches et droits ce qui implique de pratiquer une voie d'abord sur chaque flanc. De même, on inspecte la trachée, la syrinx et le départ des bronches primaires à l'aide d'un endoscope rigide que l'on introduit par la glotte. L'endoscopie présente l'avantage de pouvoir poser un diagnostic de certitude si des lésions typiques d'aspergillose sont visualisées. Des biopsies de ces lésions ainsi que des organes accessibles peuvent être réalisées et il est possible de réaliser cet examen en cours de traitement pour juger de son efficacité et de l'évolution de la maladie (Branson *et al.*, 1994).

2.4.3. Mise en évidence des éléments fongiques par examen direct et culture

En raison du caractère ubiquitaire des *Aspergillus*, la mise en évidence du champignon au laboratoire à partir d'un prélèvement réalisé au niveau d'un site non stérile ne suffit pas pour poser un diagnostic d'aspergillose. Il peut s'agir dans ce cas d'une colonisation de l'arbre respiratoire ou d'une contamination aérienne, soit au moment du prélèvement, soit lors de sa manipulation au laboratoire. La présence du champignon doit donc être interprétée en fonction de la nature du prélèvement et des éléments fongiques observés, mais également en fonction du contexte clinique, radiologique (ou endoscopique) et biologique. Les techniques mycologiques comprennent toujours au moins un examen microscopique direct des prélèvements et une mise en culture (Horvath et Dummer, 1996).

L'examen direct est réalisé à l'état frais ou après coloration.

Le milieu de culture le plus utilisé est le milieu de Sabouraud auquel sont ajoutés certains antibiotiques (chloramphénicol (50 mg/l) ou gentamicine (1 mg/l)) dans le but de limiter le développement des bactéries présentes au sein de prélèvements issus de sites non stériles. Dans certains cas, la culture peut rester négative malgré un examen direct positif notamment chez les patients ou des animaux déjà traités.

2.4.4. Examen histologique

La coloration H.E.S. (Hémalun Eosine Safran) peut être utilisées, mais d'autres colorations plus spécifiques ont une bien meilleure sensibilité dont la coloration de Gomori-Grocott, la coloration PAS (acide périodique Schiff) ou des immuno-marquages. La coloration de Gomori-Grocott présente une grande sensibilité, et la coloration PAS permet de visualiser le contenu cellulaire et l'architecture tissulaire d'un fragment biopsique ainsi que la réaction inflammatoire développée par l'hôte. Ces deux colorations sont donc complémentaires. La mise en évidence d'éléments fongiques dans les tissus permet d'affirmer la réalité d'une mycose et ainsi, de conforter la validité des résultats des cultures mycologiques (par exemple en éliminant l'hypothèse d'une contamination des cultures au laboratoire) ; cependant, elle ne permet généralement pas de distinguer les *Aspergillus* d'autres champignons filamenteux septés, ni de séparer les espèces aspergillaires.

2.4.5. Sérologie

Pour la détection des anticorps anti-*Aspergillus*, plusieurs techniques sont actuellement disponibles : hémagglutination indirecte, immunoprécipitation en milieu gélosé, immunoprécipitation sur bande d'acétate de cellulose, ELISA, immunofluorescence indirecte, fixation du complément. Chez l'homme, leur spécificité est correcte. En revanche, leur sensibilité est décevante probablement en raison d'une faible production d'anticorps liée à l'immunodépression des patients (De Repentigny, 1989). En plus d'être peu sensible dans cette population, la sérologie ne donne habituellement un résultat positif qu'une fois le diagnostic d'aspergillose invasive posé. Les techniques de référence sont l'immunoélectrophorèse et l'immunodiffusion double de Ouchterlony mais leur réalisation est longue. L'électrosynérèse présente une meilleure sensibilité et est plus rapide (un jour) mais peut parfois donner lieu à des difficultés de lecture quand les arcs de précipitation sont de faible intensité. La plupart de ces tests ont été utilisés pour détecter précocement l'aspergillose chez les oiseaux (Peden et Rhoades, 1992). Dans le cas d'une aspergillose aiguë, la production d'anticorps se fait

entre 10 et 14 jours après l'exposition aux antigènes (Cray *et al.*, 2009, Brown et Redig, 1994). Cependant, à l'instar des patients humains, les animaux immunodéprimés présentent de faibles titres en anticorps et peuvent être des faux-négatifs (Redig, 1994).

Dans les services hospitaliers, la recherche d'anticorps est maintenant systématiquement remplacée par la recherche d'antigènes circulants. La majorité des antigènes aspergillaires sont des polysaccharides et des antigènes protéiques ou glycoprotéiques. Le galactomannane, principal constituant polysaccharidique de la paroi fongique des *Aspergillus* est aujourd'hui l'antigène le plus souvent recherché en routine dans le diagnostic de l'aspergillose invasive humaine (Aquino *et al.*, 2007). Chez les oiseaux, la détection d'antigènes circulants dans le sérum est également une alternative intéressante (Beernaert *et al.*, 2010). Dans le cas d'une aspergillose chronique, le taux d'antigènes circulants peut être faible (Jones et Orosz, 2000). Cependant, un résultat négatif n'exclut pas totalement une aspergillose et un résultat positif doit être confirmé par d'autres examens (Peden et Rhoades, 1992 ; Brown et Redig, 1994 ; Redig, 1994 ; Le Loch *et al.*, 2006 ; Arca-Ruibal *et al.*, 2006 ; Cray *et al.*, 2009). Le diagnostic définitif nécessite donc la démonstration de la présence du champignon dans les lésions (Beernaert *et al.*, 2010).

2.4.6. Diagnostic post-mortem

Dans les élevages aviaires, il est souvent utile de sacrifier certains animaux pour détecter la présence de lésions évocatrices et réaliser des prélèvements profonds dans de bonnes conditions. Lors d'aspergillose, il existe généralement des lésions caractéristiques dans les sacs aériens et les poumons qui doivent toutefois être distinguées des lésions causées par une tuberculose, une histomonose ou une mycoplasmose. Cette distinction peut alors s'effectuer par examen microscopique direct d'un échantillon permettant la visualisation de filaments mycéliens ou de têtes aspergillaires ou après culture ou examen histologique d'une lésion.

2.5. Typage d'*Aspergillus fumigatus*

Pour déterminer la diversité au sein de l'espèce *A. fumigatus*, plusieurs méthodes de typage moléculaire ont été définies (De Valk *et al.*, 2008 ; Vanhee *et al.*, 2010) et ce grâce la publication du génome complet du champignon (Nierman *et al.*, 2005).

2.5.1. Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

Dans une réaction PCR classique, les deux amorces utilisées s'hybrident au niveau des régions cibles du génome sous des conditions hautement stringentes. La RAPD est basée sur l'utilisation d'une seule amorce, de 8 à 20 paires de bases (pb), associée avec une température d'hybridation basse durant la PCR. Dans ces conditions réactionnelles, l'amorce peut s'hybrider à différents endroits du génome ; cette hybridation est dite aspécifique. En conséquence, un nombre assez aléatoire de fragments de différentes longueurs seront produits. Ces derniers sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le nombre et la taille des amplicons obtenus déterminent le génotype particulier de l'isolat testé.

Aufauvre-Brown *et al*. (1992) ont ainsi testé un total de 44 différentes amorces sur 3 isolats différents d'*A. fumigatus*. Une amorce développée par ces auteurs (R108) a été utilisée ensuite par lors de nombreuses autres études de typage d'*A. fumigatus* (Diaz-Guerra *et al.*, 2000 ; Mellado *et al.*, 2000 ; Rath *et al.*, 2002 ; Baddley *et al.*, 2003 ; Raclavsky *et al.*, 2006).

2.5.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) sans hybridation

Le traitement de l'ADN génomique d'un isolat d'*Aspergillus* par une enzyme de restriction reconnaissant une séquence de 6 pb génère plus de 10000 fragments d'ADN dont la taille moyenne est de 4000 pb. La grande majorité d'entre eux ne peuvent pas être distingués les uns des autres. En restreignant l'analyse aux fragments les plus grands (10 à 50 kb), des profils de bandes particuliers et donc discriminants peuvent être obtenus pour certains isolats. Ces différences de profils sont principalement dues à l'existence de délétions, mutations ou insertions dans la séquence de reconnaissance de l'enzyme de restriction ce qui va entrainer une modification de la taille des fragments générés.

Denning *et al.* (1990) ont testé 30 enzymes de restriction différentes sur 31 isolats d'*A. fumigatus*. Les enzymes *Xho*I et *Sal*I ont présenté le pouvoir discriminant le plus élevé.

2.5.3. RFLP avec hybridation

La principale différence de la technique RFLP avec hybridation résulte dans l'étude ciblée d'une partie des fragments générés par digestion enzymatique. Les fragments séparés sur gel d'agarose après traitement enzymatique sont transférés sur une membrane de nylon par Southern Blot. Une partie des amplicons est ensuite révélée par hybridation avec une sonde marquée.

Girardin *et al.* (1993) ont étudié les éléments multicopies du génome d'*A. fumigatus* et les ont testés avec l'enzyme de restriction *EcoR*I. La sonde appelée Afut1, possède les caractéristiques spécifiques d'un élément de type retro-transposon (Neuveglise *et al.*, 1996) et a été utilisée dans plusieurs études (Lasker, 2002 ; Lin *et al.*, 1995 ; Verweij *et al.*, 1996). Les autres sondes utilisées sur cette espèce, également basée sur des éléments de type retro-transposon, sont Afut2 (Paris et Latgé, 2001) et Af4A (Semighini *et al.*, 2001).

2.5.4. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Cette technique est basée l'étude d'un profil multi-bandes obtenu après digestion de l'ADN, par une ou plusieurs enzymes de restriction, puis par amplification sélective. Les fragments d'ADN double brin digéré sont ligués à des adaptateurs puis amplifiés avec une PCR utilisant des amorces spécifiques des adaptateurs. On peut diminuer le nombre de bande généré en allongeant l'amorce avec un ou plusieurs nucléotides sélectifs.

Warris *et al.* (2003) ont étudié une collection de 96 isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus* en utilisant les enzymes *EcoR*I et *Mse*I avec 3 nucléotides sélectifs. Les différents isolats ont pu être distingués les uns des autres.

2.5.5. Microsatellites ou Short Tandem Repeats (STR's)

Les microsatellites ou *Short Tandem Repeats* sont des petites séquences génomiques répétées, présentes en abondance sur le génome de la plupart des eucaryotes mais aussi des procaryotes (Adair *et al.*, 2000 ; Lunel *et al.*, 1998 ; Puers *et al.*, 1993 ; Skowasch *et al.*, 1992). On peut distinguer un isolat d'un autre en comparant le nombre de répétitions de ces microsatellites. Le principe consiste à amplifier, par PCR, les zones correspondantes de l'ADN puis de déterminer la taille du fragment sur une plateforme d'électrophorèse à haute résolution ou en séquençant directement la zone cible. On détermine alors le nombre de répétitions de la petite séquence. Pour obtenir un

typage exploitable, il est nécessaire de combiner l'étude de plusieurs marqueurs microsatellites afin d'obtenir un profil génétique de l'isolat qui soit le plus précis possible. Ces génotypes sont ensuite facilement comparables entre eux puisque traduits sous la forme d'une suite de chiffre représentant le nombre de répétions obtenus sur chacun des marqueurs.

Bart-Delabesse *et al.* (1998) ont utilisé 4 marqueurs microsatellites pour séparer leurs isolats. Avec ce panel de marqueurs, on peut en théorie identifier jusqu'à 30000 génotypes différents. Plus récemment, un panel de 9 marqueurs microsatellites a permis d'améliorer le pouvoir discriminant de la méthode (De Valk *et al.*, 2005).

Cette technique est parfois dénommée *Microsatellites Length Polymorphism* (MLP, MSP) (Bart-Delabesse *et al.*, 1998, Bertout *et al.*, 2001) ou encore *Polymorphic Microsatellite Marker* (Lasker, 2002). Cette méthode a aussi été testée dans le cadre d'élevage aviaire (Lair-Fulleringer *et al.*, 2003).

2.5.6. Multilocus Sequence Typing (MLST)

La technique MLST est basée sur la comparaison de séquences nucléotidiques de 400 à 500 pb d'une série de gènes de ménage, habituellement entre 6 et 10 (Taylor et Fisher, 2003). A chaque séquence unique est assigné un numéro d'allèle arbitraire. Chaque isolat est ensuite défini par un Type Séquence (ST) qui comprend tous les allèles identifiés pour chacun de ses gènes. La comparaison entre les isolats est établie à partir des profils alléliques ainsi obtenus. Les données sont facilement échangeables. La MLST est utilisée en routine comme outil capable de typer des isolats provenant de différentes zones géographiques.

Appliquée aux *Aspergillus* section *fumigati*, la méthode a contribué à la description d'une nouvelle espèce : *Aspergillus lentulus* (Balajee *et al.*, 2005).

Plus récemment, Bain *et al.* (2007) ont décrit un panel de 7 gènes utilisés pour typer 100 isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus*. Trente génotypes distincts ont ainsi été mis en évidence.

2.5.7. Cell Surface Protein Typing (CSP Typing)

Une nouvelle méthode de typage moléculaire basée sur l'étude de répétitions en tandem dans un gène codant une protéine de surface cellulaire a été développée (Balajee *et al.*, 2007). Les répétitions n'étant pas exactement les mêmes d'un isolat à l'autre, un numéro d'allèles est attribué à chaque

séquence répétée unique. Le profil défini prend donc en compte à la fois le nombre de répétitions présentes ainsi que la séquence précise de ces répétitions grâce au numéro d'allèle.

Une étude a été menée sur une collection de 55 isolats épidémiologiquement liés d'*A. fumigatus*, et a montré à la possibilité de regrouper les isolats par leur génotype en fonction des périodes d'isolement (Balajee *et al.*, 2007).

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 3 : Les *Chlamydiaceae* et les chlamydioses

Les bactéries de l'ordre des *Chlamydiaceae*

1.1. Historique

L'histoire des *Chlamydiae* est décrite à travers la découverte et l'étude de plusieurs maladies bien différentes. Ces bactéries étant responsables de plusieurs maladies aux symptômes et aux hôtes différents, il faudra attendre les années 60 pour que ces maladies soient reconnues comme étant dues à une seule et même bactérie.

Les trois principales maladies induites par les *Chlamydiae* qui ont marquées l'Histoire sont le trachome, la lymphogranulomatose vénérienne (LGV) et la psittacose. Le trachome est une maladie humaine généralement définie comme une conjonctivite contagieuse allant parfois jusqu'à la cécité. Les documents archéologiques montrent que le trachome sévissait déjà chez les sumériens de la basse Mésopotamie et cela 50 siècles avant Jésus Christ. La LGV est une inflammation subaiguë atteignant l'appareil génital puis les ganglions lymphatiques inguinaux et fût décrite pour la première fois à la fin du 18ème siècle. La psittacose se caractérise, la plupart du temps, chez l'Homme comme chez l'animal, par une pneumonie. C'est suite à l'observation de pneumonies humaines en lien avec une affection atteignant des Psittacidés que la maladie a été nommée «psittacose », du mot latin *psittacus* qui veut dire perroquet.

Une fois les maladies décrites, ce sont alors les agents responsables qui ont été étudiés et nommés. En 1907, Halberstädter et Von Prowasek mettent en évidence des inclusions basophiles intracytoplasmiques chez des patients atteints de trachome. Pensant qu'ils étaient en présence de protozoaires, ils les appelèrent «Chlamydozoon » du grec *Khlamus* qui signifie «manteau», du fait de la matrice bleue dont était apparemment entourée chaque particule.

En 1934, Thygeson, un ophtalmologiste, attire l'attention sur les ressemblances entre le développement et la morphologie des inclusions observées dans les cas de trachome et les inclusions observées dans le cas de conjonctivite chez les Psittacidés. La mise au point d'une technique de fixation du complément renforce alors l'idée que ces agents et ceux de la lymphogranulomatose vénérienne sont reliés au sein d'un même groupe.

En 1935, l'agent de la psittacose est cultivé sur membrane chorio-allantoïque d'œufs embryonnés de poule (Thygeson *et al.*, 1962).

En 1942, un rapprochement est établi entre les agents du trachome, de la psittacose et de la LGV par Rake *et al*. (Rake et Jones, 1942). En 1950, un agent similaire est également identifié, par l'équipe de Stamp, comme cause d'avortement chez les petits ruminants (Stamp, 1950).

En 1955, un comité d'experts du trachome de l'OMS propose la définition de « kératoconjonctivite spécifique transmissible, à évolution généralement chronique, causée par un agent actuellement classé comme *Chlamydozoon trachomatis*, caractérisée par la formation de follicules, une hyperplasie papillaire et un pannus cornéen et entrainant des lésions cicatricielles typiques ».

La première proposition de réunir les agents responsables de ces maladies au sein d'un même groupe a été faite par Meyer en 1960. Il suggère alors le nom de *Bedsiona* pour tous les membres du groupe « Psittacosis-Lymphogranuloma venereum-Trachoma » (PLT) (Meyer, 1960). Le nom de *Bedsiona* provient de Sir Samuel Bedson, qui fut le premier à décrire le cycle de développement des agents de ce groupe (Bedson, 1930).

En parallèle, les techniques pour cultiver ces agents évoluent, notamment grâce à Gordan et Quan qui décrivent, en 1965, une technique d'isolement de l'agent du trachome sur une lignée cellulaire continue adhérente en monocouche, les cellules McCoy (Gordon et Quan, 1965).

Ces « organismes du groupe PLT », jusqu'ici considérés comme des virus à cause de leur petite taille et leur multiplication intracellulaire stricte, sont finalement établis comme étant des bactéries en 1966, par Moulder. Il prouve alors, qu'elles possèdent plusieurs caractéristiques communes aux autres bactéries décrites alors. Elles contiennent de l'ADN et de l'ARN, se divisent par fission binaire, sont sensibles aux antibiotiques et leur enveloppe cellulaire ressemble à celle des autres bactéries à Gram négatif malgré l'absence de peptidoglycane (Moulder, 1966).

Page propose alors que tous les organismes du groupe PLT soient rassemblés en un seul genre : le genre *Chlamydia* dérivé du nom *Chlamydozoon* donné en 1955 (Page, 1966). Cette proposition est acceptée par le comité de taxinomie de la Société Américaine de Microbiologie. A ce moment, sont décrites deux principales espèces au sein de ce genre, l'espèce *Chlamydia trachomatis* regroupant toutes les souches d'origines humaines et l'espèce *Chlamydia psittaci* pour les souches d'origine animale.

La classification des *Chlamydiae* va beaucoup évoluer dans les années 1990 avec l'introduction de nouvelles méthodes de typage. Des études portant sur la réassociation ADN/ADN et le séquençage de plusieurs gènes ont conduit à la proposition de deux nouvelles espèces en 1992 (Fukushi et Hirai, 1992), *Chlamydia pneumoniae* et *Chlamydia pecorum*.

Enfin, la dernière étape, qui a conduit à la taxonomie actuelle, a été possible grâce à l'analyse des séquences des gènes ribosomaux 16S et 23S par Everett *et al*. en 1999.

1.2. Systématique

1.2.1. Classification

La classification des *Chlamydiae* a été sujette à beaucoup de changements au cours du temps (figure 30). L'actuelle classification les regroupe au sein de l'ordre de Chlamydiales qui compte 4 familles : les *Chlamydiaceae*, les *Parachlamydiaceae*, les *Waddliaceae* et les *Simkaniaceae*. Les Chlamydiales sont des bactéries Gram négatif intracellulaire obligatoire, possédant un cycle de développement fait d'une forme extracellulaire infectieuse et d'une forme intracellulaire capable de se répliquer par fission binaire (Moulder, 1991).

Les *Chlamydiaceae* sont séparées en deux genres, *Chlamydia* et *Chlamydophila* (le nom de *Chlamydophila* a été donné par Hans Truper and Johannes Storz, signifiant « comme *Chlamydia* »), comprenant 9 espèces (Everett *et al*., 1999). Le genre *Chlamydia* comporte 3 espèces : *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia suis* et *Chlamydia muridarum*. Le genre *Chlamydophila* regroupe 6 espèces: *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila pneumoniae, Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila caviae*, *Chlamydophila felis* et *Chlamydophila abortus*.

Les *Parachlamydiaceae*, sont des endosymbiontes spécifiques des amibes (Greub et Raoult, 2002).

Quant aux *Waddliaceae*, ils ne comprennent qu'un seul genre et sont des agents pathogènes décrits chez le bovin et l'Homme (Dilbeck *et al.*, 1990 ; Goy *et al.*, 2008 ; Bertelli *et al.*, 2010).

La famille des *Simkaniaceae* inclue deux genres, le genre *Simkania* et le genre *Fritschea*. Le genre *Simkania* ne contient à l'heure actuelle qu'une seule espèce, la souche « Z » de *Simkania negevensis*. Quant au genre *Fritschea*, il comprend deux espèces, identifiées chez des insectes, *Fritschea bemisiae* et *Fritschea eriococci*.

Plus récemment, les familles *Rhabdochlamydiaceae* (Corsaro *et al.*, 2007) et *Candidatus Piscichlamydia salmonis* (Draghi *et al*., 2004) ont été rajoutées à l'ordre des *Chlamydiales*.

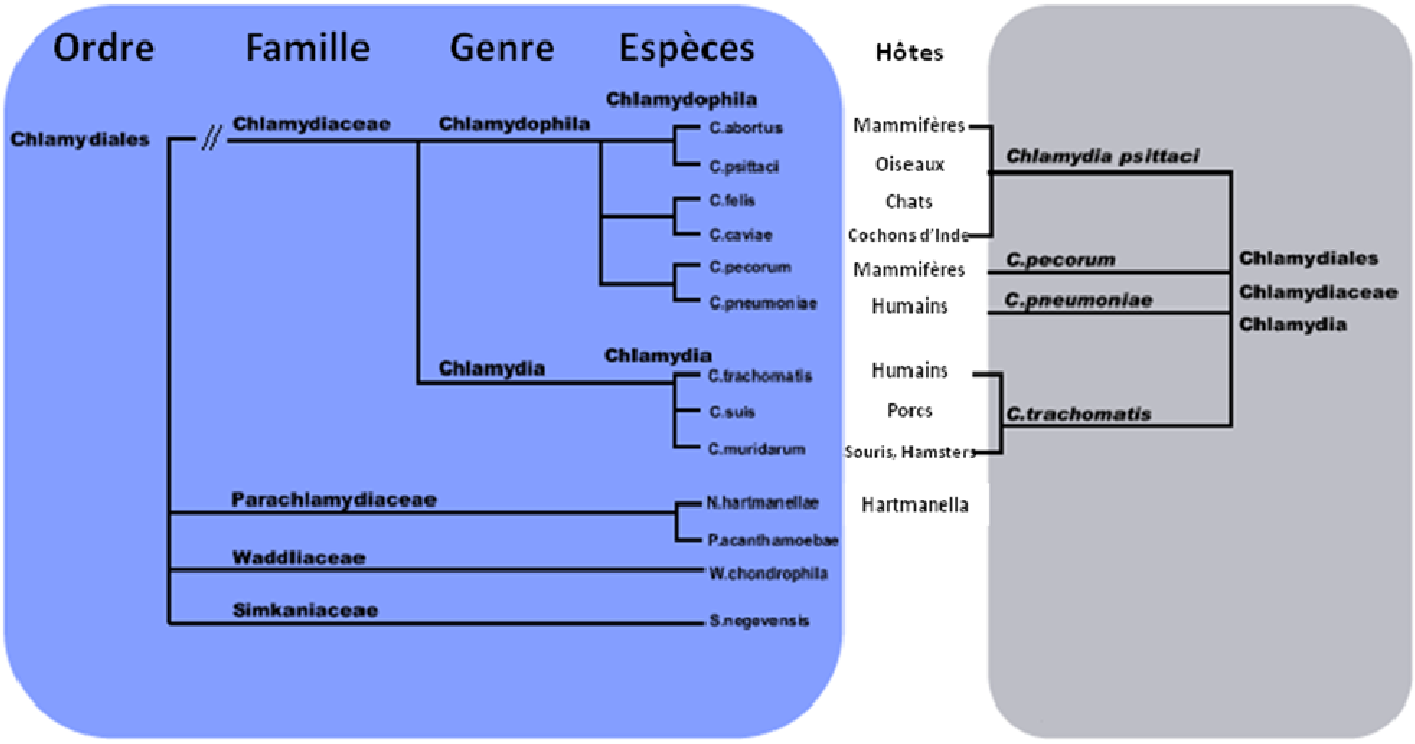


Figure 30. Comparaison de la nouvelle (à gauche) et de l'ancienne (à droite) classification des *Chlamydiales* (modifié à partir de Bush et Everett, 2001)

1.2.2. Diversité des *Chlamydiaceae* et de leurs hôtes

1.2.2.1. *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis est une bactérie pathogène pour l'Homme. Elle est l'agent causal du trachome ainsi que de la LGV et de la chlamydiose génitale. Elle est considérée comme la bactérie la plus commune des infections sexuellement transmises (IST).

Dix neuf sérovars sont décrits chez *C. trachomatis* : A, B, Ba, C (principalement isolées de trachomes), D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J, Ja, K (infections urogénitales) et L1, L2, La et L3 (responsables de la LGV).

Une transmission verticale lors de l'accouchement a aussi été démontrée, pouvant donner des conjonctivites et/ou des infections des poumons et des organes génitaux des nouveau-nés (Schachter et Caldwell, 1980). Les infections génitales à *C. trachomatis* non traitées peuvent générer des infertilités chez les femmes ou évoluer vers une épididymite pour les hommes.

1.2.2.2. *Chlamydia muridarum*

L'espèce *C. muridarum* est représentée par deux souches (MoPn et SFPD) isolées respectivement de la souris (*Mus musculus*) et du hamster (*Cricetus cricetus*). Chez ces animaux, elle est responsable de pharyngites, de bronchites et de pneumonies (Everett *et al*., 1999 ; Read *et al*., 2000). Récemment, cette espèce a aussi été détectée chez des faucons (*Falco tinnunculus*) (Lémus *et al.*, 2010).

1.2.2.3. *Chlamydia suis*

L'espèce *C. suis* est un pathogène opportuniste du porc (*Sus scrofa domesticus*). En effet, elle est classiquement hébergée par des porcs sains au niveau de leurs intestins (Kauffold *et al*.,2006). Cependant, elle peut aussi être associée à des pneumonies, des conjonctivites, des polyarthrites, des entérites et des désordres de la reproduction chez les porcs (Sachse *et al*., 2004).
Cet agent pathogène a aussi été détecté chez des moutons ainsi que chez des bovins, équins et félins (Pantchev *et al*., 2009b ; Polkinghorne *et al*., 2009). Cette espèce vient d'être récemment détectée chez des faucons (Lémus *et al*., 2010).

1.2.2.4. *Chlamydophila pecorum*

Jusqu'à maintenant, les souches de *C. pecorum* ont principalement été isolées de mammifères tels que les ruminants, les porcs et le koala, mais aussi à partir d'oiseaux (Denamur *et al*., 1991; Fukushi et Hirai, 1992 ; Girjes *et al*., 1993; Tanaka *et al*., 2005).
Chez les koalas, cette espèce responsables de troubles de la reproduction comme la stérilité ou des inflammations du tractus urinaire.
Chez les ruminants et le porc, elle peut être responsable de plusieurs pathologies comme des avortements, des conjonctivites, des encéphalomyélites, des pneumonies ou encore des polyarthrites (Anderson *et al*., 1996; Kaltenboeck *et al*., 1993). Mais, le plus souvent, cette espèce est isolée à partir de fèces d'animaux ne présentant pas de signes cliniques.

1.2.2.5. *Chlamydophila pneumoniae*

L'espèce *C. pneumoniae* est principalement isolée chez l'Homme et ce à travers le monde entier. Cependant, elle a également été isolée chez le cheval, le koala, les amphibiens australiens et

africains, les serpents, les iguanes, les caméléons et les bandicoots (Storey *et al*., 1993 ; Jackson *et al*., 1999 ; Berger *et al*., 1999 ; Kutlin *et al*.,2007).

Chez l'Homme, cet agent pathogène infecte principalement les voies respiratoires supérieures. Elle infecte les adultes mais aussi et surtout les enfants (Hammerschlag, 2000). En effet, elle est considérée comme la 3ème cause de broncho-pneumopathie bactérienne chez les enfants de plus de 5 ans (Kuo *et al*., 1995). Elle peut également être associée à des maladies coronariennes chroniques telles que l'athérosclérose menant à l'infarctus du myocarde ainsi qu'à l'anévrisme aortique abdominal (Blanchard *et al*., 2000).

Des études de séroprévalence ont montré que plus de 60 % des adultes sont porteurs ou ont été exposés à cette bactérie durant leur vie.

1.2.2.6. *Chlamydophila abortus*

Chlamydophila abortus est une espèce présentant un tropisme pour le placenta des ruminants (bovins, caprins et ovins) et est responsable d'avortements et de mortalités néonatales chez ces animaux mais surtout chez les ovins et est alors responsable de la maladie appelée chlamydiose abortive ou OEA pour « ovine enzootic abortion » (avortement enzootique des ovins). Les souches de *C. abortus* peuvent aussi être responsables de nombreuses infections telles que des conjonctivites, des arthrites, des entérites, des pneumonies, des orchites ou des épididymites. Elles peuvent également infecter le porc, les équidés et les oiseaux (Nietfeld, 2001; Rodolakis *et al*., 1998 ; Lémus *et al*., 2010)

Chez l'homme, quelques cas d'avortements ont été décrits chez des éleveuses de moutons (Pospischil *et al*., 2002).

1.2.2.7. *Chlamydophila felis*

L'espèce *C. felis* est endémique dans les populations de chats où elle est responsable de conjonctivites et de rhinites (Sykes, 2005). Elle est considérée comme l'agent le plus commun de conjonctivites félines dans le monde. En effet, une étude à montré que 11 à 16 % des chats domestiques en Europe, 5 % aux USA et plus de 25 % au Japon, sont infectés par *C. felis* (Ohya *et al*., 2008). Des avortements spontanés ont été également observés chez des chattes infectées (Rodolakis, 1993).

1.2.2.8. *Chlamydophila caviae*

Chlamydophila caviae est l'agent causal, chez le cobaye, de conjonctivites (Guinea pig inclusion conjunctivitis, GPIC) ainsi que d'infections du tractus uro-génital (Rank et Sanders, 1992; Read *et al*., 2000).

1.2.2.9. *Chlamydophila psittaci*

Cette bactérie est l'agent responsable de la psittacose ou ornithose ou encore chlamydiose. C'est une zoonose, *i.e.* une maladie transmissible des animaux à l'Homme, dont la transmission se fait par inhalation, contact ou ingestion de fientes contaminées. La psittacose humaine est souvent caractérisée par des symptômes grippaux pouvant dégénérer en pneumonie létale. Chez les oiseaux *C. psittaci* est souvent systémique et les infections peuvent être inapparentes, sévères, aiguës ou chronique avec une excrétion via les fèces intermittente. Les personnes à risque sont donc celles en contact régulier avec les oiseaux comme les éleveurs, les personnes travaillant en abattoirs ou encore les personnes propriétaires d'oiseaux d'agrément. Il semble y avoir chez *C. psittaci* une spécificité d'hôte en fonction du sérovar de la bactérie (tableau 4) (Vanrompay *et al*., 1994 ; Andersen, 1998a ; Spalatin *et al*., 1966 ; Page *et al*., 1967 ; Cox *et al*., 1998).

Tableau 4. Classification des sérovars de *Chlamydophila psittaci* en fonction de leurs hôtes.

Sérovar	Hôte associé
A	Endémique chez les psittacidés
	Zoonotique sporadique chez l'Homme
	Tortue
B	Endémique chez le pigeon
	Faible virulence chez la dinde
	Avortement chez les bovins
C	Canard
	Oie
	Faible virulence chez la dinde
	Perdrix
	Zoonotique chez l'Homme
D	Forte virulence chez la dinde
	Mouette
	Perruche
	Zoonotique chez l'Homme
E	Pigeon
	Autruche
	Nandou
	Canard
	Faible virulence chez la dinde
	Pneumonie chez l'Homme
F	Isolé d'une Perruche
M56	Rat musqué
	Lièvre d'Amérique
WC	Entérite chez les bovins

1.3. Caractéristiques biologiques

1.3.1. Différentes formes de *Chlamydiaceae*

1.3.1.1. Corps élémentaires

Les corps élémentaires (CE) sont de petites structures rondes caractérisées par un nucléole dense aux électrons, excentré et constitué d'ADN (Popov *et al*., 1978) (figure 31). Ces corps sont limités par deux systèmes membranaires: une membrane interne qui correspond à la membrane cytoplasmique, et une membrane externe de 10 nm qui présente un réseau de sous-unités protéiques sur sa face interne (Chang et Moulder, 1978 ; Lepinay *et al*., 1971a, 1971b ; Moulder, 1983). La rigidité du complexe membranaire est due principalement aux ponts disulfures créés entre les résidus de cystéine des protéines membranaires, notamment la MOMP (Major Outer Membrane Protein).

Les CE représentent la seule forme infectieuse des *Chlamydiaceae* au cours du cycle de développement. Ils sont dits « spore-like » *i.e.* c'est une forme assez proche d'une forme sporulée de la bactérie. En effet, ils sont métaboliquement inactifs, se présentent sous la forme de corps sphériques et rigides de 0.25 à 0.35 µm de diamètre et assurent la survie des *Chlamydiaceae* en dehors de la cellule hôte (tableau 5). L'ultrastructure de ces CE a été beaucoup étudiée (Eb *et al*., 1976; Louis *et al*., 1980 ; Matsumoto, 1982a, 1982b ; Rockey et Matsumoto, 2000 ; Soloff *et al*., 1982).

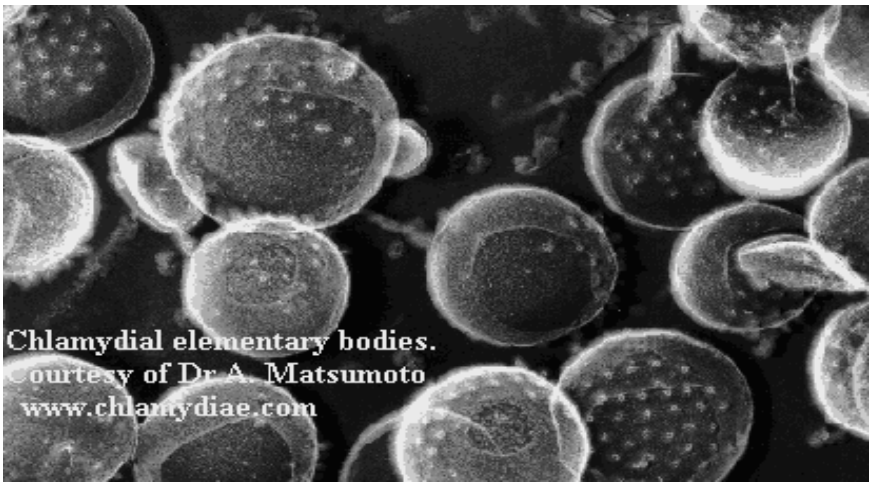


Figure 31. Aspect des corps élémentaires en microscope électronique à transmission (adapté de www.chlamydiae.com).

1.3.1.2. Corps réticulés

Les corps réticulés (CR) sont des structures de 1 µm de diamètre responsables de la réplication intracellulaire des *Chlamydiaceae* par fission binaire. Ces formes ne sont pas infectieuses mais sont métaboliquement actives, leur cytoplasme est riche en ribosomes, qui sont nécessaires pour la synthèse des protéines (tableau 5) (Orfila, 1982).

Tableau 5. Caractéristiques des corps élémentaires et réticulés (modifié à partir de Ward, 1983).

Caractéristique	Corps élémentaire	Corps réticulé
Taille	0.2-0.3 microns	1 micron
Forme	électron dense noyau ; rigide	Fragile, polymorphique
Infection	Infectieux	Non- Infectieux
RNA : DNA ratio	1 : 1 (noyau condensé d'ADN)	3 : 1 (ribosomes)
Activités métaboliques	Relativement inactif	Actif, forme de réplication
Trypsine	Résistant	Sensible
Projections et rosettes	moins	Plus

1.3.1.3. Corps intermédiaires

Il existe une forme passagère entre le CR et le CE appelée corps intermédiaire (CI). Elle apparaît au moment de la différenciation des CR en CE, lors de la recondensation de l'ADN. Les CI ont un diamètre de 0.45 à 0.60 µm et sont généralement entourés par la membrane d'inclusion, issue de l'endocytose (Orfila, 1982).

1.3.2. Cycle de développement

Le CE est la forme mature, infectieuse et stable des *Chlamydiaceae*. Il se fixe à la membrane externe de la cellule hôte puis pénètre à l'intérieur par endocytose. Dès que le CE est entré dans la cellule, il se réorganise en une forme réticulée le CR qui est plus grosse, moins dense et plus riche en ARN. Cette forme est métaboliquement active, synthétisant des protéines et d'autres macromolécules. Par des mécanismes toujours inconnus, on constate que les *Chlamydiaceae* inhibent la fusion du phagosome avec les lysosomes (figure 32).

Environ 8 heures après l'infection, les CR commencent à se diviser par fission binaire. Approximativement 18 à 24 heures après l'infection, les CR, par un processus de réorganisation et de condensation, deviennent des CI puis des CE. Les CE sont alors libérés lors de la lyse cellulaire et peuvent alors initier un autre cycle.

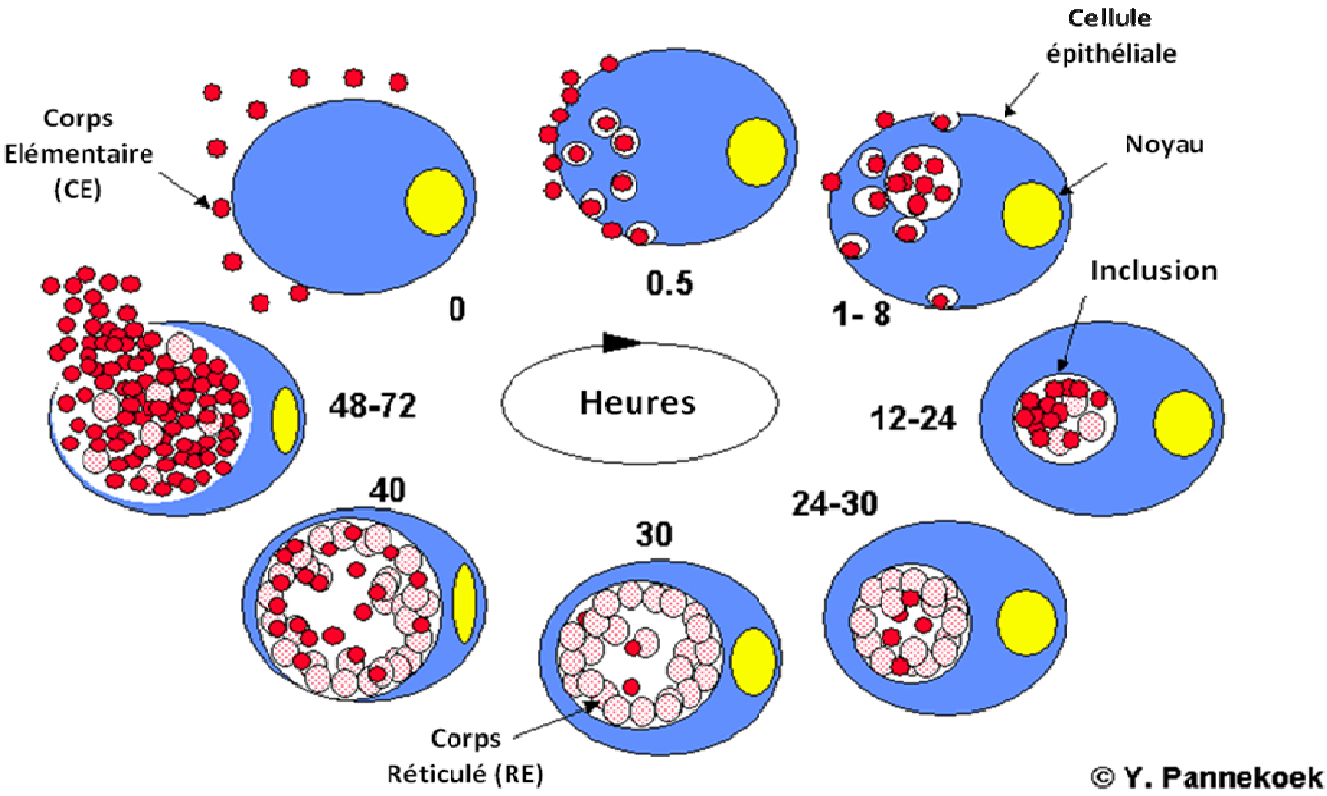


Figure 32. Cycle de développement des *Chlamydiaceae* (adaptée de www.chlamydiae.com)

Le cas de *Chlamydiaceae* sous forme de CR déformés associés à une persistance dans la cellule hôte ont été décrits (Shatkin *et al*., 1985 ; Airenne *et al*., 1999). L'état de persistance est caractérisé par des changements structurels et métaboliques de la cellule. Elle est souvent associée à une infection chronique ou apparaît à la suite de traitements antibiotiques (pénicilline), le manque de tryptophane dans la cellule ou l'action de l'interféron gamma.

2. Les infections à *Chlamydophila psittaci*

2.1. Chez l'Homme

2.1.1. Signes cliniques

Chez l'Homme, la maladie est caractérisée sous le nom de psittacose et présente trois formes possibles. Le plus souvent, l'infection est bénigne et se manifeste par de la fièvre, des maux de tête intenses, une toux sèche et certaines fois par une conjonctivite. Elle peut aussi être sévère, et affiche alors le tableau clinique d'un syndrome grippal avec une température élevée 39°-40°C, des frissons, des douleurs musculaires, une toux, voire une pneumonie et une grande fatigue. La convalescence est ensuite souvent lente et une rechute ou encore des complications cardiaques sont possibles. Le délai d'incubation de cette forme de la psittacose est compris entre 5 et 19 jours. Si elle n'est pas soignée à temps, cela peut conduire à la troisième forme de la maladie qui est une forme généralisée ou septicémique avec des symptômes plus diffus (signes cardiaques, neurologiques, hépatiques, pulmonaires ou rénaux) (figure 33) (Eeckhout *et al*., 1986 ; Oldach *et al*., 1993 ; Levison *et al*., 1971 ; Vanrompay *et al*., 1995a).

Le taux de mortalité lié aux complications est supérieur à 20 % en l'absence de traitement antibiotique spécifique, et inférieur à 1 % en cas de traitement précoce adapté.

Figure 33. Radiographie thoracique d'un patient atteint de chlamydiose (Rohde *et al*., 2010).

2.1.2. Epidémiologie

La contamination humaine se fait en général auprès d'oiseaux malades ou porteurs sains, par contact direct ou inhalation de poussières contaminées. De ce fait, les professions les plus exposées sont celles qui favorisent ce contact comme les éleveurs de volailles ou d'oiseaux d'agrément, les personnels d'abattoir, les personnels d'animalerie ou vétérinaires (Harkinezhad *et al.*, 2009b). Lors d'une forte exposition dans un cadre épidémique, le taux de personnes malades peut varier de 10 à 45 % selon l'activité professionnelle, la virulence de la souche de *C. psittaci* en cause et aussi selon la sensibilité de l'hôte humain (Harkinezhad *et al.*, 2009b).

Il n'y a pas de transmission alimentaire ni interhumaine rapportée (Corsaro *et al*., 2002).

N'étant pas à déclaration obligatoire, la fréquence des cas de psittacose en France est relativement mal connue mais estimée, par le Centre National de Référence des *Chlamydiae* (Université Victor Ségalen, Bordeaux), à une vingtaine de cas par an. Cependant, il y a certainement une sous estimation du nombre de cas humains de psittacose.

De 1996 à 2007, 10 épisodes de cas groupés ont été identifiés et analysés : 3 épisodes familiaux liés à des Psittacidés, 6 épisodes en milieu professionnel (4 en abattoirs et 2 en élevages) et un lors d'une exposition d'oiseaux d'ornement (Pellé-Duporté *et al*., 1996 ; Schvoerer et Guillaumot, 1998 ; Abadia *et al*., 2001 ; Pellé-Duporté *et al*., 2001 ; Abadia *et al*., 2006).

La psittacose est reconnue en tant que maladie professionnelle. Une enquête rétrospective a été conduite par la Mutualité Sociale Agricole (MSA) en 2000 sur la base des arrêts de travail au sein de la filière avicole en Bretagne et dans les Pays de la Loire. N'ont été retenus que les dossiers pour lesquels les personnels présentaient une symptomatologie évocatrice de la psittacose ou ayant eu un traitement compatible avec une psittacose. Cette étude a révélé une séroprévalence de 44 % (Abadia *et al*., 2006).

Une étude rétrospective a été réalisée à l'hôpital de Cholet entre octobre 1993 et décembre 2000 et a permis de recenser 69 pneumopathies à *C. psittaci* hospitalisées. Un contact avec les volailles (quel que soit le poste dans la filière agroalimentaire), et plus particulièrement les canards, a été identifié pour 61 cas. Peu de cas pouvaient être imputables à des contacts avec des oiseaux sauvages ou d'agrément (Abadia *et al*., 2001).

En 2008 et 2009, une étude sur la psittacose a été menée dans 15 départements du Sud-Ouest et de l'Ouest de la France afin de mieux connaître la fréquence et les caractéristiques des cas de psittacose hospitalisés. Cette étude a été conduite par l'Institut de veille sanitaire (InVS), les Cellules interrégionales d'épidémiologie (CIRE), le CNR et l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES) en collaboration avec les directions départementales des affaires sanitaires et sociales (DDASS) et les directions départementales des services vétérinaires des départements concernés. Parmi les 90

patients inclus dans cette étude, des expositions professionnelles aux oiseaux étaient reportées pour 47 d'entre eux soit 53 %, avec une grande majorité pour le canard (38/47), et des expositions non-professionnelles aux oiseaux (volailles ou agrément) étaient citées pour 57 patients sur 90. Des études vétérinaires sur le terrain ont été menées pour 19 des patients. Sur ces 19 investigations, la présence de *C. psittaci* a été confirmée chez les oiseaux présents dans l'entourage de 6 cas confirmés ou probables. Pour les 13 autres enquêtes terrain menées, la présence de *C. psittaci* a été confirmée chez les oiseaux présents dans l'entourage de 5 cas non confirmés et la présence d'une *Chlamydiaceae* distincte de *C. psittaci*, et non décrite avant, a été constatée dans l'entourage d'un cas non confirmé.

2.2. Chez les oiseaux

2.2.1. Signes cliniques

Chez les oiseaux la maladie est définie sous le nom de chlamydiose aviaire. Les symptômes de l'infection varient en fonction des souches et de l'espèce animale. Les signes cliniques typiques de l'infection, induits par les souches virulentes de *C. psittaci,* sont "pneumo-entériques" et se traduisent par une diarrhée accompagnée d'une perte de poids, de troubles respiratoires, de décharges nasales, d'une polyurie et d'un abattement (Harkinezhad *et al*., 2009a).

La sévérité de la maladie chez les dindes dépend de la souche de *C. psittaci* incriminée et de la présence concomitante d'autres maladies. Les souches appartenant au sérovar D sont généralement les plus virulentes et peuvent induire des pathologies plus graves, comme une conjonctivite, une rhinite, une pneumonie, une péricardite, une entérite ou une diminution de la production d'œufs (Vanrompay *et al*., 1995b). Au pic de la maladie dans un troupeau infecté avec une souche sérovar D, 50 à 80 % des oiseaux peuvent présenter des signes cliniques et la mortalité est souvent de 10 à 30 % (Andersen et Vanrompay, 2003). Chez les dindes de chair, des taux de mortalité avoisinant les 80 % ont été rapportés (Vanrompay *et al*., 1993b). D'autres sérovars tels que les sérovars A et B sont aussi retrouvés chez la dinde (Vanrompay *et al*., 1993a).

Contrairement aux dindes, les canards et les pigeons sont souvent des porteurs asymptomatiques de *C. psittaci* (Magnino *et al*., 2009 ; Guérin *et al*., 2006). Cependant on a pu aussi observer des signes cliniques chez le canard incluant des tremblements de la tête, une démarche mal assurée, une conjonctivite, des décharges nasales de séreuses à purulentes, une dépression et la mort (Arzey et Arzey, 1990). Dans cette même étude, une forme modérée a été reconnue dans laquelle les signes de

la maladie sont minimes ou absents, et la mort est seulement associée au stress de la manipulation ou à d'autres maladies (Arzey et Arzey, 1990).

Chez les Psittacidés, on observe deux formes de la maladie. La forme aiguë qui se compose d'un syndrome « fébrile » avec diarrhée jaune-verdâtre, jetage, abattement, plumes ébouriffées et quelquefois des signes nerveux. Cette forme de la maladie entraine généralement une mortalité en 2 à 15 jours. Il existe aussi des formes subaiguës à chroniques de la maladie. Ces formes se composent de signes respiratoires (jetage, toux, dyspnée), d'amaigrissement, de signes digestifs discrets, de lésions et de dépôts fibrineux sur les séreuses (péricardites sérofibrineuses) (Harrison, 1989, Ganiere, 2008).

2.2.2. Lésions

2.2.2.1. Aspect macroscopique

L'autopsie et les observations histologiques ne sont pas caractéristiques et ne sont pas suffisantes pour différencier la chlamydiose d'autres maladies systémiques. La sévérité des lésions trouvées chez les oiseaux dues à la chlamydiose dépend, à l'image des signes cliniques généraux, de la virulence de la souche, de la sensibilité de l'hôte, de la voie d'inoculation et de la présence de maladies associées (McDonald and Bayer, 1981).

Un grossissement de la rate est généralement observé, associé avec une baisse de la consistance. Elle peut aussi contenir des foyers nécrotiques blancs ou des hémorragies pétéchiales sur sa surface.

Le foie peut aussi subir un grossissement, ainsi que devenir friable, avec une teinte jaune ou verte, et des petits foyers nécrotiques peuvent être présents sur la capsule.

Les sacs aériens peuvent s'épaissir et s'obscurcir en apparence, ils peuvent aussi se recouvrir d'un fin exsudat jaune fibrinopurulent.

Les poumons sont souvent congestionnés, de façon diffuse dans la plupart des cas.

On peut observer au niveau du sac péricardique une réaction inflammatoire qui peut être purulente, séreuse ou fibrineuse.

Une congestion peut être visible dans le tractus intestinal, spécifiquement sur la surface séreuse (Amstein and Meyer, 1969; Bankowski *et al*., 1977; Page, 1978 ; McDonald and Bayer, 1981; Fudge, 1984; Wages, 1987; Grimes and Wyrick, 1991).

Beaucoup d'autres lésions ont été décrites comme la rhinite, la conjonctivite, la sinusite, l'aérosacculite, la pneumonie, le péricardite, myocardite, hépatite, la néphrite, l'entérite, l'orchite, la polysérosite et la méningo-encéphalite (Vanrompay *et al*., 1993b ; Erbeck et Nunn, 1999).

2.2.2.2. Aspect microscopique

De petites lésions histopathologiques peuvent apparaître dans le cas d'une chlamydiose aiguë et fatale. La taille de ces lésions dépend de la virulence de la souche, de la durée de la maladie, de la sensibilité de l'hôte et de la voie de contamination. Des co-infections sont communes (Fudge, 1984).

On peut observer une altération de l'architecture de la rate associée avec une histiocytose (hyperplasie des cellules endothéliales réticulaires). Une hyperplasie lymphoïde et une plasmocytose peuvent être présentes ainsi que des zones de nécrose.

Dans le foie, des infiltrats d'hétérophiles et de mononucléaires sont communs. Dans le cas d'infections suraiguës, des nécroses multifocales et coagulantes sont observées. Dans des infections plus chroniques, on distingue une hyperplasie et histiocytose des conduits biliaires. Des infections hépatiques chroniques ont aussi montré des fibroses et des infiltrats de mononucléaires.

Les lésions observées dans les sacs aériens résultent d'une infiltration de cellules mononucléaires (surtout des macrophages) et d'hétérophiles. Les sacs aériens peuvent s'épaissir par prolifération des tissus épithéliales et conjonctifs (Tappe *et al*., 1989).

La pathologie pulmonaire est souvent minime. Cependant on peut observer une légère pneumonie ainsi que qu'une myocardite diffuse présentant occasionnellement de larges zones de nécrose.

Au niveau des intestins une entérite lymphocytique et plasmatique peut être décrite, s'associant généralement avec la présence de globules blancs dans les selles.

Des nécroses et infiltrats inflammatoires peuvent être visibles dans le rein. Une inflammation surrénalienne et gonadique peut aussi être présente.

On peut aussi remarquer une augmentation significative des séries granulocytaire dans la moelle osseuse (McDonald and Bayer, 1981; Fudge, 1984 ; Vanrompay *et al*., 1995a).

Enfin, il est possible de constater des conjonctivites avec une infiltration de différents types cellulaires et des cellules macrophagiques avec des inclusions intracytoplasmiques (Vanrompay *et al*., 1993b).

2.3. Importance de la chlamydiose aviaire en élevage

De distribution mondiale, *C. psittaci* est totalement ubiquiste au sein du règne animal et est susceptible d'infecter la plupart des espèces d'oiseaux domestiques et sauvages (Andersen et Vanrompay, 2000).

Chez les dindes de chair, un syndrome respiratoire ayant les caractéristiques de la rhino-trachéite est régulièrement rapporté (Vanrompay *et al*., 1993b). Chez les dindes infectées avec des souches de faible virulence, les signes de la maladie sont moindres et incluent généralement de l'anorexie, et dans certains cas, des fientes verdâtres. Des signes d'arthrite ont aussi été associés aux infections à *C. psittaci* chez les dindes.

La plupart des études concernent la dinde (Vanrompay *et al*., 1994, 1995b ; Van Loock *et al*., 2006 ; Harkinezhad *et al*., 2009c) et évoquent une séroprévalence élevée de l'ordre de 70 % mais avec des écarts assez importants selon les études. Par exemple, de 1992 à 1995, différentes études sérologiques conduites en Belgique, ont montré de 50 % à 90 % de séroprévalence (Vanrompay *et al*., 1997). Alors que en 1998, 400 sérums prélevés dans un abattoir breton ont permis de mettre en avant une séroprévalence de 30 % (Kempf *et al*., 2000). Cependant, la séroconversion témoigne d'une infection passée, sans pour autant signifier une excrétion active.

La chlamydiose chez les canards est importante autant du point de vue économique que pour le risque qu'elle représente pour la santé publique dans de nombreuses régions du monde. Dans le cas de maladie aiguë, une morbidité de 80 % peut être observée ainsi qu'une mortalité variant de 0 à 40 % en fonction de l'âge des canards et de la présence d'infections concurrentes comme la salmonellose (Andersen et Vanrompay, 2003). Cependant, en France le portage de *C. psittaci* chez le canard s'avère majoritairement asymptomatique (Léon *et al*., 2004). Dans ce cas, la problématique repose surtout sur le problème de santé publique posé par l'exposition du personnel à ces animaux cliniquement sains mais excréteurs. En effet, les infections humaines sont connues pour survenir après la manipulation ou l'abattage d'animaux infectés (présentant des signes cliniques, ou non) (OIE, 2008).

Les informations sur l'incidence et l'épidémiologie de *C. psittaci* chez le canard d'élevage sont limitées. De nombreux cas de contamination humaine en lien avec l'élevage de canard ont été rapportés (Bennedsen *et al*., 2000 ; Goupil *et al*., 1998 ; Hinton *et al*., 1993 ; Andersen et Vanrompay, 2000).

Les enquêtes de prévalence en élevage de canards montrent une assez grande disparité en fonction du moment de la réalisation des prélèvements et du contexte. En 1984, une étude menée en Angleterre sur 1238 sérums de canards, a montré une séroprévalence de 51 %. Cette étude a aussi

montré que la séroprévalence est d'autant plus importante que les canards sont âgés (Chalmers, 1984). En 1992, une enquête a été faite en Angleterre dans un élevage après une épidémie de cas humains. Les sérums de 49 canards sains ont été testé par ELISA et ont fait état d'une séroprévalence de près de 75 % (Newman *et al*., 1992).

D'autres études ont aussi été menées à partir de technique PCR. En 1996, en Egypte une étude menée sur 156 écouvillons cloacaux prélevés sur des canards en élevage, a révélé une prévalence de 69 % (Mousa *et al*., 1996). En 2004, une étude sur 780 canards provenant de 60 salles de gavage du sud-ouest de la France, a révélé, après analyse par PCR quantitative, une prévalence de 22 % en avril, 3 % en juillet et 28 % en décembre (Sraka, 2004).

Ces valeurs de prévalence sont à analyser en fonction des méthodes utilisées. En effet, les données apportées par la sérologie rendent compte d'une exposition passée au germe alors que les résultats PCR montrent une excrétion active du pathogène par l'hôte. Une étude menée en 2006 par Laroucau *et al.*, suite à 5 cas de contamination humaine dans des élevages de canards, a montré des résultats discordants entre sérologie et PCR. En effet, lors de cette étude, il a été montré qu'il y avait une forte excrétion chez les animaux non corrélée à une forte séroprévalence (Laroucau *et al*., 2009a).

On constate donc une grande variabilité de cette prévalence pouvant aller de 21 % sur des animaux cliniquement sains (Kaleta et Taday, 2003) à près de 80 % dans le cas d'élevages liés à une contamination humaine récente (Newman *et al*., 1992).

Les enquêtes épidémiologiques montrent que les poulets (*Gallus gallus*) sont relativement résistants à la chlamydiose. On observe des cas de maladies aiguës, associés avec une mortalité, que chez les jeunes oiseaux (Grimes et Wyrick, 1991). Chez les poules pondeuses, la chlamydiose peut entrainer la chute de la production d'œufs, production qui restera basse jusqu'à la réminiscence totale (Arzey et Arzey, 1990).

Toutes ces données rendent compte de l'importance de la chlamydiose aviaire en élevage.

2.4. Epidémiologie en élevage

2.4.1. Sources et modes de contamination

Plusieurs sources de contamination sont possibles en élevages aviaires. Les principales semblent être les animaux d'élevage eux-mêmes qui peuvent être réservoir ainsi que l'environnement.

La transmission inter-animale se fait principalement de manière horizontale, directe ou indirecte. La durée d'incubation peut varier de quelques jours à plusieurs semaines et dépend de la virulence de la

souche, de la dose infectieuse, et de l'âge des oiseaux. En effet, les jeunes animaux sont généralement les plus sensibles à l'infection et présentent des signes cliniques et une mortalité plus importante (Andersen et Vanrompay, 2000).

La transmission verticale (transovarienne) et pseudo-verticale, depuis les pondeuses vers les œufs, a aussi été décrite chez le poulet, le canard, la perruche, la mouette et l'oie des neiges (*Chen caerulescens)* (Meyer and Eddie, 1933 ; Illner, 1992 ; Lehnert, 1962; Wilt *et al*., 1972 ; Wittenbrink *et al*., 1993). Cependant, l'importance de ce mode transmission n'a, à ce jour, pas encore été évaluée.

Les animaux ainsi contaminés vont à un moment se mettre à excréter puis à contaminer à leur tour les autres animaux directement ou via leur environnement. Cette excrétion est intermittente et peut être augmentée dans les fientes en cas de stress (Andersen et Vanrompay, 2000). Les *Chlamydiaceae* sous leur forme CE sont capables de persister dans l'environnement de quelques jours dans les déjections d'oiseaux à plusieurs mois dans un milieu protégé comme de la paille ou des débris (Smith *et al.*, 2005). La contamination se fait donc via la poussière contaminée par les plumes et les fèces, par inhalation ou par ingestion de fèces contaminés (Page, 1959).

Les ectoparasites hématophages, incluant les araignées, les poux et les simulies, ont été démontrés comme vecteurs possibles de *Chlamydiae* chez la dinde (Shewen, 1980).

Les oiseaux sauvages sont régulièrement évoqués comme source possible de contamination d'un troupeau indemne, notamment par le biais de la contamination des aliments des oiseaux d'élevage (Andersen et Vanrompay, 2000). Cependant, les souches (de sérotypes et/ou de génotypes différents) hébergées par faune sauvage et par les oiseaux d'élevages sont le plus souvent différentes.

2.4.2. Causes favorisantes

2.4.2.1. Chez l'Homme

Pour la contamination humaine, les professions les plus exposées sont les éleveurs d'oiseaux ou de volailles, personnels d'abattoir, vendeurs d'oiseaux ou vétérinaires (Abadia *et al*., 2001), les personnes âgées et les employés temporaires étant les plus sensibles, car le personnel permanent développe généralement une immunité après de multiples infections subcliniques (Salisch *et al*., 1996).

2.4.2.2. Chez l'animal

Dans un élevage, les causes favorisantes peuvent être multiples: transport, sous-alimentation, surpeuplement, infections intercurrentes, mauvaises conditions d'élevage (Banon, 1999).
L'âge des animaux est aussi un facteur favorisant les infections à *C. psittaci*. En effet, les jeunes sont plus sensibles à l'infection (Andersen et Vanrompay, 2003).
Les coinfections avec d'autres pathogènes semblent être un facteur favorisant. En effet, des études ont montré que l'expression de la pathogénicité de *C. psittaci* était exacerbée en présence d'un autre pathogène, tel que *E. coli*, par exemple (Van Loock *et al*., 2006).

2.5. Diagnostic de laboratoire

Le diagnostic direct par isolement de la bactérie est faisable mais difficile. En effet, cela nécessite généralement une technique de prélèvement invasive (lavage broncho-alvéolaire) ainsi qu'une technicité assez élevée associée aux différentes méthodes d'examens directs existantes.
La technique de détection par PCR est une méthode beaucoup plus pratique car elle peut être effectuée à partir d'un simple écouvillon pharyngé du patient ou de l'animal. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de kit commercial pour la détection spécifique de *C. psittaci*.
Le diagnostic sérologique peut être réalisé par différentes techniques : fixation du complément, ELISA ou micro-immunofluorescence (technique de référence). Cependant, leur résultats doivent être interprétés avec précaution car la spécificité de ces tests est limitée (réaction croisées avec *C. pneumoniae* et *C. trachomatis*, *Legionella*, *C. burnetii*, *M. pneumoniae*, *Bartonella*).

2.5.1. Direct

2.5.1.1. Examen microscopique

L'examen microscopique est fait à partir de prélèvements ayant subi une coloration. Il existe plusieurs colorations possibles, les colorations de Giemsa, Gimenez, Ziehl-Neelsen et Macchiavello sont les plus couramment utilisées pour la mise en évidence de *Chlamydiaceae* à partir de calques d'organes (Andersen, 1998a).

2.5.1.2. Microimmunofluorescence

Cette technique consiste à coupler des anticorps monoclonaux, anti-LPS *Chlamydiaceae* (kit commercial), à un fluorophore (FITC) (figure 34 et 35). La présence ou l'absence de ces épitopes peut alors être déterminée et ainsi rendre compte de la présence ou l'absence de *C. psittaci* dans l'échantillon (Freidank *et al.*, 1997 ; Eb et Orfila, 1982).

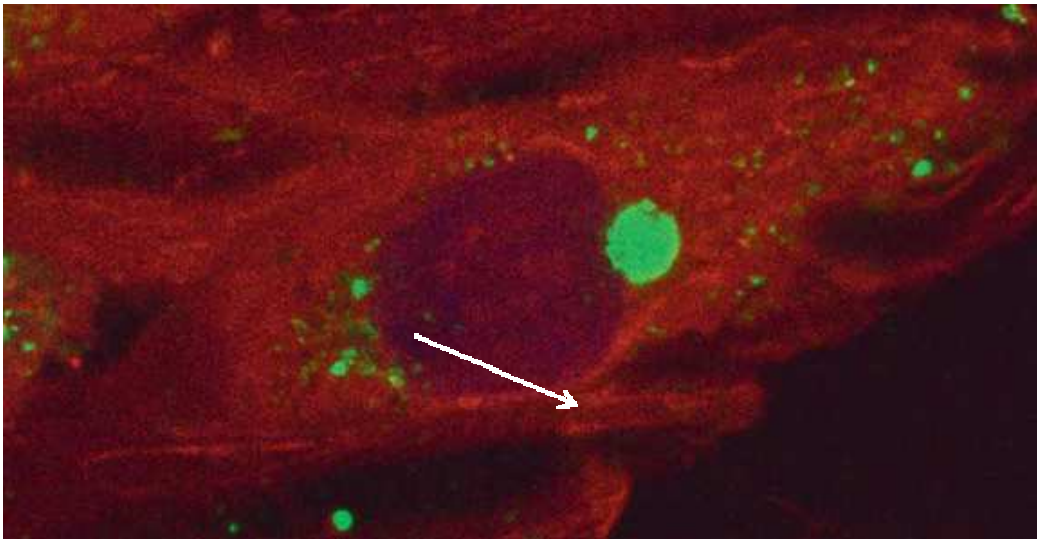


Figure 34. Image de Microimmunofluorescence de *Chlamydiaceae*, inclusion dans une cellule musculaire (adapté de Rohde *et al.*, 2010).

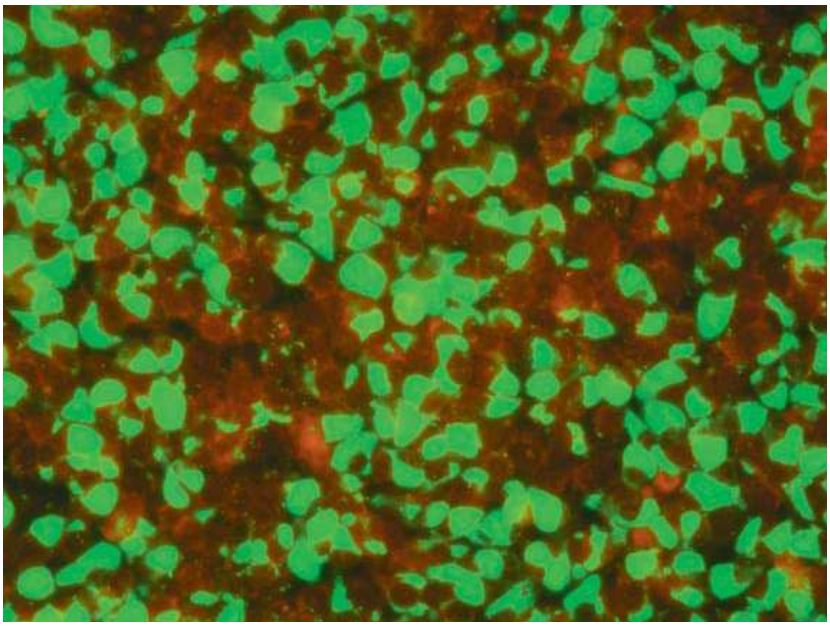


Figure 35. Culture cellulaire (BGM) infectée par *C. psittaci*, marquée avec un anticorps anti-LPS couplé à un marqueur fluorescent ; les inclusions de *Chlamydophila* apparaissent en vert (Rohde *et al.*, 2010).

2.5.1.3. Culture

Il existe deux types de culture pour les *Chlamydiae* : la culture cellulaire ou la culture sur œufs embryonnés.

Pour la culture des *Chlamydiaceae* plusieurs lignées cellulaires sont utilisées :, Buffalo Green Monkey (BGM), McCoy, HeLa, African Green Monkey Kidney (Vero) et cellules L929 (Barnes, 1989 ; Vanrompay *et al.*, 1992 ; Schiller *et al.*, 2004). Le milieu de culture est généralement additionné de 5 à 10 % de sérum de veau fœtal et d'un cocktail d'antibiotiques n'inhibant pas la multiplication des *Chlamydiaceae* (Schiller *et al.*, 2004).

La culture sur œufs embryonnés consiste à injecter jusqu'à 0,5 ml d'inoculum dans le sac vitellin d'un embryon de 6 à 7 jours indemne d'agents pathogènes spécifiques. Les œufs sont ensuite incubés en atmosphère humide entre 35°C et 39°C (Kuo *et al.*, 1975 ; Andersen et Vanrompay, 2003). La multiplication de l'organisme provoque généralement la mort de l'embryon sous 3 à 10 jours.

2.5.1.4. Détection par PCR

Deux techniques PCR ont été développées pour la détection de *Chlamydiaceae*, la PCR conventionnelle et la PCR temps réel.

La première utilise l'amplification par PCR de séquence précise du génome grâce à des couples d'amorces spécifiques *Chlamydiaceae* situés de part et d'autre du gène *ompA* de la bactérie (Watson *et al.*, 1991). Les amplicons sont ensuite déposés sur gel d'agarose et séparés par électrophorèse. Cette technique permet de détecter et différencier les espèces de *Chlamydiaceae*.

La PCR en temps réel repose sur l'amplification par PCR d'une séquence donnée grâce à un couple d'amorce spécifique puis à sa détection, à chaque cycle, grâce à une sonde marquée spécifique de la zone amplifiée. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée par la fluorescence émise qui est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et de déterminer la quantité d'ADN initialement présente, grâce à la comparaison avec une gamme titrée. Ce type de technique permet de savoir si le prélèvement contient ou non la bactérie mais aussi d'apprécier le niveau de contamination.

Il existe deux types de PCR temps réel pour détecter les *Chlamydiaceae*, les techniques dites généralistes qui détectent toutes les *Chlamydiaceae*, et les méthodes spécifiques qui ne détectent que l'espèce d'intérêt, ici *Chlamydophila psittaci*.

La technique généraliste est basée sur la détection d'une séquence du gène ribosomal 23S (Yang *et al.*, 2006).

Deux méthodes spécifiques de *C. psittaci* ont été décrites. La première détecte une séquence du gène *incA* (Ménard *et al*., 2006) alors que la seconde détecte une séquence du gène *ompA* codant pour la MOMP (Pantchev *et al*., 2009a).

2.5.2. Indirect

2.5.2.1. Fixation du Complément (FC)

La fixation du complément est une technique sérologique indirecte, cherchant à révéler la présence d'anticorps anti-*C. psittaci*, en utilisant comme révélateur les propriétés hémolytiques du complément.

Dans des micro-cupules sont mis en présence, le sérum dans lequel sont recherchés les anticorps, l'antigène purifié, un extrait plasmatique (contenant les facteurs du complément, un « couple hémolytique » constitué d'un mélange d'hématies et d'anticorps anti-hématies (on parle d'hématies sensibilisées) ainsi que du sérum de poulet. Si il y a présence d'anticorps dans le sérum, la formation de complexes antigène-anticorps provoque l'utilisation du complément, et il n'en reste plus pour détruire les hématies (sédimentation des hématies: point rouge au fond de la cupule). L'absence d'anticorps sériques entraine l'hémolyse (cupule rouge). La technique est quantifiable en utilisant différentes dilutions du sérum permettant ainsi l'obtention d'un titre d'anticorps (Brumfield *et al.*, 1961 ; Grimes, 1985 ; Norme Française, AFNOR NF U-47-007). La présence d'anticorps dans le sérum rend compte d'une exposition passée ou présente au germe. Cela ne signifie donc pas que l'animal est effectivement contaminé.

2.5.2.2. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Cette technique se base sur la détection d'anticorps anti-*C.psittaci* dans le sérum. Pour cela un antigène de *C. psittaci* est fixé sur un support, qui est ensuite mis en contact avec le sérum étudié. L'association antigène-anticorps, si elle a lieu, est révélée grâce à un anticorps secondaire marqué qui vient se fixer sur le premier anticorps (Lewis *et al.*, 1977 ; Sting et Hafez, 1992 ; Verminnen *et al.*, 2006). A ce jour, aucun kit commercial n'existe.

2.6. Typage de *Chlamydophila psittaci*

Pour déterminer la diversité au sein de l'espèce *C. psittaci*, différentes techniques ont été décrites au cours du temps. La première fût le sérotypage puis la disponibilité des génomes et la démocratisation des méthodes d'analyses moléculaires ont permis l'arrivée de techniques de génotypage.

2.6.1. Sérotypage par microimmunofluorescence

La technique de sérotypage par microimmunofluorescence (MIF), utilise des anticorps monoclonaux spécifiques de certains épitopes de la MOMP de *C. psittaci*, et permet ainsi de déterminer le sérovar de l'isolat. En effet, cette méthode à permis de classer les souches de *C. psittaci* en 6 sérovars aviaires (A, B, C, D, E et F) et 2 sérovars non-aviaires (WC et M56) (Andersen, 1991; Vanrompay *et al*., 1993a). Ces sérovars sont fortement liés avec l'hôte chez lequel la souche a été isolée (tableau 4).

Tableau 4. Classification des sérovars de *Chlamydophila psittaci* en fonction de leurs hôtes.

Sérovar	Hôte associé
A	Endémique chez les psittacidés
	Zoonotique sporadique chez l'Homme
	Tortue
B	Endémique chez le pigeon
	Faible virulence chez la dinde
	Avortement chez les bovins
C	Canard
	Oie
	Faible virulence chez la dinde
	Perdrix
	Zoonotique chez l'Homme
D	Forte virulence chez la dinde
	Mouette
	Perruche
	Zoonotique chez l'Homme
E	Pigeon
	Autruche
	Nandou
	Canard
	Faible virulence chez la dinde
	Pneumonie chez l'Homme
F	Isolé d'une Perruche
M56	Rat musqué
	Lièvre d'Amérique
WC	Entérite chez les bovins

2.6.2. PCR-RFLP

La technique de PCR-RFLP consiste à amplifier par PCR une séquence particulière du génome, ici le gène *ompA* codant pour la MOMP, et à le digérer ensuite avec deux enzymes de restriction séparément (*Alu*I et *Mbo*II). Les deux profils générés permettent d'établir un génotype de l'isolat testé en fonction des fragments générés.
Cette méthode a montré une excellente corrélation avec les données obtenues par sérotypage (Sayada *et al.*, 1995).

2.6.3. Séquençage

Deux gènes cibles de séquençage sont principalement utilisés chez les *Chlamydiaceae* : le gène ribosomal 16S (Roosendaal *et al*., 1993) et le gène codant pour une protéine membranaire *ompA* (Stephens *et al*., 1987). Après les premières méthodes (sérotypage et PCR-RFLP), celles ci ont donc permis de confirmer les résultats obtenus mais le séquençage du gène *ompA* a aussi permis la découverte d'un nouveau génotype, le génotype E/B (Geens *et al*., 2005). La méthode basée sur le séquençage du gène *ompA* a ensuite été utilisé pour la classification des *Chlamydiaceae*.

2.6.4. Les puces à ADN

L'analyse par puces à ADN (microarray) repose sur l'hybridation entre la cible (la séquence ADN ou ARN recherchée) et la sonde marquée (ADN ou ARN). Pour cela, les sondes sont fixées sur un support et mise en contact l'ADN génomique cible, précédemment amplifié et biotynilé. Ensuite la coloration est mesurée à chaque point d'intérêt et la présence ou l'absence de chaque type de séquence, dans le mélange initiale, est alors visible.
Sur le même principe qu'une première puce développée par les mêmes auteurs, une seconde puce spécifiquement dédiée au génotypage des souches appartenant à l'espèce *C. psittaci* a été développée (Sachse *et al*., 2008) et à ce titre, les séquences des domaines variables du gène *ompA* ont alors été exploités.
Cette méthode a permis de distinguer 12 génotypes différents dont 7 au sein du génotype A, obtenu par séquençage du gène *ompA*, deux au sein du génotype E/B et enfin trois génotypes corrélés successivement avec les génotypes B, C et E.

OBJECTIFS

Aspergillus fumigatus et *Chlamydophila psittaci* sont deux agents pathogènes majeurs en élevage aviaire. Phylogénétiquement très distants, ces deux micro-organismes partagent tout de même le même mode de transmission aux oiseaux. La moisissure *A. fumigatus* est transmise par des spores asexuées (conidies) aéroportées et la bactérie *C. psittaci* est transmise via les corps élémentaires, assimilables à des spores, en suspension dans l'air.

Les aspergilloses sont des affections fréquentes et graves en élevage avicole. Elles demeurent une cause majeure de morbidité et de mortalité chez de nombreuses espèces d'oiseaux. Les pertes économiques sont importantes notamment dans les élevages de dindes où l'aspergillose est rendue responsable de 5 à 10 % de la mortalité chez les oiseaux les plus jeunes.

De nombreux cas de mortalité et de morbidité sont attribués à la chlamydiose aviaire en Europe, plus particulièrement en élevages de dindes. En France, des investigations autour de cas humains de psittacose identifient fréquemment un lien avec des élevages de canard, chez lesquels l'infection s'apparente à un portage intestinal asymptomatique. La chlamydiose représente un risque important pour la santé publique puisque les personnels des filières sont exposés à des microorganismes capables de produire une infection grave.

Le travail de thèse a, tout d'abord, consisté à étudier la diversité génétique d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydophila psittaci* afin de mieux comprendre la circulation de ces agents pathogènes au sein des élevages. Pour cela, le premier objectif a été de mettre au point des méthodes de génotypage discriminantes afin de tracer les souches et effectuer un suivi en élevage, et, dans le cas de la chlamydiose, établir un lien avec les cas humains associés. Pour les deux microorganismes, le choix s'est porté sur la méthode MLVA (*Multiple Locus Variable-number-tandem-repeat Analysis*) car cette méthode est rapide, discriminante et facile à mettre en œuvre. Cette méthode de typage a été décrite chez de nombreuses bactéries mais aussi chez un champignon (la levure opportuniste *Candida glabrata*). La technique ainsi développée pour le génotypage d'*A. fumigatus* a ensuite été appliquée au génotypage d'isolats circulants dans des bâtiments d'élevages.

La deuxième partie du travail de thèse a porté sur le pouvoir pathogène d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydophila psittaci* chez les oiseaux. Pour cela, l'objectif a été de mettre au point des modèles d'infection expérimentale. Pour *A. fumigatus*, un modèle d'inoculation par nébulisation d'une solution contenant des spores fongiques a été développé sur des poussins âgés d'un jour. La nébulisation avait pour objectif de permettre une meilleure répartition des spores fongiques dans le

tractus respiratoire des animaux et ainsi de reproduire le plus fidèlement possible une infection dans les conditions « naturelles ». Pour *Chlamydophila psittaci*, du fait de la problématique chez le canard en France, un modèle de portage asymptomatique avec excrétion chez le caneton d'un jour a été développé. Ce type de modèle se rapproche de ceux développés pour les salmonelles chez le poulet ou encore pour *C. suis* chez le porc. L'objectif a été de reproduire l'infection asymptomatique et de décrire la localisation des bactéries dans le système digestif. Nous avons également testé la possibilité d'une transmission entre les animaux via les matières fécales contaminées.

ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre 1 : Diversité génétique d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydophila psittaci*

1. La technique MLVA

1.1. Historique

La technique MLVA (*Multiple Locus VNTR Analysis*) est une méthode de typage basée sur l'étude de séquences répétées en tandem et dénommées VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*). Les VNTR ou minisatellites sont habituellement définis comme des séquences répétées de 6 à 100 pb, représentant un motif comprenant quelques centaines de paires de bases à plusieurs milliers.

La technique MLVA a d'abord été développée sur le génome humain (Wyman et White, 1980). Ensuite, dans les années 1990, les premières méthodes utilisant ce type de séquences ont été développées pour des bactéries (Ross *et al.*, 1992 ; Marshall *et al.*, 1996).

La première méthode basée sur l'amplification des VNTR par PCR a été développée en 1997 sur *Haemophilus influenzae* (Van Belkum *et al.*, 1997). Dans cette étude, la technique s'est avérée très discriminante et a permis de regrouper les génotypes en fonction des épidémies pendant lesquelles ils avaient été isolés.

Par la suite, la méthode MLVA a été décrite pour de nombreuses bactéries comme par exemple pour *Mycobacterium tuberculosis* (Frothingham et Meeker-O'Connell, 1998), *Bacillus anthracis* (Keim *et al.*, 2000), *Yersinia pestis* (Adair *et al.*, 2000) (tableau 6).

Tableau 6. Caractéristiques principales des méthodes VNTR développées pour les bactéries *M. tuberculosis, B. anthracis, Y. pestis* et la levure *C. glabrata*.

Micro-organismes	Isolats testés	Nombre de VNTR	Pouvoir discriminant	Références
Mycobacterium tuberculosis	25 souches de référence	11	Moyen	Frothingham *et al.*, 1998
Bacillus anthracis	426 isolats du monde entier	8	Bon	Keim *et al.*, 2000
Yersinia pestis	35 souches de référence	1	Très bon (ID = 0,82)	Adair *et al.*, 2000
Candida glabrata	4 souches de référence et 123 isolats cliniques	6	Très bon (ID = 0,902)	Grenouillet *et al.*, 2007

Dans chacune des ces études, la technique s'est révélée discriminante, rapide et d'une grande facilité d'exécution. Toutes ces caractéristiques font de la MLVA une méthode de choix pour réaliser des études épidémiologiques portant sur un grand nombre d'isolats.

Une technique MLVA utilisant des répétitions en tandem de moins de 6 pb (appelées microsatellites) a été développée pour *Candida glabrata*. Cependant, cette technique s'apparente plus à la méthode MLP (*Microsatellite Length Polymorphism*). A ce jour, aucune méthode utilisant des séquences répétées en tandem de plus de 6 pb (minisatellites ou VNTR) n'a été développée chez les champignons.

1.2. Principe

La technique MLVA est basée sur la détection et la détermination du nombre de séquences répétées en tandem sur le génome. La disponibilité des séquences entières des génomes d'*Aspergillus fumigatus* et *Chlamydophila psittaci* a rendu possible la recherche de ce type de séquences. Pour cela, il est nécessaire d'amplifier par PCR la zone du génome d'intérêt, grâce à un couple d'amorces se fixant de part et d'autres de la partie comportant les répétitions. Une fois la séquence amplifiée, sa taille (en pb) est déterminée (figure 36). Grâce à la connaissance préliminaire de la taille d'une répétition ainsi que des régions flanquantes (petites séquences d'ADN encadrant la séquence d'intérêt), le nombre de répétitions présentes à cet endroit du génome est calculé. Ce même principe est appliqué pour chaque marqueur VNTR. Au final, chaque isolat est caractérisé par un génotype composé d'une suite de chiffres correspondant au nombre de répétitions observées pour chacun des marqueurs testés.

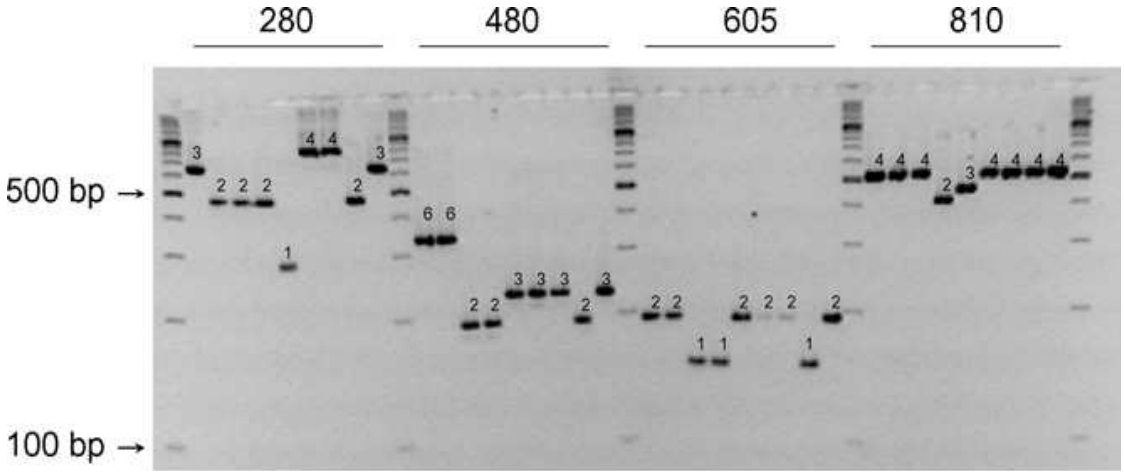


Figure 36. Exemple de gel d'électrophorèse montrant les profils de 9 isolats de *Chlamydophila psittaci* pour 4 marqueurs VNTR (280, 480, 605, 810).
Le nombre de répétitions est noté au dessus de chaque bande (Laroucau *et al.*, 2008).

2. Le typage d'*Aspergillus fumigatus* par MLVA

2.1. Mise au point de la méthode

Article 1

Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing of *Aspergillus fumigatus*

Publié le 20 décembre 2010 dans *BMC Microbiology*

Thierry *et al. BMC Microbiology* 2010, **10**:315
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/315

BMC Microbiology

RESEARCH ARTICLE Open Access

Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing of *Aspergillus fumigatus*

Simon Thierry[1], Dongying Wang[1,2], Pascal Arné[3], Manjula Deville[3], Barbara De Bruin[3], Adélaïde Nieguitsila[3], Christine Pourcel[4], Karine Laroucau[5], René Chermette[3], Weiyi Huang[2], Françoise Botterel[6], Jacques Guillot[3*]

Abstract

Background: Multiple-locus variable-number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) is a prominent subtyping method to resolve closely related microbial isolates to provide information for establishing genetic patterns among isolates and to investigate disease outbreaks. The usefulness of MLVA was recently demonstrated for the avian major pathogen *Chlamydophila psittaci*. In the present study, we developed a similar method for another pathogen of birds: the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*.

Results: We selected 10 VNTR markers located on 4 different chromosomes (1, 5, 6 and 8) of *A. fumigatus*. These markers were tested with 57 unrelated isolates from different hosts or their environment (53 isolates from avian species in France, China or Morocco, 3 isolates from humans collected at CHU Henri Mondor hospital in France and the reference strain CBS 144.89). The Simpson index for individual markers ranged from 0.5771 to 0.8530. A combined loci index calculated with all the markers yielded an index of 0.9994. In a second step, the panel of 10 markers was used in different epidemiological situations and tested on 277 isolates, including 62 isolates from birds in Guangxi province in China, 95 isolates collected in two duck farms in France and 120 environmental isolates from a turkey hatchery in France. A database was created with the results of the present study http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/. Three major clusters of isolates were defined by using the graphing algorithm termed Minimum Spanning Tree (MST). The first cluster comprised most of the avian isolates collected in the two duck farms in France, the second cluster comprised most of the avian isolates collected in poultry farms in China and the third one comprised most of the isolates collected in the turkey hatchery in France.

Conclusions: MLVA displayed excellent discriminatory power. The method showed a good reproducibility. MST analysis revealed an interesting clustering with a clear separation between isolates according to their geographic origin rather than their respective hosts.

Background

The filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* thrives on decaying vegetation and organic debris. It releases large amounts of asexual spores (conidia), which are dispersed by air. As a result of this ubiquitous presence, people and animals are constantly exposed to *A. fumigatus* conidia. In humans, conidia can colonize the respiratory tract, causing pulmonary infections including bronchopulmonary aspergillosis, aspergilloma and invasive aspergillosis. In birds, respiratory aspergillosis is considered as a major cause of morbidity and mortality. Aspergillosis is frequently reported in turkey poults, in quails, in marine birds that are brought into rehabilitation, in captive raptors, and in penguins being maintained in zoological parks [1-3].

The Multiple Locus Variable-number tandem-repeat Analysis (MLVA) is based on polymorphism of tandemly repeated genomic sequences called VNTR (Variable-Number Tandem-Repeats). VNTRs are classically separated into microsatellites (up to 8 bp) and minisatellites (9 bp and more) [4]. The MLVA technique has been used for the genotyping of many bacterial pathogens [5-12] as well as the opportunistic yeast *Candida glabrata* [13]. For these pathogens, MLVA technique allowed to resolve closely related microbial isolates for investigation of disease outbreaks and provided

* Correspondence: jguillot@vet-alfort.fr
[3]ENVA, UMR BIPAR, Ecopham, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2010 Thierry et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Thierry *et al. BMC Microbiology* 2010, **10**:315
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/315

information for establishing phylogenetic patterns among isolates. The MLVA technique can be performed with simple electrophoretic equipment. The usefulness of MLVA was recently demonstrated for the avian major pathogen *Chlamydophila psittaci* [5].

The objective of the present study was to develop a new typing method based on the detection of VNTRs in the filamentous fungus *A. fumigatus*, another major avian pathogen. All putative VNTR markers were screened on the whole genome of *A. fumigatus* strain Af293. Ten markers were finally selected and used for the typing of a large number of isolates from poultry and their environment in France and China.

Methods

Strain collection

In order to develop a MLVA scheme and choose discriminant VNTR markers, a total number of 57 isolates was selected from our laboratory collection. These isolates were considered as geographically or temporally unrelated. The isolates were collected from tissues or from pharyngeal swabs: (i) 49 isolates from different animal species with lesions of aspergillosis in different places in France (n = 48) or Morocco (n = 1); (ii) 3 isolates collected from human cases of aspergillosis at one hospital in Ile-de-France region, France; (iii) 2 isolates collected from healthy birds in 2 poultry farms in France; (iv) 2 isolates from healthy birds in chicken and duck farms in Guangxi province, China; (v) the reference strain CBS 144.89 (Table 1).

To test the MLVA technique, we selected a second group of 277 isolates which represented 5 distinct epidemiological situations: (i) 52 isolates collected during an epidemiological survey conducted in the same duck farm in 2008 in Sarthe department, France; (ii) 43 isolates collected during an epidemiological survey conducted in another single duck farm in 2008 in Sarthe department, France; (iii) 48 isolates collected during an epidemiological survey in a chicken farm in 2008 in Guangxi province, China; (iv) 14 isolates collected during an epidemiological survey in a duck farm in 2008 in Guangxi province, China; (v) 120 environmental isolates collected in 2009 in a turkey hatchery in Maine-et-Loire department, France (Table 2).

To test the specificity of the MLVA technique, isolates from other *Aspergillus* species (*A. lentulus* CBS 117885, *A. flavus* environmental isolate, *A. nidulans* CBS 589.65 and *A. niger* CBS 733.88 and environmental isolate) were also included.

Aspergillus isolates were microscopically identified after cultivation on Malt Agar plates at 37°C until conidia formation. For 95 randomly selected isolates, the species identification was confirmed by amplification and sequencing of partial β-Tubulin gene using primer set βtub1-βtub2 [14,15].

DNA isolation

From each isolate, conidia were collected from the culture and transferred into a microtube for extraction. A bead mill homogenization step was used, before the lysis treatment, to facilitate the disruption of the complex fungal cell wall. Bead mill homogenization was carried out in a high-speed (5000 rpm) mini-bead beater (Mixer Mill MM301, Qiagen, Courtaboeuf, France). Lysis and DNA extraction were then performed using the Nucleospin DNA Extraction Kit (Macherey-Nagel, Germany).

Selection of VNTR markers

The availability of the whole genome sequence of *A. fumigatus* strains (strain Af293) allowed us to search for tandem-repeat sequences in the Tandem Repeat Database of the University Paris Sud XI in Orsay http://minisatellites.u-psud.fr/GPMS/ using the Tandem Repeat Finder software [16]. In order to evaluate the polymorphism of selected tandem repeats, primers were chosen on both sides of the repeats and the 57 unrelated isolates from our laboratory collection were analyzed. PCR were performed in a total volume of 15 µl containing 1-5 ng of DNA, 1X PCR reaction buffer, 0.5 U of Taq polymerase (Takara Bio Inc, Shiga Japan), 250 µM of each deoxynucleotide triphosphate, and 0.5 µM of each flanking primer. Primers were designed using Primer Express® 2.0 software. The initial denaturation step at 95°C for 10 min was followed by 35 cycles consisting of denaturation at 95°C for 30 s, primer annealing at 58°C for 40 s, and elongation at 72°C for 30 s. The final extension step was at 72°C for 10 min.

Ten microliters of amplification product were loaded onto a 3% standard agarose gel. Gels stained with ethidium bromide were visualized under UV light, and photographed (Figure 1). The size marker used was a Quick-load 100-bp ladder (New England BioLabs, Ipswich UK).

Sequencing

The alleles observed on each VNTR were sequenced to confirm the observations made on electrophoresis gel. The number of repeats was estimated from the amplicon size. The sequencing of one example of allele allowed to check whether microdeletions occurred and to evaluate the internal variation of the repeats. A total number of 70 amplicons were sequenced by Qiagen (Courtaboeuf, France) and then aligned and compared, in order to confirm the exact number of repeats.

Stability and reproducibility

The stability of the VNTR markers was estimated by analysis of 5 distinct isolates of *A. fumigatus* subcultured 12 times in 2 months.

Table 1 Origin and period of collection for 57 unrelated isolates of Aspergillus fumigatus examined in the present study

Isolates no	Hosts	Period of collection	Geographic origin
S1-S15, S24, S25, S28-S35, S38, S46, S48, S49, S50, S51, S54, S55	Ducks (*Anas platyrhynchos*), pulmonary aspergillosis	10/2007-04/2008	Poitou-Charentes, France
S17, S18	Pigeons (*Columba livia*), pulmonary aspergillosis	11/2007	Ile de France, France
S19, S20, S22, S23, S26, S36, S42, S44, S52, S53, S56	Turkey (*Meleagris gallopavo*), pulmonary aspergillosis	11/2007-04/2008	Poitou-Charentes, France
S40, S41	Pheasant (*Phasianus colchicus*), pulmonary aspergillosis	01/2008	Poitou-Charentes, France
E19, E20	Ducks (*Anas platyrhynchos*), asymptomatic carriage in pharynx	01/2008-04/2008	Sarthe, France
D3	Chicken (*Gallus gallus*), asymptomatic carriage in pharynx	02/2008-03/2008	Guangxi province, China
D42	Duck (*Anas platyrhynchos*), pulmonary aspergillosis	02/2008-03/2008	Guangxi province, China
V04M02253	Bustard (*Chlamydotis undulata*), asymptomatic carriage in trachea	01/2008-04/2008	Morocco
H50, H71, H100	Patients, pulmonary aspergillosis	12/2005-04/2008	Ile de France, France
CBS 144.89	Patient, invasive aspergillosis	-	France

The reproducibility of the method was assessed by the analysis of 8 isolates in 2 different units situated in two different buildings of the Animal Health Laboratory of ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Alimentation, Environnement, Travail) at Maisons-Alfort, France, and by 2 different technicians.

Discriminatory power

The discriminatory power was calculated by using the Simpson index of diversity (*D*):

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{s} n_j (n_j - 1)$$

where N is the total number of isolates in the test population (57 unrelated isolates), s is the total number of types described, and nj is the number of isolates belonging to the j^{th} type [17]. A D value of 1.0 indicates that the typing method is able to discriminate between all isolates. A D value of 0.0 indicates that all isolates are identical.

Clustering analysis

Amplicon size was determined with Bionumerics software package version 4.6 (Applied-Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium). The number of repeats in each allele was derived from the amplicon size. The size of flanking sequences was subtracted from the band size and the number was divided by the repeats size. The result of this calculation corresponded to the number of repeats. Data were analyzed with Bionumerics software as a character dataset. Two different techniques were used to represent the relationships between isolates [12]:

Table 2 Origin and period of collection for 277 epidemiologically related isolates of Aspergillus fumigatus

Isolates no	Samples	Period of collection	Geographic origin
E1-2, E5, E8-9, E10, E13-19, E21-23, E26, E29, E30, E32-34, E36-38, E40-45, E51-53, E57, E59-64, E69-70, E72, E74-75, E79, E82-83, E85-86, E90	Pharyngeal swabs from ducks (*Anas platyrhynchos*)	01/2008-04/2008	Farm A in Sarthe, France
E3-4, E6-7, E11-12, E20, E24-25, E27-28, E31, E35, E39, E46-50, E54-56, E58, E65-68, E71, E73, E76-78, E80-81, E84, E87-89, E91-95	Pharyngeal swabs from ducks (*Anas platyrhynchos*)	01/2008-04/2008	Farm B in Sarthe, France
D1-40, D59-66	Pharyngeal swabs from chickens (*Gallus gallus*)	02/2008-03/2008	Farm C in Guangxi province, China
D41-54	Pharyngeal swabs from ducks (*Anas platyrhynchos*)	02/2008-03/2008	Farm D in Guangxi province, China
G1-120	Air samples from a turkey hatchery	11/2008-03/2009	Hatchery in Maine et Loire, France

Thierry *et al. BMC Microbiology* 2010, **10**:315
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/315

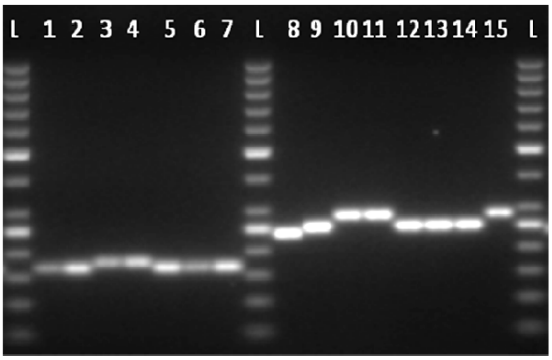


Figure 1 Electrophoretic gel showing VNTR profiles. Lanes 1 to 7 represent the amplification of 7 isolates for marker Asp_330 (11 bp repeat). Samples in lanes 1-2 and 5-7 have 3 repeats and samples in lanes 3-4 have 4 repeats. Lanes 8 to 15 represent the amplification of 8 other isolates for Asp_443 marker (18 bp repeat). Sample in lane 8 has 4 repeats, samples in lanes 9 and 12-14 have 5 repeats, samples in lanes 10-11 and 15 have 7 repeats.

(i) a phenogram using phenetic UPGMA method (Data not shown; (ii) a graphing algorithm termed Minimum Spanning Tree (MST). The priority rule for constructing MST was set in order that the type that had the highest number of single-locus variants (SLVs) would be linked first. A cutoff value of maximum differences of 2 VNTRs out of 10 was applied to define cluster in the MST method.

Results

Selection of VNTR markers

The use of the Tandem Repeat Finder software allowed the detection of 77 tandem repeats with a repeat unit larger than 9 bp. Putative VNTR markers were found in the 8 chromosomes of *A. fumigatus*. For the selection of markers, 2 criteria were used: a homology of more than 90% between the different repeats and a number of repeats higher than 3. Only 10 out of these markers were polymorphic in the 57 unrelated isolates. The 10 markers were located on 4 different chromosomes (1, 5, 6 and 8). Five VNTRs were on chromosome 1 (Asp_167, Asp_202, Asp_330, Asp_443 and Asp_446). VNTRs Asp_165, Asp_252 and Asp_345 were on chromosome 5. VNTRs Asp_204 and Asp_20 were on chromosome 6 and 8, respectively. Characteristics of final VNTRs and respective primer sets are listed in Table 2.

Considering that the genome of *A. fumigatus* is haploid, we excluded isolates presenting double-bands patterns, because these patterns could be explained by a mixture of genotypes. When mixtures were suspected, different colonies were separated and subcultured. Each colony genotype was characterized by a distinct MLVA pattern (data not shown). This result proved that double-bands patterns were due to mixtures of isolates.

Stability and reproducibility

The 60 samples (5 isolates subcultured 12 times in 2 months) used for the evaluation of stability were typed by MLVA and yielded exactly the same MLVA pattern.

The 16 samples used for the evaluation of reproducibility (8 isolates tested by 2 different technicians in 2 different laboratories) yielded exactly the same MLVA pattern.

Discriminatory power

Simpson diversity index was first calculated for each VNTR and for the panel of 10 markers tested on the 57 unrelated isolates. The index for individual markers ranged from 0.5771 to 0.8530 (Table 3). A combined loci index calculated with all of 10 markers yielded an index of 0.9994. When the VNTR profiles of 330 isolates were considered, the combined loci index was 0.9956.

Accessibility through the web

A database was created with the results of the present study http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/. On this website, it is possible to compare VNTR patterns with 300 different patterns included in the database using complete panel of markers or just a selection of them. This database also allows to build dendrograms with the query. All the possibilities provided by the website and database are explained by Grissa *et al.* [18].

Specificity

When VNTR primer sets were tested with DNA from *Aspergillus flavus*, *A. niger* and *A. nidulans* no amplification was observed. When VNTR primer sets were tested with DNA from *Aspergillus lentulus*, a species closely related to *A. fumigatus*, amplification was obtained with 3 out of 10 markers (Asp_167, Asp_202 and Asp_330). As a consequence the combination of 10 VNTRs should be considered as specific of *A. fumigatus*.

Clustering analysis

A total number of 330 *A. fumigatus* isolates were typed with the panel of 10 VNTRs. This analysis yielded 255 different genotypes. Only 33 genotypes were shared by two isolates or more.

UPGMA analysis did not allow a clear clustering of the isolates (data not shown). Some isolates (n = 12) were characterized by the insertion of a large sequence (about 450 bp) in VNTR Asp_20 whereas others (n = 6) had a very high number of repeats (from 10 to 17) in the VNTR Asp_202 and (from 10 to 15) in the VNTR Asp_330, exhibiting patterns which were not observed in the group of unrelated isolates (Table 3).

Thierry *et al. BMC Microbiology* 2010, **10**:315
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/315

Table 3 Characteristics of VNTR markers for fingerprinting of Aspergillus fumigatus

VNTR markers	Primer sequences (5' to 3')	Tm (°C)	Unit repeat size (bp)	Range of repeat number	Simpson diversity index*	Marker location (non coding region or name of gene if coding)
Asp 167	TGAGATGGTTAACTTACGTAGCGC CGCTCCCACCGTTACCAAC	59	12	4-8	0.7151	Chromosome 1 (GPI anchored serine-rich protein)
Asp 202	AGGATCACTGCCCTCAACCC CCGAAATCCGCGGGA	59	12	6-14	0.8530	Chromosome 1 (c-24(28) sterol reductase)
Asp 330	ATCTGGTCGCGAAATTCCTCT TCTTCGGCCTTTTCATCCC	58	11	2-8	0.7895	Chromosome 1 (non coding)
Asp 443	AAGCTTCGTCTGGCGAAGAG GCACGTGTACGGTGTTCCTG	58	18	0-7	0.6661	Chromosome 1 (ribosome assembly protein Noc2)
Asp 446	CGATCATGTTTGCCTGAGGA CCGACAGCATCGAGCAACTA	59	21	1-4	0.5971	Chromosome 1 (non coding)
Asp 165	TGATGGGCCGCAGTCG GCACCTGCTTGTCGATTCGT	60	10	0-6	0.7296	Chromosome 5 (non coding)
Asp 252	CAGATTGGAGACACGAAGCG ACCACGGATTGCCAAGGA	58	12	2-6	0.5886	Chromosome 5 (non coding)
Asp 345	TCTCCAACCCTTCGGACG GCCGGAAGAGCATGAAGACA	58	11	1-6	0.5771	Chromosome 5 (non coding)
Asp 204	GATGCGGGAGGTGGGTC CGTCCTCACTTTTGCCTTGG	58	11	1-5	0.6128	Chromosome 6 (non coding)
Asp 20	GGGAAGAGAGGAACCGATCC CGCAGTGGGCAGTTTGAAT	58	10	0-4	0.7520	Chromosome 8 (non coding)

*Each index was calculated with the results from 57 unrelated *A. fumigatus* isolates

The graphing algorithm termed Minimum Spanning Tree (MST) demonstrated three major clusters of isolates (Figure 2). The first cluster comprised 91 out of 95 avian isolates (95%) collected in the two duck farms in Sarthe department in France. The second cluster comprised 42 out of 62 avian isolates (70%) collected in poultry farms in Guangxi province in China and the third cluster comprised 90 out of 120 environmental isolates (75%) from the turkey hatchery in Maine-et-Loire department in France. In the dendrogram, genotypes corresponding to unrelated isolates are clearly separated.

Discussion

Typing *A. fumigatus* isolates may help to improve the understanding of the distribution of this major pathogen in different situations and environments, including susceptible birds in poultry farms. This molecular approach may also give a deeper understanding of the colonization pattern of putative hosts. To date, it is still a matter of controversy whether certain isolates are more virulent and genetically distinct from other isolates, or whether infection by *A. fumigatus* is simply a matter of contracting infection from any environmental source.

The choice of a specific typing technique depends on the scientific questions and the equipment of the laboratory. Many different techniques have already been described for *A. fumigatus*: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) [19], Restriction Enzyme Analysis (REA) [20], Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) [21], Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) [22], Microsatellite Length Polymorphism (MLP) [23-27] and Multilocus Sequence Typing (MLST) [28]. CSP typing is a recently developed typing strategy that involves DNA sequence typing of a repetitive region of the *A. fumigatus* AFUA_3G08990 gene coding for a Cell Surface Protein, designated the CSP locus [29,30]. All of these typing techniques were developed in order to resolve closely related isolates for the purposes of outbreak investigation in hospitals and disease surveillance in humans. RFLP (with Afut1 probe) and MLP typing methods were proved to be highly discriminant. Furthermore MLP showed high reproducibility because of the unambiguous data. For these reasons, MLP method is now considered as the gold standard for the analysis of epidemiological relationships between large amounts of *A. fumigatus* isolates over a long period of time in hospitals. Another method with high reproducibility is MLST, but the loci described so far for *A. fumigatus* are probably not discriminant enough to identify the source of an outbreak situation. The RAPD method was used in many investigations probably because it requires simple equipment and no genomic sequence information, but it suffered from limited discriminatory power and reproducibility.

In the present study, a molecular typing method for *A. fumigatus* based on the study of 10 VNTR markers with repeat size larger than 9 bp was developed and further

Thierry *et al. BMC Microbiology* 2010, **10**:315
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/315

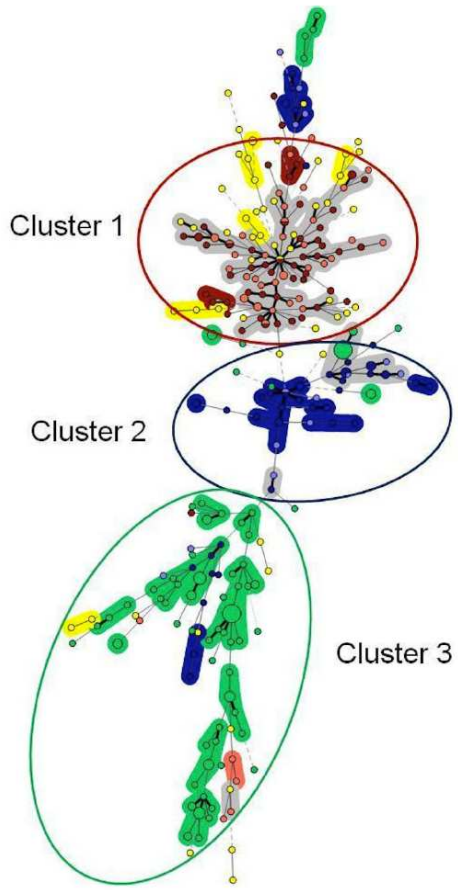


Figure 2 Minimum spanning tree of 330 *A. fumigatus* isolates based on categorical analysis of 10 VNTRs. Each circle represents a unique genotype. The diameter of each circle corresponds to the number of isolates with the same genotype. Genotypes connected by a shaded background differ by a maximum of 2 of the 10 VNTR markers and could be considered a "clonal complex". Thick connecting lines represent one marker difference; regular connecting lines represent two marker differences; thick interrupted lines represent three differences; thin interrupted lines represent four or more differences. The length of each branch is also proportional to the number of difference. Each epidemiological situation is represented by a specific colour: red for isolates collected during an epidemiological survey conducted in the same duck farm in 2007 and 2008 in Sarthe region, France; salmon pink for isolates collected during an epidemiological survey conducted in another single duck farm in 2007 and 2008 in Sarthe region, France; navy blue for isolates collected during an epidemiological survey in a chicken farm in 2008 in Guangxi province, China; light blue for isolates collected during an epidemiological survey in a duck farm in 2008 in Guangxi province, China; green for environmental isolates collected in 2009 in a turkey hatchery in Maine et Loire region, France and yellow for unrelated isolates. Large ellipses correspond to the three major clusters (with the colour of the majority of the genotypes).

applied to 277 isolates from birds or from the environment. The MLVA typing method proved highly discriminant with a Simpson's diversity index of 0.9994. This value was obtained with unrelated isolates from animals or humans and was exactly the same as that obtained with isolates from humans using microsatellite markers [25]. Size differences between alleles of the 10 selected VNTRs were large enough to allow efficient sizing on agarose gel. This makes the present MLVA scheme easy to implement in laboratories possessing basic molecular biology equipment. The method showed a good reproducibility, which could be increased by the production of an internal ladder (including an example of each allele amplicon size) or the use of capillary electrophoresis [31]. The MLVA was shown to be rapid and very discriminant. Performing monoplex amplifications, like in the present study, leads to more effort than using multiplex amplifications. In future development of the MLVA technique, the combination of two or more VNTR amplifications in a single reaction tube should be tested.

For the clustering analysis of VNTR profiles, we used a graphing algorithm termed minimum spanning tree (MST). This method was introduced to improve analysis of VNTR profiles [15]. Similar to maximum-parsimony phylogenetic tree reconstruction methods, MST constructs a tree that connects all the genetic profiles in such a way that the summed genetic distance of all branches is minimized. The differences in mathematical approach between MST and UPGMA methods may account for the changes in isolates clustering. Thus, MST allowed to group *A. fumigatus* isolates which were unclustered with UPGMA. A first cluster included most of the isolates from birds in France whereas the second included most of the isolates from birds in China (Figure 2). The third cluster included most of the environmental isolates collected in a hatchery in France. As a consequence, MST results clearly reflected the geographic origin of the isolates. However, the clustering did not allow the separation of isolates collected from birds living in two different farms in the same department (in France) or province in China. This suggests that geographic clustering occurs at the scale of large areas. The distance between the two farms in Sarthe department in France or in Guangxi province was 20 km and 30 km, respectively. The mean distance between the two farms in Sarthe department and the hatchery in Maine-et-Loire was 120 km. To confirm the geographic clustering and evaluate the minimum size of geographic clusters, additional samples from other origins should be included. We should also collect environmental isolates near the poultry farms in Sarthe department or

Guangxi province and avian isolates near the hatchery in Maine-et-Loire department. Geographic clustering of *A. fumigatus* isolates using repeat sequence analysis with the CSP method, was suggested by Balajee in 2007 [29]. Recently, another study using the AFLP method showed a geographic structuration of *A. fumigatus* isolates [32].

Conclusions

The present study allowed to describe 10 VNTR markers, applicable in the typing of the major fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. The loci in this VNTR assay were highly discriminating and stable over time. The typing method could be used for molecular epidemiological studies of *A. fumigatus* in different situations including avian farms and hospitals where outbreaks of invasive aspergillosis may occur. Furthermore, data obtained by the present method could be easily shared in a web database

Acknowledgements

ST is a PhD student supported by the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES). DW has received a grant from the French Ambassy in the People's Republic of China. This research was supported by Pfizer company. The authors would like to thank Guillaume Le Loc'h and Alexandre Alanio for providing avian isolates from Morocco and human isolates from Henri Mondor Hospital, respectively.

Author details

[1]ANSES, UMR BIPAR, Ecopham, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Maisons-Alfort, France. [2]Parasitology department, College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning, China. [3]ENVA, UMR BIPAR, Ecopham, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France. [4]Université Paris Sud 11, CNRS, UMR 8621, Institut de Génétique et Microbiologie, Orsay 91405, France. [5]ANSES, Bacterial Zoonoses Unit, Maisons-Alfort, France. [6]UPE, UMR BIPAR, Ecopham, Faculté de Médecine de Créteil, France.

Authors' contributions

ST, PA, CP, RC, WH and JG participated in the design of the study, participated in the phylogenetic analysis and draft the manuscript. ST, DW, MD, BDB and AN participated in the molecular studies. KL helped in the collection of isolates from poultry farms in France and participated in the design of the study. DW collected isolates from poultry farms in China. FB participated in draft of the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Received: 7 July 2010 Accepted: 8 December 2010
Published: 8 December 2010

References

1. Arca-Ruibal B, Wernery U, Zachariah R, Bailey TA, Di Somma A, Silvanose C, McKinney P: **Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons.** *Vet Rec* 2006, **158**(13):442-444.
2. Ghori HM, Edgar SA: **Comparative susceptibility of chickens, turkeys and *Coturnix* quail to aspergillosis.** *Poult Sci* 1973, **52**(6):2311-2315.
3. Tell LA: **Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine.** *Med Mycol* 2005, **43**(Suppl 1):S71-73.
4. Vergnaud G, Denoeud F: **Minisatellites: mutability and genome architecture.** *Genome Res* 2000, **10**(7):899-907.
5. Laroucau K, Thierry S, Vorimore F, Blanco K, Kaleta E, Hoop R, Magnino S, Vanrompay D, Sachse K, Myers GS, Bavoil PM, Vergnaud G, Pourcel C: **High resolution typing of *Chlamydophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA).** *Infect Genet Evol* 2008, **8**(2):171-181.
6. Laroucau K, Vorimore F, Bertin C, Mohamad KY, Thierry S, Hermann W, Maingourd C, Pourcel C, Longbottom D, Magnino S, Sachse K, Vretou E, Rodolakis A: **Genotyping of *Chlamydophila abortus* strains by multilocus VNTR analysis.** *Vet Microbiol* 2009, **137**(3-4):335-344.
7. Le Fleche P, Fabre M, Denoeud F, Koeck JL, Vergnaud G: **High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing.** *BMC Microbiol* 2002, **2**:37.
8. Le Fleche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramisse V, Sylvestre P, Benson G, Ramisse F, Vergnaud G: **A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*.** *BMC Microbiol* 2001, **1**:2.
9. Pourcel C, Andre-Mazeaud F, Neubauer H, Ramisse F, Vergnaud G: **Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*.** *BMC Microbiol* 2004, **4**:22.
10. Pourcel C, Hormigos K, Onteniente L, Sakwinska O, Deurenberg RH, Vergnaud G: **Improved multiple-locus variable-number tandem-repeat assay for *Staphylococcus aureus* genotyping, providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value.** *J Clin Microbiol* 2009, **47**(10):3121-3128.
11. Schouls LM, van der Heide HG, Vauterin L, Vauterin P, Mooi FR: **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* 2004, **186**(16):5496-5505.
12. Wang YW, Watanabe H, Phung DC, Tung SK, Lee YS, Terajima J, Liang SY, Chiou CS: **Multilocus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing and phylogenetic analysis of *Shigella flexneri*.** *BMC Microbiol* 2009, **9**:278.
13. Grenouillet F, Millon L, Bart JM, Roussel S, Biot I, Didier E, Ong AS, Piarroux R: **Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for rapid typing of *Candida glabrata*.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**(11):3781-3784.
14. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA: ***Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*.** *Eukaryot Cell* 2005, **4**(3):625-632.
15. Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA: **Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping.** *Eukaryot Cell* 2006, **5**(10):1705-1712.
16. Benson G: **Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**(2):573-580.
17. Hunter PR, Gaston MA: **Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity.** *J Clin Microbiol* 1988, **26**(11):2465-2466.
18. Grissa I, Bouchon P, Pourcel C, Vergnaud G: **On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing.** *Biochimie* 2008, **90**(4):660-668.
19. Aufauvre-Brown A, Cohen J, Holden DW: **Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*.** *J Clin Microbiol* 1992, **30**(11):2991-2993.
20. Denning DW, Clemons KV, Hanson LH, Stevens DA: **Restriction endonuclease analysis of total cellular DNA of *Aspergillus fumigatus* isolates of geographically and epidemiologically diverse origin.** *J Infect Dis* 1990, **162**(5):1151-1158.
21. Spreadbury CL, Bainbridge BW, Cohen J: **Restriction fragment length polymorphisms in isolates of *Aspergillus fumigatus* probed with part of the intergenic spacer region from the ribosomal RNA gene complex of *Aspergillus nidulans*.** *J Gen Microbiol* 1990, **136**(10):1991-1994.
22. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M: **AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.** *Nucleic Acids Res* 1995, **23**(21):4407-4414.
23. Balajee SA, de Valk HA, Lasker BA, Meis JF, Klaassen CH: **Utility of a microsatellite assay for identifying clonally related outbreak isolates of *Aspergillus fumigatus*.** *J Microbiol Methods* 2008, **73**(3):252-256.
24. Bart-Delabesse E, Humbert JF, Delabesse E, Bretagne S: **Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates.** *J Clin Microbiol* 1998, **36**(9):2413-2418.
25. de Valk HA, Meis JF, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen CH: **Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(8):4112-4120.
26. de Valk HA, Meis JF, de Pauw BE, Donnelly PJ, Klaassen CH: **Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of**

multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2007, **45**(5):1415-1419.
27. Garcia-Hermoso D, Cabaret O, Lecellier G, Desnos-Ollivier M, Hoinard D, Raoux D, Costa JM, Dromer F, Bretagne S: **Comparison of microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing for DNA-Based typing of *Candida albicans*.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**(12):3958-3963.
28. Bain JM, Tavanti A, Davidson AD, Jacobsen MD, Shaw D, Gow NA, Odds FC: **Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**(5):1469-1477.
29. Balajee SA, Tay ST, Lasker BA, Hurst SF, Rooney AP: **Characterization of a novel gene for strain typing reveals substructuring of *Aspergillus fumigatus* across North America.** *Eukaryot Cell* 2007, **6**(8):1392-1399.
30. Klaassen CH, de Valk HA, Balajee SA, Meis JF: **Utility of CSP typing to sub-type clinical *Aspergillus fumigatus* isolates and proposal for a new CSP type nomenclature.** *J Microbiol Methods* 2009, **77**(3):292-296.
31. de Valk HA, Meis JF, Bretagne S, Costa JM, Lasker BA, Balajee SA, Pasqualotto AC, Anderson MJ, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Klaassen CH: **Interlaboratory reproducibility of a microsatellite-based typing assay for *Aspergillus* fumigatus through the use of allelic ladders: proof of concept.** *Clin Microbiol Infect* 2009, **15**(2):180-187.
32. Duarte-Escalante E, Zuniga G, Ramirez ON, Cordoba S, Refojo N, Arenas R, Delhaes L, Reyes-Montes Mdel R: **Population structure and diversity of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from different sources and geographic origins.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, **104**(3):427-433.

doi:10.1186/1471-2180-10-315
Cite this article as: Thierry *et al.*: Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing of *Aspergillus fumigatus*. *BMC Microbiology* 2010 **10**:315.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

2.2. Application de la technique de typage dans un couvoir de dindes

2.2.1. Introduction

Cent vingt isolats ont été collectés lors d'une enquête épidémiologique au sein d'un couvoir spécialisé dans la production de dindonneaux (*Meleagris gallopavo*).

L'accouvage de dinde se déroule en plusieurs étapes. Les œufs à couver produits par les reproducteurs dans les élevages de multiplication sont livrés et mis en attente dans une zone de stockage pour une durée maximale d'une semaine à basse température. Ils sont ensuite transférés vers la zone d'incubation maintenue à 37,8°C pour une durée de 25 jours. C'est pendant cette phase que l'embryon se développe. Trois jours environ avant l'éclosion les œufs sont déplacés dans des éclosoirs qui constituent le secteur sale du couvoir, où ils resteront jusqu'au stade dindonneau d'un jour.

La structure concernée produit annuellement plus de 30 millions de dindonneaux. L'industriel par la mise en place d'auto-contrôles systématisés enregistre une contamination faible mais régulière de ses éclosoirs par *A. fumigatus*. Cette contamination a lieu malgré les procédures de décontamination, notamment antifongique, des locaux et des matériels entre chaque session d'éclosions. Un système de marche en avant du personnel, du matériel et même de l'air empêche la circulation des contaminants.

Les éclosoirs sont regroupés en quatre salles contenant chacune entre 10 et 20 éclosoirs. Une enquête épidémiologique a été mise en place et a permis la collecte de prélèvements au sein des salles d'éclosoirs (figure 37).

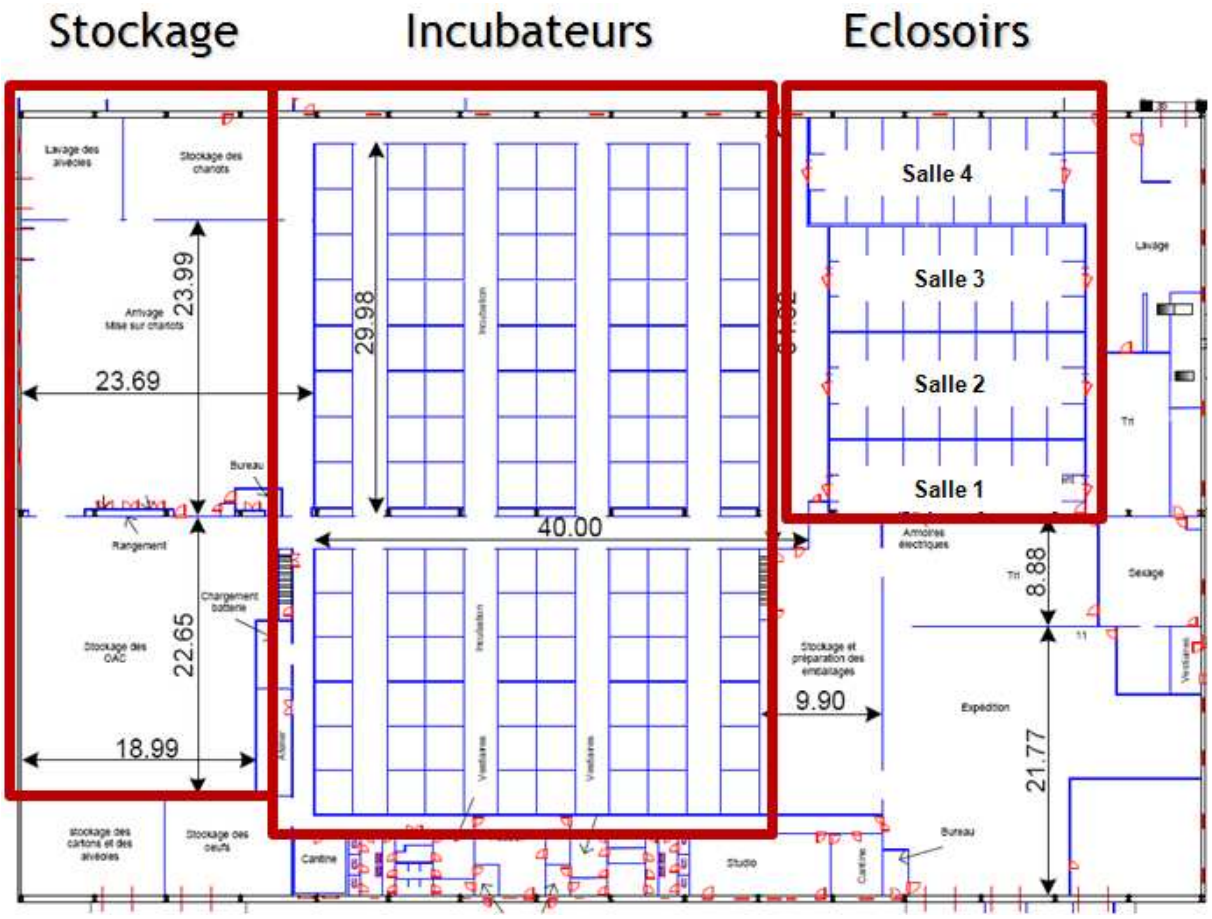


Figure 37. Plan du couvoir où l'analyse épidémiologique a été réalisée. Les prélèvements ont été effectués dans les 4 salles des éclosoirs.

2.2.2. Matériels et méthodes

Des prélèvements d'air par sédimentation sur boîtes de Petri (milieu malt chloramphénicol) ont été réalisés dans 4 salles contenant chacune entre 10 et 20 éclosoirs. Les boîtes de Petri ont été laissées ouvertes durant 15 minutes puis refermées et mises à incuber à 37°C de 2 à 7 jours. Lorsque moins de 5 colonies étaient observées sur la boîte, une seule était isolée et quand ce nombre était supérieur ou égal à 5, alors 3 colonies étaient isolées.

Ces prélèvements ont été effectués toutes les semaines pendant 6 mois et ont permis de collecter 118 isolats d'*A. fumigatus* au total. Deux isolats proviennent de poumons de dindonneaux issus du couvoir et morts d'aspergillose dans deux élevages différents.

Tous les isolats ont été traités selon la méthode MLVA décrite précédemment.

2.2.3. Résultats et discussion

Les 118 isolats proviennent de 4 salles différentes. Le nombre d'isolats n'est pas le même dans les 4 salles : 50 isolats proviennent de la salle 2 ; pour les autres salles, le nombre d'isolats est plus faible : 20 pour la salle 1, 29 pour la salle 3 et 19 pour la salle 4.
La distribution des isolats entre les salles semble indiquer une plus forte contamination de la salle 2. Ce niveau de contamination est sans doute dû au dysfonctionnement du système d'aération de cette salle. La stagnation de l'air pourrait être un élément favorisant l'aérocontamination par des spores d'*A. fumigatus*.

L'analyse MLVA a permis de distinguer 67 génotypes différents, dont 15 sont partagés par 2 isolats ou plus. Les génotypes ont été analysés grâce au logiciel Bionumerics et des dendrogrammes (*Minimum Spanning Trees*) ont été générés (figures 38-40). L'analyse des dendrogrammes permet de répondre à plusieurs questions épidémiologiques en lien avec la contamination récurrente du couvoir. La première de ces questions porte sur l'efficacité du protocole de désinfection, hebdomadaire mis en place entre chaque série d'éclosion. Un arbre généré en fonction des dates de prélèvements n'a montré aucun lien entre les génotypes, ce qui signifie qu'aucun génotype n'a été retrouvé avant et après la désinfection (figure 38). Il semble donc que le protocole de désinfection soit efficace et que la contamination récurrente soit liée à l'introduction de nouveaux isolats plus qu'à leur persistance dans les salles.

Figure 38. Distribution des génotypes en fonction de la date de collecte des isolats dans la salle 3.

L'analyse de la circulation des isolats dans le bâtiment est également un point essentiel à considérer sur le plan de la biosécurité. Pour cela un MST a été généré en fonction des salles dans lesquelles ont été collectés les isolats (figure 39). Cet arbre montre que les génotypes, dans leur grande majorité, n'ont été isolés que dans une seule salle. Seuls 4 génotypes ont été isolés dans deux salles conjointement.

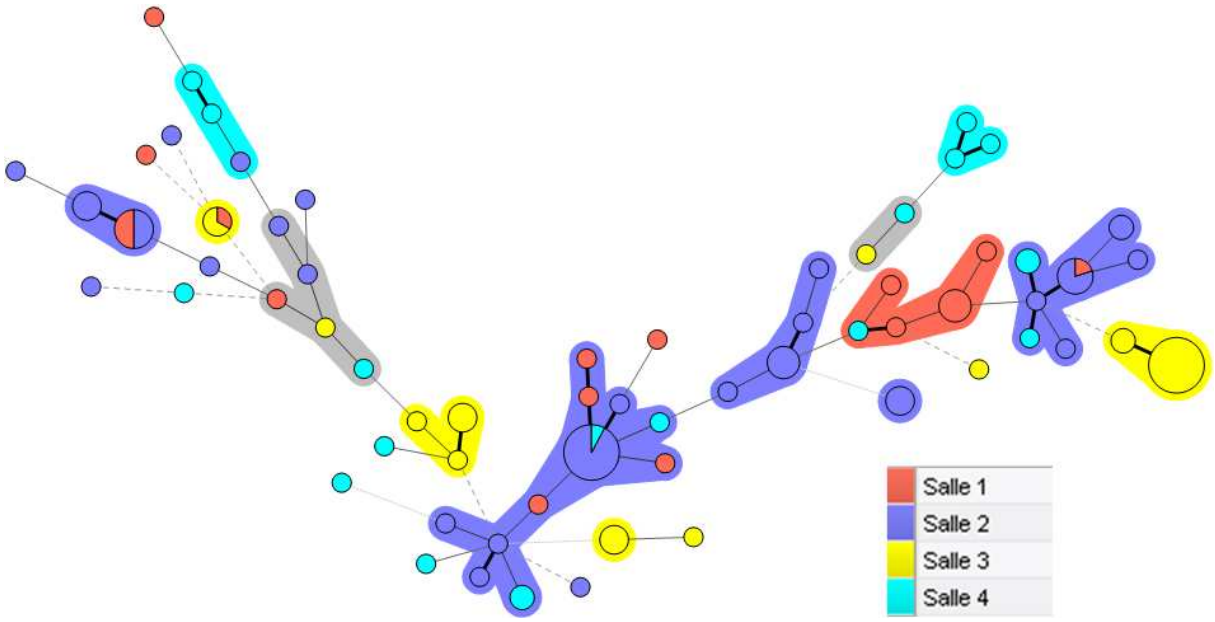


Figure 39. Distribution des génotypes en fonction des salles.

Pour rendre compte de cette communauté d'isolats, plusieurs hypothèses peuvent être évoquées. La première est qu'une circulation d'air et donc de spores existe entre les salles. Cependant cette hypothèse s'avère peu probable après étude des plans du couvoir et étant donné le système d'aération de type « marche en avant ». La seconde hypothèse serait une origine commune à ces isolats qui ensuite se seraient dispersés dans les salles d'éclosoirs. Cette hypothèse est appuyée par la présence d'une pièce en amont des éclosoirs par rapport au système d'aération. Cette pièce est la salle de tri dans laquelle les œufs sont mirés et triés avant d'être mis à incuber dans les éclosoirs ou écartés. Une forte possibilité de contamination initiale de cette pièce est évoquée car la présence d'appareillages ne permet pas d'y effectuer un protocole de décontamination aussi efficace que dans les éclosoirs. Une contamination par *A. fumigatus* y est donc probable.

Enfin, une question importante pour le couvoir fut de savoir si la contamination du couvoir pouvait être responsable d'aspergilloses chez les dindonneaux une fois arrivés dans les élevages. Pour cela nous avons testé deux isolats provenant de dindonneaux. Les deux génotypes de ces isolats s'avèrent proches mais différents de ceux isolés dans le couvoir à la même période (figure 40).

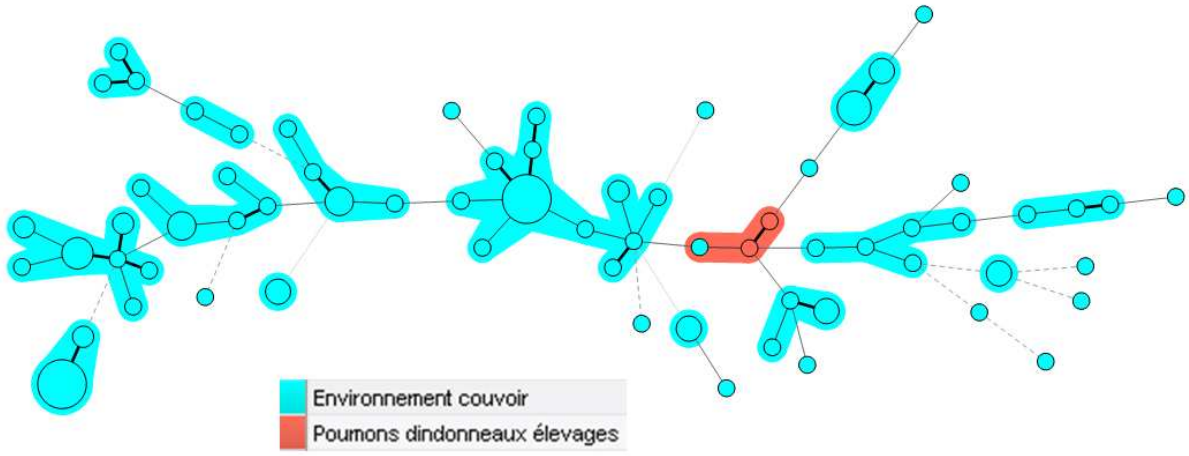


Figure 40. Comparaison des génotypes issus du couvoir et de ceux qui correspondent aux isolats provenant des élevages.

Notre échantillonnage au sein du bâtiment n'étant certainement pas exhaustif, nous ne pouvons certifier que ces isolats proviennent ou non du couvoir. Cependant, les deux génotypes retrouvés chez les oiseaux d'élevage sont très proches l'un de l'autre (un seul marqueur de différence). De plus, bien que différents des génotypes isolés dans le couvoir, ces profils en sont tout de même assez proches. Le typage de nombreux isolats d'*A. fumigatus* au sein de notre laboratoire tend a montrer un regroupement des génotypes MLVA en fonction de leur origine géographique (Thierry *et al.*, 2010). La proximité génotypique de tous les isolats testés ici, y compris ceux issus des élevages, suggèrent donc une origine géographique commune. Cependant, n'ayant pas d'information sur la distance séparant les élevages du couvoir il est difficile d'interpréter ce regroupement.

3. Le typage de *Chlamydophila psittaci* par MLVA

Article 2

High resolution typing of *Chlamydophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA)

Publié le 17 décembre 2007 dans Infection, Genetics and Evolution

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Infection, Genetics and Evolution 8 (2008) 171–181
Infection, Genetics and Evolution
www.elsevier.com/locate/meegid

High resolution typing of *Chlamydophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA)

Karine Laroucau [a,*], Simon Thierry [a], Fabien Vorimore [a], Kinndle Blanco [b], Erhard Kaleta [b], Richard Hoop [c], Simone Magnino [d], Daisy Vanrompay [e], Konrad Sachse [f], Garry S.A. Myers [g], Patrik M. Bavoil [h], Gilles Vergnaud [i,j], Christine Pourcel [i]

[a] *Bacterial Zoonoses Unit, French Food Safety Agency (AFSSA), 94706 Maisons-Alfort cedex, France*
[b] *Clinic for birds, reptiles, amphibian and fish, Frankfurter Strasse 91-93, 35392 Giessen, Germany*
[c] *University of Zurich, Institute of Veterinary Bacteriology, 8057 Zurich, Switzerland*
[d] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", National Reference Laboratory for Animal Chlamydioses, Sezione Diagnostica di Pavia, Strada Campeggi 61, 27100 Pavia, Italy*
[e] *University of Ghent, Department of Molecular Biotechnology, 9000 Ghent, Belgium*
[f] *Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), Institute of Molecular Pathogenesis, Naumburger Street 96a, 07743 Jena, Germany*
[g] *University of Maryland, Institute for Genome Sciences, Baltimore, MD, 21201 USA*
[h] *University of Maryland, Department of Biomedical Sciences, 650 West Baltimore Street, Baltimore, MD 21201, USA*
[i] *Université Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, 91405 Orsay, France*
[j] *Centre d'Etudes du Bouchet, Division de Microbiologie Analytique, 91710 Vert le Petit, France*

Received 10 July 2007; received in revised form 6 December 2007; accepted 7 December 2007
Available online 17 December 2007

Abstract

A multilocus VNTR analysis (MLVA) system for detection of tandem repeats across the whole genome of *Chlamydophila psittaci* has been developed. Twenty selected genetic loci were initially tested on 9 avian reference strains including representatives of all major serotypes (A to F). Thereafter, 8 loci were retained for a more complete study performed on over 150 *C. psittaci* isolates from different bird species and geographical origins. Comparative analysis of the MLVA results and those obtained from currently available methods including serotyping and/or *omp*A sequencing indicate that the MLVA system provides an additional level of discrimination, with 20 distinct patterns identified to date.

The newly developed MLVA system therefore provides a highly sensitive, high resolution test for the differentiation of *C. psittaci* isolates from different origins that is suitable for molecular epidemiological studies.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Chlamydophila psittaci*; MLVA typing

1. Introduction

Avian chlamydiosis is a well-recognised zoonotic disease with worldwide dissemination that is caused by the small, Gram-negative and obligatory intracellular bacterium *Chlamydophila psittaci*, a member of the family *Chlamydiaceae*.

Transmission of *C. psittaci* from birds to humans is reported regularly, particularly in high risk individuals such as veterinarians, bird breeders and animal shopkeepers (Hinton et al., 1993; Huminer et al., 1992, 1988; Kaibu et al., 2006; Saito et al., 2005). Most infections occur through inhalation of an infectious aerosol when an infected animal and/or contaminated material is handled. Contaminated faeces and feathers are assumed to play an essential role in zoonotic transmission from flocks to humans. In humans, the signs of disease (termed psittacosis) are variable, ranging from no clinical signs at all to severe systemic disease (Andersen and Vanrompay, 2000).

Abbreviations: MLVA, Multiple Locus VNTR Analysis; MOMP, Major Outer Membrane Protein; VNTR, Variable Number of Tandem Repeats.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 49 77 13 00; fax: +33 1 49 77 13 44.
E-mail address: k.laroucau@afssa.fr (K. Laroucau).

1567-1348/$ – see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.meegid.2007.12.002

In *aves*, chlamydial infection was found to occur in more than 467 bird species belonging to 30 different orders (Kaleta and Taday, 2003). The avian infection is usually systemic and occasionally fatal. Clinical signs vary greatly in severity depending on the species and age of the bird, as well as the infectious strain of *C. psittaci* (Andersen, 1997).

Avian strains of *C. psittaci* have been subdivided by serological typing into at least 6 serotypes designated A through F (Andersen, 1991, 1997; Vanrompay et al., 1993). It is interesting to note that certain serotypes are most frequently isolated from specific hosts. These include serotype A isolated mostly from psittacine birds, serotype B from pigeons, serotype C from ducks, serotype D from turkeys, serotype E from pigeons and ratites, and serotype F from psittacine birds (Andersen, 1991, 1997; Vanrompay et al., 1993). To date, strains from all serotypes appear to be transmissible to humans (Andersen and Vanrompay, 2000; Heddema et al., 2006). Besides, 2 other known serovars of *C. psittaci* isolated from mammals also exist. Their representative strains were isolated form a muskrat (M56) and a Wolfsen cattle (WC).

Identification of the *C. psittaci* serotype cannot always be performed directly on clinical samples. These may contain insufficient antigen, such that isolation by culture may be required. Moreover, the necessary serotype-specific monoclonal antibodies (mAbs) are not currently commercially available. Genotyping methods based on *omp*A, encoding the major outer membrane protein, MOMP, are also commonly used. PCR coupled with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of *omp*A can be performed rapidly with relatively high success of target sequence amplification. Results from these tests usually show a high level of agreement with serotyping, with non-concordant results reported occasionally (Sudler et al., 2004; Van Loock et al., 2003; Vanrompay et al., 1997). Direct sequence analysis of *omp*A has also been suggested as an alternative method to discriminate among isolates, particularly in cases where serotyping and PCR-RFLP fail owing to specific point mutations in *omp*A (Geens et al., 2005). Using this method, a new genotype, named E/B, has been recently described (Geens et al., 2005). In view of the many limitations and pitfalls of these methods however, the development of new, highly discriminatory methods for molecular epidemiology studies of *C. psittaci* infection is direly needed.

With the increasing availability of whole bacterial genome sequences, new molecular tools based on genome-wide screens are currently being developed. The typing method termed Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) Analysis (MLVA) is based on the detection of tandem repeat polymorphisms (Vergnaud and Pourcel, 2006) and has been used successfully for typing many pathogens including *Mycobacterium tuberculosis* (Le Fleche et al., 2002), *Bacillus anthracis* (Le Fleche et al., 2001), and *Yersinia pestis* (Pourcel et al., 2004).

The aim of the present study was to explore the potential of MLVA for revealing the molecular diversity among *C. psittaci* isolates and to assess its usefulness for future epidemiological investigations.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and isolates

Strains and DNA samples were obtained from AFSSA (Maisons-Alfort, France), Friedrich-Loeffler-Institut (Jena, Germany), the Clinic for Birds, Reptiles, Amphibians and Fish (Giessen, Germany), the University of Zurich (Switzerland), the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Pavia, Italy) and the University of Ghent (Belgium).

Representative "reference" chlamydial strains from AFSSA (Table 1) were propagated in the yolk sac of chicken embryos and DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France).

2.2. Molecular analysis

PCR-RFLP typing was performed as previously described (Sayada et al., 1995).

For the VNTR amplifications, PCR were performed in a total volume of 15 μl containing 5–10 ng of DNA, 1 × PCR reaction buffer, 1 U of Hot start Taq DNA polymerase (Qiagen), 200 μM of each deoxynucleotide triphosphate, and 0.3 μM of each flanking primer. Primers designed based on the complete genome sequence of *C. psittaci* 6BC (G. Myers, unpublished) are listed in Table 2. The initial denaturation step at 95 °C for 15 min was followed by 40 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 30 s, primer annealing at 57 or 60 °C for 30 s depending on the primers, and elongation at 72 °C for 45 s. The final extension step was at 72 °C for 10 min. Five microliters of amplification product were loaded onto a 4% Metaphor/standard (50–50) agarose. Gels stained with ethidium bromide were visualized under UV light, and photographed. The size marker used was a 100 bp ladder (Mbi, Euromedex, France).

2.3. Data analysis

Amplicon size was determined manually. The number of motifs in each allele was derived from the amplicon size. The resulting data were analysed with Bionumerics software package version 4.6 (Applied-Maths, Saint-Martens-Latem,

Table 1
Reference *C. psittaci* strains used in this study

Strains	Serovar	Host	Origin
6BC	A	Parakeet	USA
VS1	A	Parakeet	USA
CP3	B	Pigeon	USA
L2A[a]	B	N/A	N/A
GR9	C	Duck	Europe
NJ1	D	Turkey	USA
TT3	D	Turkey	USA
Cal10	E	Ferret	USA
VS225	F	Parakeet	USA

N/A: not available.
[a] Isolate initially typed as *C. trachomatis* by error.

Table 2
Primers used in this study

VNTR	Forward primer	Reverse primer	Tm (°C)	Repeat Unit (bp)	*C. psittaci* 6BC repeat number	Whole amplified *C. psittaci* 6BC fragment size
ChlaPsi_02	GTCATCCCTGTTTGTTGAAGG	CTTCCTTCGGTGCAGCTTTAT	57	12	3	123
ChlaPsi_11	AGCTGTAGGGTCAATGGAACA	CATGATCATCTTGCGGATCAAG	57	10	3	138
ChlaPsi_26	CACCTGAAACTGTTTTCGGTC	CCATACGGAGAACAGTCTTGT	57	15	6	252
ChlaPsi_177	ATGGGCTCGTAGCTGAGGTA	CGAGTGAATATAGACGAAGGTG	60	24	3	168
ChlaPsi_222	GCACTCTCATATCCTATTGAAGTG	GATGACAGCGGAACAACATACA	60	6	6	203
ChlaPsi_280	TCAGATAGACTAGGTAATCCTG	CTCCCTCTACCACAATTGCCTA	60	180	3	647
ChlaPsi_281	AAGATATGCAGGTGAGCCTG	ACACAGCACAAGTGACCCCA	57	18	4	134
ChlaPsi_363b	CCTGCGCGTATTATCATGCAT	AGCGGATAACCGCTTCTTCTT	57	28	2	298
ChlaPsi_462	GGGGAAATGAAAATGTTAGG	TGCTTGTGGCATGACATAGCAG	60	129	3	479
ChlaPsi_480	AGTTTGCAAAGGAGCCGCTGCA	CCTTTCTCCACCTCTTTCTTTC	60	36	6	337
ChlaPsi_557	GTAAGACTAGGGTGCACACAA	GCCTTTCCCCTCTATTCTTTC	57	12	4	135
ChlaPsi_605	CTATAATTCCGCGTTGATTTG	AAACTCGTGAAGCTTAATCCCC	60	42	2	194
ChlaPsi_621	TATAGGAGCTTTGCGCACCCC	GACACGAGGCGTGTATCATT	57	9	3	109
ChlaPsi_705	ACTCGTCTTAAGTACACCTCC	GAGAAGTATTACTATGCGCTGG	57	21	2	136
ChlaPsi_810	TGAAAGGCTACTCGCAATATC	GGCGATAAATACTATGGATACC	60	63	4	519
ChlaPsi_929	CACGGACCCCTAAATTTTCTGG	TCCGGGAACTCAGGAGCAATAA	57	9	3	151
ChlaPsi_967	TGCCTATCCTGCGAAGGTTT	TCTCCAACAGCGAGCCGTTT	57	6	5	120
ChlaPsi_1155	TGAAGTGGTCGAAGAAGCGG	CAAGCTTCTCGAGAAGTCTG	57	12	3	105
ChlaPsi_1172	AAACCGCTCATACTCAGTCTC	TAGCTGACTCAAATCAGCAGC	60	22	4	249
ChlaPsi_1778	GGCATTCCTGTAATATTCACACC	GAGGATGAAGGTAATGGCTTCG	57	9	3	101

Belgium) as a character dataset. Clustering analysis was done using the categorical parameter and the UPGMA coefficient.

3. Results

3.1. Selection of VNTRs for MLVA analysis

The availability of the whole genome sequence of one of the reference avian *C. psittaci* strains (strain 6BC) made it possible to search for tandem repeat sequences using the tandem repeat finder (TRF) program (http://www.tandem.bu.edu/trf/trf.html) (Benson, 1999). Twenty tandem repeats with a repeat unit equal to or larger than 6 bp were identified (Table 2). In order to evaluate polymorphisms within these potential markers, primers were chosen on both sides of the repeats and an initial set of 9 representative strains (from AFSSA) including all six avian serotypes (Table 1) was analysed by PCR amplification.

Results of fragment size gel analysis showed that 8 of the analysed tandem repeats, i.e. ChlaPsi_280, ChlaPsi_480, ChlaPsi_605, ChlaPsi_810, ChlaPsi_222, ChlaPsi_281, ChlaPsi_929 and ChlaPsi_1778, were polymorphic within this small representative strain collection (Fig. 1 and data not shown). Using these 8 VNTRs, it was possible to differentiate between the representative strains in good agreement with serotyping classification. However strains CP3 and Cal10, of serotypes B and E respectively, could not be distinguished by MLVA. Furthermore, one distinct pattern observed with ChlaPsi_280 differentiated strains 6BC and VS1, both of serotype A, while strains CP3 and L2A of serotype B were clearly differentiated with ChlaPsi_810. No amplification product was observed with ChlaPsi_929 for strain GR9.

The stability of the 8 selected markers was assessed by analysis of 6 reference *C. psittaci* strains (VS1, CP3, GR9, NJ1, CPMN, VS225) stored in a different laboratory (University of Ghent). Results were identical to those obtained initially except for the GR9 strain from Ghent which was successfully amplified with the marker ChlaPsi_929, generating an amplified fragment corresponding to 3 tandem repeats (Fig. 2).

To assess the reproducibility of the MLVA analysis, the 9 reference *C. psittaci* strains (Table 1) were genotyped in

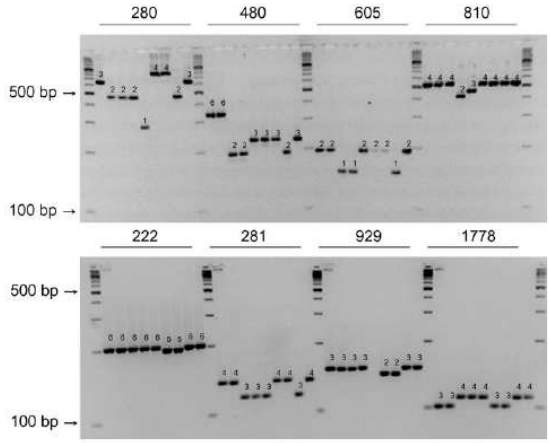


Fig. 1. PCR amplification of 8 VNTRs (ChlaPsi_280, ChlaPsi_480, ChlaPsi_605, ChlaPsi_810, ChlaPsi_222, ChlaPsi_281, ChlaPsi_929 and ChlaPsi_1778) using DNA from 9 reference *C. psittaci* strains (6BC, VS1, CP3, L2A, GR9, NJ1, TT3, Cal10, VS225) from the AFSSA strain collection. A 100 bp ladder (100–1000 bp) is run on both sides of each group of samples. The number of repeat units within each allele is indicated.

duplicates with the 8 selected markers in two distinct laboratories: AFSSA (Maisons-Alfort) and Institut de Génétique et Microbiologie (Orsay). Results were identical at both locations.

3.2. Typing of avian and mammalian C. psittaci isolates

The set of 8 markers was used to examine 170 *C. psittaci* isolates comprising isolates from different birds species as well

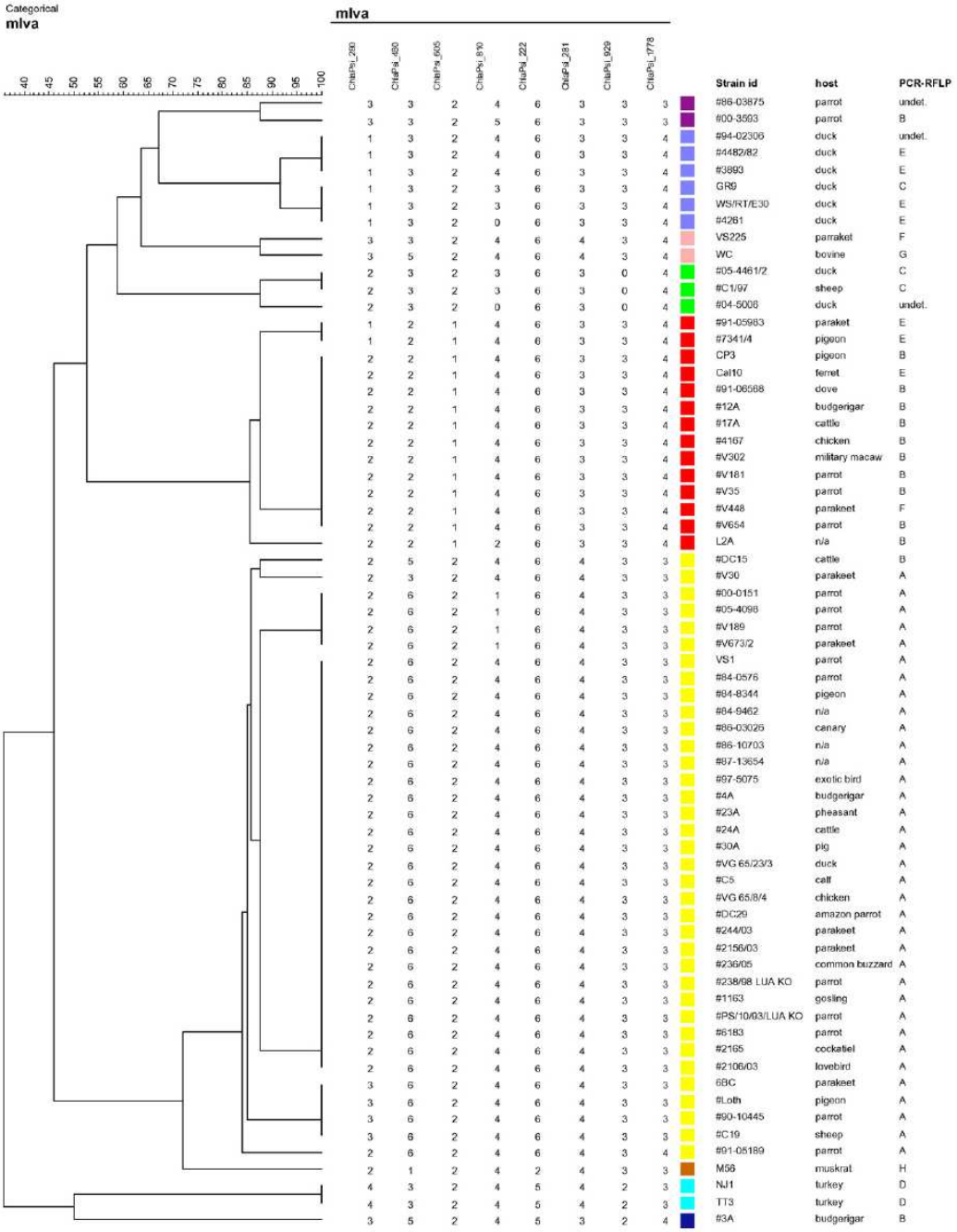


Fig. 2. Clustering analysis of 67 *C. psittaci* strains and isolates using markers ChlaPsi_280, ChlaPsi_480, ChlaPsi_605, ChlaPsi_810, ChlaPsi_222, ChlaPsi_281, ChlaPsi_929 and ChlaPsi_1778. Left to right: MLVA genotyping results with the 8 MLVA markers, strain identification, animal host and PCR-RFLP results (undet.: undetermined).

Table 3
C. psittaci isolates used for MLVA typing

Key	Strain id	Host	Year of isolation	Laboratory	Serotyping	PCR-RFLP	MLVA Pattern	Chlapsi_280	ChlaPsi_480	ChlaPsi_605	ChlaPsi_810	Chlapsi_222	Chlapsi_281	Chlapsi_929	Chlapsi_1778
Cpsi001	6BC	Parakeet	1941	6	A	A	19	3	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi002	VS1	Parrot	1985	6	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi003	CP3	Pigeon	1957	6	B	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi004	L2A	N/A	n/a	6	B	B	6	2	2	1	2	6	3	3	4
Cpsi005	GR9	Duck	n/a	6	C	C	2	1	3	2	3	6	3	3	4
Cpsi006	NJ1	Turkey	1959	6	D	D	20	4	3	2	4	5	4	2	3
Cpsi007	TT3	Turkey	1975	6	D	D	20	4	3	2	4	5	4	2	3
Cpsi008	Cal10	Ferret	1936	6	E	E	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi009	VS225	Parakeet	1991	6	F	F	14	3	3	2	4	6	4	3	4
Cpsi010	WS/RT/E30	Duck	2001	7	E+B	E	2	1	3	2	3	6	3	3	4
Cpsi011	WC	Bovine	1963	7	G	G	17	3	5	2	4	6	4	3	4
Cpsi012	M56	Muskrat	1961	7	H	H	5	2	1	2	4	2	4	3	3
Cpsi013	Loth	Pigeon	n/a	1	A	A	19	3	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi014	#84-0576	Parrot	1984	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi015	#84-6461	Parakeet	1984	1	undet.	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi016	#84-8344	Pigeon	1984	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi017	#84-8471	Parrot	1984	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi018	#84-9462	N/A	1984	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi019	#85-11073	Parrot	1985	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi020	#85-12098	Parrot	1985	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi021	#86-00191	Parrot	1986	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi022	#86-03026	Canary	1986	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi023	#86-03389	Parakeet	1986	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi024	#86-03875	Parrot	1986	1	A	undet.	15	3	3	2	4	6	3	3	3
Cpsi025	#86-10703	N/A	1986	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi026	#86-14356	Parrot	1986	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi027	#87-13654	N/A	1987	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi028	#88-0544	Parakeet	1988	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi029	#88-2014	Parakeet	1988	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi030	#88-5558	Parrot	1988	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi031	#88-5821	Parakeet	1988	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi032	#88-8795	Parakeet	1988	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi033	#89-02930	Parakeet	1989	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi034	#89-13210	Pigeon	1989	1	E	E	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi035	#90-00057	Parakeet	1990	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi036	#90-00475	Parrot	1990	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi037	#90-04862	Parakeet	1990	1	undet.	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi038	#90-10445	Parrot	1990	1	A	A	19	3	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi039	#90-11404	Parrot	1990	1	A	A	19	3	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi040	#90-12617	Pigeon	1990	1	B	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi041	#90-12937	Parrot	1990	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi042	#91-05189	Parrot	1991	1	A	A	13	2	6	2	4	6	4	3	4
Cpsi043	#91-05983	Parakeet	1991	1	E	E	1	1	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi044	#91-06047	Parrot	1991	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi045	#91-06568	Dove	1991	1	B	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi046	#91-12516	Pigeon	1991	1	B	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi047	#91-12841	Parrot	1991	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3

Table 3 (*Continued*)

Key	Strain id	Host	Year of isolation	Laboratory	Serotyping	PCR-RFLP	MLVA Pattern	Chlapsi_280	ChlaPsi_480	ChlaPsi_605	ChlaPsi_810	Chlapsi_222	Chlapsi_281	Chlapsi_929	Chlapsi_1778
Cpsi048	#91-14273	Parrot	1991	1	undet.	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi049	#92-194	Parakeet	1992	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi050	#94-01133	Parakeet	1994	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi051	#94-02306	Duck	1994	1	undet.	undet.	3	1	3	2	4	6	3	3	4
Cpsi052	#94-10673	Parakeet	1994	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi053	#95-1334	Parrot	1995	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi054	#95-7496	Parrot	1995	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi055	#96-12451	Parrot	1996	1	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi056	#97-3176	Parrot	1997	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi057	#97-4777	Parakeet	1997	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi058	#97-4779	Parakeet	1997	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi059	#97-5075	Exotic bird	1997	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi060	#97-6475	Parakeet	1997	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi061	#98-07627	Parrot	1998	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi062	#99-0182	Parrot	1999	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi063	#99-0923	Parakeet	1999	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi064	#99-8157/1	Parrot	1999	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi065	#00-0151	Parrot	2000	1	nd	A	11	2	6	2	1	6	4	3	3
Cpsi066	#00-0476	Parakeet	2000	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi067	#00-1176	Parrot	2000	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi068	#00-1268	Parrot	2000	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi069	#00-1750	Parrot	2000	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi070	#00-3593	Parrot	2000	1	nd	B	16	3	3	2	5	6	3	3	3
Cpsi071	#02-8282	Parakeet	2002	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi072	#03-3353/1	Exotic bird	2003	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi073	#04-5006	Duck	2004	1	nd	undet.	8	2	3	2	0	6	3	0	4
Cpsi074	#05-0941	Parakeet	2005	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi075	#05-0949	Parakeet	2005	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi076	#05-4036	Pigeon	2005	1	nd	E	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi077	#05-4098	Parrot	2005	1	nd	A	11	2	6	2	1	6	4	3	3
Cpsi078	#05-4325/8	Duck	2005	1	nd	undet.	4	1	3	2	0	6	3	3	4
Cpsi079	#05-4461/2	Duck	2005	1	nd	C	8	2	3	2	3	6	3	0	4
Cpsi080	#06-0372	Parakeet	2006	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi081	#06-0852	Exotic bird	2006	1	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi082	#06-0881	Duck	2006	1	nd	undet.	4	1	3	2	0	6	3	0	4
Cpsi083	#07-493/30	Pigeon	2007	1	nd	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi084	#3A	Budgerigar	2001	2	nd	B	18	3	5	2	4	5	3	2	4
Cpsi085	#4A	Budgerigar	2002	2	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi086	#5A	Pigeon	2002	2	nd	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi087	#12A	Budgerigar	2002	2	nd	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi088	#15A	Budgerigar	2003	2	nd	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi089	#16A	Budgerigar	2003	2	nd	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi090	#17A	Cattle	2003	2	nd	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi091	#21A	Budgerigar	2003	2	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi092	#23A	Pheasant	2003	2	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi093	#24A	Cattle	2003	2	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi094	#30A	Pig	2003	2	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi095	#36A	Pigeon	2003	2	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3

Table 3 (*Continued*)

Key	Strain id	Host	Year of isolation	Laboratory	Serotyping	PCR-RFLP	MLVA Pattern	Chlapsi_280	ChlaPsi_480	ChlaPsi_605	ChlaPsi_810	Chlapsi_222	Chlapsi_281	Chlapsi_929	Chlapsi_1778
Cpsi096	#41A	Budgerigar	2003	2	nd	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi097	#DC15	Cattle	2001	2	nd	B	10	2	5	2	4	6	4	3	3
Cpsi098	#VG 65/23/3	Duck	2005	2	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi099	#C5	Calf	1998	2	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi100	#VG 65/24/3	Duck	2005	2	nd	E	2	1	3	2	3	6	3	3	4
Cpsi101	#VG 65/8/4	Chicken	2005	2	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi102	#VG 65/22/3	Duck	2005	2	nd	E	2	1	3	2	3	6	3	3	4
Cpsi103	#DC32	Pigeon	2001	2	nd	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi104	#C19	Sheep	1998	2	nd	A	19	3	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi105	#DC29	Amazon parrot	2001	2	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi106	#C1/97	Sheep	1997	2	nd	C	8	2	3	2	3	6	3	0	4
Cpsi107	#DC28	Amazon parrot	2001	2	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi108	#244/03	Parakeet	2003	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi109	#1107/04	Parrot	2004	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi110	#2156/03	Parakeet	2003	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi111	#138/05	Budgerigar	2005	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi112	#1999/03	Parrot	2003	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi113	#236/05	Common buzzard	2005	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi114	#44/03	Parakeet	2003	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi115	#238/98 LUA KO	Parrot	1998	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi116	#1163	Gosling	n/a	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi117	#PS/10/93/LUA KO	Parrot	1993	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi118	#Di/4504/93/LUA KO	Parakeet	1993	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi119	#Pa/186/97/LUA KO	Budgerigar	1997	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi120	#1904	Budgerigar	1980	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi121	#6183	Parrot	1983	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi122	#5727	Parakeet	1983	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi123	#4043	Mallard	1982	3	nd	E	3	1	3	2	4	6	3	3	4
Cpsi124	#3437	Parrot	1982	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi125	#831/80	Parakeet	1980	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi126	#4482/82	Mallard	1982	3	nd	E	3	1	3	2	4	6	3	3	4
Cpsi127	#383	Chicken	1978	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi128	#3893	Duck	1982	3	nd	E	3	1	3	2	4	6	3	3	4
Cpsi129	#2165	Cockatiel	1978	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi130	#1316/78	Parrot	1978	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi131	#2106/03	Lovebird	2003	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi132	#4261	Mallard	n/a	3	nd	E	4	1	3	2	0	6	3	3	4
Cpsi133	#4528	Parrot	n/a	3	nd	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi134	#4167	Chicken	n/a	3	nd	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi135	#V492/1	Psittacine	1995	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi136	#T49/90	Pigeon	1990	4	B	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi137	#V189	Parrot	1994	4	A	A	11	2	6	2	1	6	4	3	3
Cpsi138	#V216	Parrot	1994	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi139	#V302	Military macaw	1994	4	B	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi140	#V610	Parrot	1994	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi141	#V46	Budgerigar	1996	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi142	#V181	Parrot	1996	4	nd	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi143	#V10	Amazon	1997	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3

Table 3 (*Continued*)

Key	Strain id	Host	Year of isolation	Laboratory	Serotyping	PCR-RFLP	MLVA Pattern	Chlapsi_280	ChlaPsi_480	ChlaPsi_605	ChlaPsi_810	Chlapsi_222	Chlapsi_281	Chlapsi_929	Chlapsi_1778
Cpsi144	#V35/31	Parakeet	1997	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi145	#V140	Budgerigar	1997	4	A	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi146	#V98	Amazon	1998	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi147	#V106	Amazon	1998	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi148	#V30	Amazon	1995	4	A	A	9	2	3	2	4	6	4	3	3
Cpsi149	#V35	Grey parrot	1995	4	B	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi150	#V243	Crimson rosella	1995	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi151	#V112	Budgerigar	1996	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi152	#V157	Parrot	1998	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi153	#V477/1	Amazon	1994	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi154	#V479	Amazon	1994	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi155	#V269	Amazon	1995	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi156	#V448	Parakeet	1995	4	undet.	F	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi157	#V35	Parakeet	1996	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi158	#V148	Parakeet	1996	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi159	#V165/1	Parakeet	1996	4	B	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi160	#V384	Budgerigar	1996	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi161	#V426	Amazon	1996	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi162	#V35/12	Cockatiel	1998	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi163	#V605	Amazon	1994	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi164	#V654	Parrot	1994	4	B	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi165	#V416	Cockatiel	1996	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi166	#V53	Eastern Rosella	1997	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi167	#V80	Amazon	1994	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi168	#V673/2	Amazon	1994	4	A	A	11	2	6	2	1	6	4	3	3
Cpsi169	#V492/4	Psittacine	1995	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi170	#V168	Agapornis	1995	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi171	#V734/2	Parrot	n/a	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi172	#V28	Amazone	n/a	4	A	A	12	2	6	2	4	6	4	3	3
Cpsi173	#7339/4	Pigeon	1997	5	nd	E	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi174	#7339/5	Pigeon	1997	5	nd	E	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi175	#7341/4	Pigeon	1997	5	nd	E	1	1	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi176	#7341/5	Pigeon	1997	5	nd	E	1	1	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi177	#2806/43	Pigeon	1996	5	nd	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi178	#2806/48	Pigeon	1996	5	nd	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4
Cpsi179	#72437/2	Pigeon	1996	5	nd	B	7	2	2	1	4	6	3	3	4

Laboratory of origin: 1, AFSSA; 2, Friedrich-Loeffler-Institut; 3, Clinic for Birds, Reptiles, Amphibian and Fish of Giessen; 4, University of Zurich; 5, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna; 6, via Annie Rodolakis; 7, University of Ghent. Abbreviations: Na: no amplification, n/a: not available, Undet.: undeterminate, nd: not done.

Table 4
Comparison of PCR-RFLP and MLVA patterns for field *C. psittaci* isolates

PCR-RFLP genotype	Number of isolates	MLVA pattern	Number of isolates per MLVA pattern
A	122	[12]	112
		[11]	4
		[19]	4
		[9]	1
		[13]	1
B	24	[7]	21
		[10]	1
		[16]	1
		[18]	1
C	2	[8]	2
E	14	[7]	4
		[1]	3
		[2]	3
		[3]	3
		[4]	1
F	1	[7]	1
G	1	[17]	1
H	1	[5]	1
Non-typable	5	[4]	2
		[3]	1
		[8]	1
		[15]	1

as some mammals from different geographical origins (Table 3). VNTRs were amplified very efficiently for most of the isolates and results are summarised in Table 3. For a few isolates, no amplification was obtained upon repeated PCR reactions using ChlaPsi_810 and/or ChlaPsi_929 primers.

This collection of 170 isolates could be subdivided by MLVA typing into 20 genotypes (not considering the absence of amplification for marker ChlaPsi_810 or ChlaPsi_929) termed genotype [1] through [20] (Table 3). Many of the isolates studied (122/170) had previously been typed as genotype A and/or serotype A. By MLVA, most of these (112/122) possess the same genotype as the VS1 reference strain (pattern [12]). The predominant pattern obtained for genotype B isolates was pattern [7]. This was also observed for several genotype E isolates and for the only genotype F isolate available for analysis (Table 4).

Whereas genotype A and B isolates correspond to one predominant pattern each (patterns [12] and [7] respectively), isolates of genotype E were more evenly distributed with representatives of MLVA pattern [7] ($n = 4$), [1] ($n = 3$), [2] ($n = 3$), [3] ($n = 4$) and [4] ($n = 1$). The two genotype C isolates analysed fell into 1 distinct MLVA pattern (pattern [8]) (Table 4).

A dendrogram has been generated using UPGMA with the VNTR repeat numbers as a character dataset for markers ChlaPsi_280, ChlaPsi_480, ChlaPsi_605, ChlaPsi_810, ChlaPsi_222, ChlaPsi_281, ChlaPsi_929 and ChlaPsi_1778. It reveals the genetic relationships within a selection of 67 isolates (Fig. 2). To simplify the analysis, one isolate with a given MLVA pattern was chosen from each bird species. Nine main groups could be identified when a cut-off value of 80% similarity was used. The first group is comprised of a single isolate (#3A). The second group includes the only two genotype D representative strains included in the study (NJ1 and TT3). The group 3 includes only strain M56. The fourth, larger group is mainly composed of genotype A isolates. Group 5 includes genotypes B, C, E and F. Group 6 and 8 are mainly composed of duck isolates typed as C, E or undetermined by PCR-RFLP analysis. Whereas group 7 includes only strains VS225 and WC, group 9 includes parrot strains of different genotypes.

Field isolates from the AFSSA collection ($n = 18$), as well as some other field strains ($n = 5$), which did not produce the VS1 reference pattern [12] were analysed with the 12 other sets of primers. As expected, this mostly failed to generate additional resolution, except in a few instances where no amplification was observed (Table 5).

4. Discussion

We present here a new MLVA-based molecular typing system for the discrimination of *C. psittaci* isolates. Out of 20 tandem repeats identified in the *C. psittaci* 6BC genome by TRF, 8 were found to be polymorphic in a preliminary screening using PCR.

Further analysis of 170 *C. psittaci* field isolates resulted in a total of 20 distinct patterns, adding a new level of resolution to the generally accepted 8 serovars. Current serology-based classification is performed using a panel of 8 mAbs specific for variable domains of the MOMP of representative isolates (VS1, CP3, GD, NJ1, CPMN, VS225, WC, M56) (Andersen, 1991, 1997). The alternate sequence-based PCR-RFLP typing method is based on the gene encoding the MOMP, *omp*A (Geens et al., 2005). The MLVA analysis described here however differs sharply from the serotyping or RFLP methods

Table 5
MLVA results obtained for field isolates with 12 other primer sets (ChlaPsi_177, ChlaPsi_462, ChlaPsi_1172, ChlaPsi_02, ChlaPsi_11, ChlaPsi_26, ChlaPsi_363b, ChlaPsi_557, ChlaPsi_705, ChlaPsi_621, ChlaPsi_967, ChlaPsi_1155)

Isolate identifier #	Results obtained with 12 other primers compared to those obtained with reference strain 6BC
89-13210, 90-11404, 91-5983, 91-12516, 94-2306, 00-151, 00-3593, 04-5006, 05-4098, 05-4325/8, 05-4561, 06-869, 3A, DC15, 4043, 4167, 05-4461/2, 06-881	No difference
90-10445	No amplification with primer set ChlaPsi_02
90-12617, 91-6568, 05-4036	No amplification with primer set ChlaPsi_621

in that it is performed on unlinked sequences located throughout the genome. Some of the samples analysed in our study were previously serotyped (Duan et al., 1999) and/or analysed by PCR-RFLP (Sudler et al., 2004). In most cases, results obtained by MLVA were consistent with previous typing results, except that (a) additional diversity was revealed by MLVA and (b) MOMP/*ompA*-based serotypes/genotypes B and E could not be systematically differentiated. Moreover, the newly described genotype E/B (representative strain WS/RT E30) has an identical pattern to that of the GR9 strain (genotype C) using this MLVA typing tool. This apparent discrepancy probably reflects the fact that none of the markers chosen in this study target *omp*A. Our clustering analysis resulted in the grouping of all genotype A isolates in a single branch. Similarly, the two analysed genotype D isolates form a distinct group. The only genotype H isolate (M56) belongs to a single branch. However, a similar strict clustering of isolates from the other genotypes is not observed. Of 26 serotype B isolates tested, 22 are clustered in the single MVLA pattern [7], while four are found in distinct branches [6], [10], [16] and [18]. Finally, genotype C, E and F isolates appear to be distributed randomly into different groups.

A limitation of this study is the over-representation of serotype A isolates examined, as only few samples from serotype/genotype B, E, C, or non-typable isolates were available. As identical patterns were obtained from the majority of serotype A field strains isolated between 1978 and 2007 (112/122), it is possible to infer that the eight genetic loci used here have been stable for this length of time. The observed similarity between independent isolates of the same serotype further suggests that these genetic markers do not vary at high frequency. Stability of the repeat copy number was assessed for the 8 VNTRs in one cultured strain (*C. psittaci* Loth strain) in 11 serial passages onto chicken eggs. Patterns after each passage were identical to the first isolate (data not shown). However, for the reference strain GR9, a different pattern was observed with one marker (ChlaPsi_929) when DNAs from 2 different laboratories were compared. The basis for this discrepancy is unknown. For 5 duck strains (#04-5006, #05-4325/8, #05-4461/2, #06-0881, #4261), markers ChlaPsi_810 and/or ChlaPsi_929 gave no amplification, and all possible combinations were observed for these isolates. Hence, these markers may be used to increase the information, with the caveat that occasionally, a fragment may not be amplified. It is possible that in some genomic sequences, one or several mismatches exist in the primer binding sites for these two VNTRs, making the PCR reaction more sensitive to slight variations in the DNA quality or in the PCR procedure. Further studies should investigate this issue, in particular by designing alternate primers for these genomic sequences.

Moreover, although some isolates were non-typable with monoclonal antibodies and/or gave PCR-RFLP patterns unrelated to one of the reference strains, MLVA always made it possible to establish a degree of relatedness between these isolates and reference strains (Table 3). The MLVA based molecular typing system has recently allowed to differentiate between distinct origins of *C. psittaci* strains associated with severe human contaminations (data not shown).

Difficulty in studies of the molecular epidemiology of *C. psittaci* is related to the fastidious growth of this bacterium. MLVA analysis does not require culture of an isolate as genomic analysis can be performed directly on DNA extracted from field/clinical specimens. Moreover MLVA typing is a reproducible method which can be standardized and performed at a low cost, thus facilitating large-scale molecular epidemiology investigations. Preliminary analysis show that the 8 VNTRs can be analysed in four multiplex PCRs (M1: ChlaPsi_280, M2: ChlaPsi_605, ChlaPsi_1778, M3: ChlaPsi_810, ChlaPsi_222, ChlaPsi_281, M4: ChlaPsi_480, ChlaPsi_929) further facilitating the assay (data not shown). The usefulness of the MLVA typing scheme proposed here should now be further evaluated by examining a larger population of isolates including multiple serotypes/genotypes from different hosts and geographical origins.

A similar approach based on Multi Locus Sequence Typing (MLST) was recently exploited for *C. trachomatis* (Klint et al., 2007). Of 47 *C. trachomatis* clinical isolates, the MLST system detected 32 variants compared with only 12 variants using conventional *omp*A sequence analysis. As the present MVLA study is only based on the apparent size of amplified fragments, a complementary, more detailed analysis should include sequencing and comparative analysis of the genomic sequences corresponding to the eight markers used here. Preliminary sequence data on the different alleles of ChlaPsi_810 have indeed revealed heterogeneity in the length of the repeat sequence (data not shown).

Most of the markers used in the present study were found to be located within genes or ORFs encoding predicted membrane proteins (data not shown). Given the dispersed genome locations of the markers, it is not possible at present to draw definitive conclusions on any biological significance of the inter-strain discrimination provided by the MLVA typing. A possibility however is that positive selection for amino acid sequence divergence of surface antigens for the purpose of escaping the host immune response plays a role. This interpretation will however require further study.

In summary, our findings show that MLVA can be used as a new typing method providing enhanced discrimination among *C. psittaci* isolates from varied hosts and geographical origins. Moreover, as additional chlamydial genome sequences become available, it will be possible to search for new polymorphic tandem repeats that can be used for further strain discrimination. Given the zoonotic risks associated with *C. psittac*i infection, the diagnostic potential of this methodology is critical to future epidemiological studies.

Acknowledgments

We wish to thank R. Aaziz for providing helpful technical assistance. PM Bavoil and GSA Myers were supported by NIH grant # RO1 AI51472.

The study is an integral part of the European COST Action 855, "Animal chlamydioses and the zoonotic implications".

References

Andersen, A.A., 1991. Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. J. Clin. Microbiol. 29, 707–711.

Andersen, A.A., 1997. Two new serovars of *Chlamydia psittaci* from North American birds. J. Vet. Diagn. Invest. 9, 159–164.

Andersen, A.A., Vanrompay, D., 2000. Avian chlamydiosis. Rev. Sci. Tech. 19, 396–404.

Benson, G., 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Res. 27, 573–580.

Duan, Y.J., Souriau, A., Mahe, A.M., Trap, D., Andersen, A.A., Rodolakis, A., 1999. Serotyping of chlamydial clinical isolates from birds with monoclonal antibodies. Avian Dis. 43, 22–28.

Geens, T., Desplanques, A., Van Loock, M., Bonner, B.M., Kaleta, E.F., Magnino, S., Andersen, A.A., Everett, K.D., Vanrompay, D., 2005. Sequencing of the *Chlamydophila psittaci* ompA gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. J. Clin. Microbiol. 43, 2456–2461.

Heddema, E.R., van Hannen, E.J., Duim, B., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Pannekoek, Y., 2006. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* in human samples. Emerg. Infect. Dis. 12, 1989–1990.

Hinton, D.G., Shipley, A., Galvin, J.W., Harkin, J.T., Brunton, R.A., 1993. Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant. Aust. Vet. J. 70, 174–176.

Huminer, D., Pitlik, S., Kitayin, D., Weissman, Y., Samra, Z., 1992. Prevalence of *Chlamydia psittaci* infection among persons who work with birds. Isr. J. Med. Sci. 28, 739–741.

Huminer, D., Samra, Z., Weisman, Y., Pitlik, S., 1988. Family outbreaks of psittacosis in Israel. Lancet 2, 615–618.

Kaibu, H., Iida, K., Ueki, S., Ehara, H., Shimasaki, Y., Watanabe, S., Anzai, H., Takebu, W., Muta, T., Kusaba, T., Kishimoto, T., Ando, S., 2006. Psittacosis in all four members of a family in Nagasaki, Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 59, 349–350.

Kaleta, E.F., Taday, E.M., 2003. Avian host range of *Chlamydophila spp.* based on isolation, antigen detection and serology. Avian Pathol. 32, 435–461.

Klint, M., Fuxelius, H., Goldkhul, R., Skarin, H., Rutemark, C., Andersson, S Persson, K., Herrmann, B., 2007. High-Resolution Genotyping of *Chla mydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis. J. Clin. Micro biol..

Le Fleche, P., Fabre, M., Denoeud, F., Koeck, J.L., Vergnaud, G., 2002. Hig resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tube culosis* complex based on tandem repeat typing. BMC Microbiol. 2, 37.

Le Fleche, P., Hauck, Y., Onteniente, L., Prieur, A., Denoeud, F., Ramisse, V Sylvestre, P., Benson, G., Ramisse, F., Vergnaud, G., 2001. A tander repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping o *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol. 1, 2.

Pourcel, C., Andre-Mazeaud, F., Neubauer, H., Ramisse, F., Vergnaud, G., 200 Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis o *Yersinia pestis*. BMC Microbiol. 4, 22.

Saito, T., Ohnishi, J., Mori, Y., Iinuma, Y., Ichiyama, S., Kohi, F., 200 Infection by *Chlamydophilia avium* in an elderly couple working in pet shop. J. Clin. Microbiol. 43:, 3011–3013.

Sayada, C., Andersen, A.A., Storey, C., Milon, A., Eb, F., Hashimoto, N., Hira K., Elion, J., Denamur, E., 1995. Usefulness of *omp*1 restriction mapping fo avian *Chlamydia psittaci* isolate differentiation. Res. Microbiol. 146:, 155 165.

Sudler, C., Hoelzle, L.E., Schiller, I., Hoop, R.K., 2004. Molecular characte isation of chlamydial isolates from birds. Vet. Microbiol. 98, 235–241.

Van Loock, M., Vanrompay, D., Herrmann, B., Vander Stappen, J., Volckaer G., Goddeeris, B.M., Everett, K.D., 2003. Missing links in the divergence o *Chlamydophila abortus* from *Chlamydophila psittaci*. Int. J. Syst. Evo Microbiol. 53, 761–770.

Vanrompay, D., Andersen, A.A., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 1993. Ser otyping of European isolates of *Chlamydia psittaci* from poultry and othe birds. J. Clin. Microbiol. 31, 134–137.

Vanrompay, D., Butaye, P., Sayada, C., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 199 Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using omp1 restrictio mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. Res. Microbiol. 14 327–333.

Vergnaud, G., Pourcel, C., 2006. Multiple Locus VNTR (Variable Numbe Tandem Repeat) Analysis. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre 2 : Modèles expérimentaux d'aspergillose et de chlamydiose aviaires

Les modèles animaux sont utilisés pour étudier différents aspects de la pathogénie des maladies (physiopathologie de la maladie, réponses immunitaires innée et acquise de l'hôte), pour valider de nouveaux tests de dépistage et pour évaluer l'efficacité de protocoles prophylactiques ou thérapeutiques (Patterson *et al.*, 2005).

L'objectif ultime de ces études est de diminuer l'incidence des maladies en améliorant la prévention, le diagnostic et le traitement.

Le modèle choisi doit recréer le plus fidèlement possible la maladie ou le portage en fonction des objectifs de départ. Il doit être reproductible et établi selon un protocole standardisé et économique. Le protocole d'étude doit être validé par un comité d'éthique. Enfin, le modèle doit garantir l'obtention d'un certain nombre de paramètres quantifiables (Clemons et Stevens, 2005).

Depuis plusieurs années, l'expérimentation animale fait l'objet d'une réglementation très stricte et des directives sont régulièrement diffusées pour promouvoir la « règle des 3R » (Remplacer, Réduire et Raffiner). Chaque fois que cela est possible, il est conseillé de remplacer les expériences sur animal par des expériences *in vitro*. Il convient également de réduire au minimum indispensable le nombre d'animaux utilisés. Enfin, par l'amélioration des techniques opératoires, il faut réduire la souffrance et le stress de l'animal tout en obtenant des résultats de meilleure qualité qui n'auront pas à être répétés. Le développement de techniques d'exploration fonctionnelle *in vivo* devrait permettre une réduction du nombre d'animaux utilisés, et de la pénibilité des expériences subies par l'animal de laboratoire.

1. Les modèles expérimentaux d'aspergillose

1.1. Modèles utilisant des mammifères

Plusieurs modèles ont été développés ces dernières années pour répondre au défi clinique, diagnostique et thérapeutique que constitue l'aspergillose invasive en milieu hospitalier.

Le cochon d'Inde (*Cavia porcellus*) et le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) ont été régulièrement utilisés mais le rat gris (*Rattus norvegicus*) et la souris (*Mus musculus*) sont les modèles les plus communs pour étudier l'aspergillose invasive humaine (Sheppard *et al.*, 2004).

Il n'y a aucun modèle d'aspergillose invasive universellement reconnu. Les modèles publiés varient en fonction de l'animal (l'espèce, le poids, l'âge, le sexe, le statut immunitaire) et des protocoles d'inoculations (différentes voies et concentrations de conidies infectantes).

Les voies d'inoculation les plus fréquemment utilisées sont la voie intranasale et la voie intratrachéale. Cependant ce sont les modèles par inhalation chez la souris qui reproduisent le plus fidèlement les lésions observées lors d'autopsie de patients morts d'aspergillose invasive (Sheppard *et al.*, 2004). Un modèle d'inoculation de rat par aérosolisation intratrachéale d'une solution de conidies a récemment été mis au point (Chandenier *et al.*, 2009). Ce modèle s'est révélé très performant, facile d'exécution et a permis d'obtenir des résultats en accord avec ceux des modèles précédemment décrits chez la souris.

Dans ces modèles, les animaux doivent être immunodéprimés (par injection de corticoïdes par exemple) avant inoculation.

1.2. Modèles aviaires

Les oiseaux présentent des caractéristiques anatomiques et physiologiques uniques (cf partie « Les oiseaux et les filières avicoles en France »). De ce fait les résultats obtenus sur des modèles utilisant des mammifères ne sont que très difficilement extrapolables aux oiseaux. La mise au point de modèles aviaires spécifiques est très rapidement apparue indispensable. Les premières observations d'aspergillose expérimentale datent de la fin du XIX^{ième} siècle, époque à laquelle Grohe (1869) et Block (1870) constatent que si l'on injecte par voie intraveineuse une suspension de spores de moisissures, les oiseaux succombent rapidement. Ces auteurs ont réalisé des expériences avec des spores d'*Aspergillus glaucus*, de *Penicillium glaucum* et des levures.

Depuis, de nombreux modèles ont été décrits sur différentes espèces et avec différentes voies d'inoculation. Les espèces étudiées ont été la poule (*Gallus gallus domesticus*) (O'meara et Chute,

1959 ; Taylor et Burroughs, 1973), la caille (*Coturnix japonica)* (Gümüssoy *et al.*, 2004), la dinde (*Meleagris gallopavo*) (Kunkle et Rimler, 1996 ; Kunkle et Sacco, 1998 ; Kunkle *et al.*, 1999 ; Richard *et al.*, 1981 ; Richard et Thurston, 1983 ; Le Loc'h *et al.*, 2006 ; Féménia *et al.*, 2007) et plus rarement le pigeon (*Columba livia*) (Van Cutsem *et al.*, 1989 ; Beernaert *et al.*, 2008), le canard (*Anas* sp.) (Graczyk *et al.*, 1998) et l'étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*) (Atasever et Gümüssoy, 2004).

Les *inocula* habituellement utilisés varient de 10^7 à 10^8 conidies par kg de poids vif (Gümüssoy *et al.*, 2004 ; Kunkle et Rimler, 1996 ; Kunkle et Sacco, 1998).

Les différentes voies d'inoculation testées chez les oiseaux sont la voie aérienne (par génération d'un aérosol) (figure 37) (O'meara et Chute, 1959 ; Klimes *et al.*, 1964 ; Richard *et al.*, 1981 ; Richard et Thurston, 1983 ; Taylor et Burroughs, 1973 ; Van Cutsem, 1983), la voie intratrachéale (Graczyk *et al.*, 1998), la voie intra-sac aérien (Kunkle et Rimler, 1996 ; Kunkle et Sacco, 1998 ; Kunkle *et al.*, 1999 ; Le Loc'h *et al.*, 2006 ; Mazzola-Rossi, 2007 ; Féménia *et al.*, 2007) et la voie intraveineuse (Atasever et Gümüssoy, 2004 ; Kunkle *et al.*, 1999). L'inoculation aérienne a été obtenue à partir de spores sèches ou de spores humides. Pour obtenir un aérosol de spores sèches, il suffit de créer un courant d'air à la surface d'une culture sporulée. Pour obtenir un aérosol de spores humides, il faut utiliser un nébulisateur qui transforme une solution contenant des spores en un nuage de très fines gouttelettes. Une étude a comparé le pouvoir infectieux d'un aérosol constitué de spores sèches et d'un aérosol constitué de gouttelettes contenant des spores humides (Klimes *et al.*, 1964). L'infection des oiseaux a été plus facilement obtenue à partir de l'aérosol contenant des spores sèches.

Figure 41. Exemple de dispositif expérimental pour l'inoculation de spores sèches par voie aérienne à des oiseaux (Richard *et al.*, 1981).

Le principal inconvénient des modèles animaux est la réponse très variable d'un individu à l'autre pour une même dose d'où la nécessité d'utiliser un grand nombre d'animaux ou des lignées génétiquement caractérisées, notamment chez le poulet. Il existe plusieurs statuts sanitaires chez certaines espèces aviaires comme le poulet, la dinde ou le canard. Ainsi il est possible d'utiliser des animaux axéniques (*i.e.* animaux « stériles »), Exempts d'Organisme Pathogène Spécifié ou EOPS (*i.e.* animaux dont la microflore ne présente pas les agents spécifiés sur une liste d'exclusion après contrôles) et conventionnels (*i.e.* animaux élevés dans les conditions habituelles).

Notons qu'il existe aussi quelques modèles originaux qui ne font appel ni à des mammifères, ni à des oiseaux mais à des arthropodes (plus particulièrement les larves du lépidoptère *Galleria mellonella*) (Jackson, 2009 ; Renwick, 2006). Ces modèles restent pour l'instant marginaux mais ils répondent aux préoccupations de l'opinion publique et permettent de réduire l'utilisation d'animaux vertébrés.

1.3. Mise au point d'une infection expérimentale chez le poulet

Article 3

Assessment of *Aspergillus fumigatus* pathogenicity in aerosol-challenged chickens (*Gallus gallus*) belonging to two lineages

Soumis le 22 décembre 2010 dans *Veterinary Research*

Assessment of *Aspergillus fumigatus* pathogenicity in aerosol-challenged chickens (*Gallus gallus*) belonging to two lineages

Simon Thierry[1], Benoit Durand[2], Jean-Pierre Tafani[3], Dongying Wang[1,4], Manjula Deville[5], René Chermette[5], Jacques Guillot[5], Pascal Arné[5]*

1 ANSES, UMR BIPAR, Ecopham, Maisons-Alfort, France

2 ANSES, Epidemiology unit, Maisons-Alfort, France

3 APCIS, Maisons-Alfort, France

4 Parasitology department, College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning, China

5 ENVA, UMR BIPAR, Ecopham, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

* corresponding author: parne@vet-alfort.fr

Abstract

Infection due to the mold *Aspergillus fumigatus* remains a common and life-threatening infection in many animals, especially birds. Animal models are still required to better understand the physiopathology of infection and evaluate diagnostic tools and treatment procedures. The aim of the present study was to assess the pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* in two lineages of chicken (*Gallus gallus*): SPF White Leghorn PA12 layers and conventional JA657 broilers. The 4-day old birds were experimentally infected in an inhalation chamber in order to reproduce a "natural" contamination and to obtain a large repartition of conidia into the respiratory tract. Half of the chicks was injected subcutaneously with dexamethasone for 4 days before the infective challenge. At days 0 and 7, the effects of chicken lineage and immunosuppressive treatment on pulmonary fungal burden were analyzed using two linear mixed models. The pathogenicity of *A. fumigatus* varied according to the lineage: no clinical signs and no mortality were observed in layer chickens whereas more than 50% of mortality occurred in broilers. The effect of immunosuppressive treatment was also demonstrated, notably on animals weight but also on mortality.

Keywords

Aspergillosis, inhalational model, broiler, layer, dexamethasone

1. INTRODUCTION

Aspergillosis, a fungal disease due to the development of molds of the genus *Aspergillus*, is a major cause of morbidity and mortality in humans and in a wide range of animals especially birds. Infection occurs via inhalation of conidia into the respiratory tract. The diagnosis of this infection remains difficult and there are limited treatment options. Aspergillosis has a worldwide distribution and has been reported in farm birds as well as in many wild species. Turkey poults in large confinement houses, quails, marine birds that are brought into rehabilitation, captive raptors, and penguins being maintained in zoological parks are commonly infected [28]. Young birds and immunocompromised hosts appear to be much more susceptible. In turkey poults, aspergillosis leads to consequential economic losses related to low productivity, mortality and carcass condemnations at slaughter inspection [20, 18].

Many different animal models have been described to evaluate both the diagnosis and treatment of infection and to assess the pathogenicity and virulence of *Aspergillus fumigatus*. Murine models are predominant but other models using birds have also been proposed. In previous investigations, experimental infection with *A. fumigatus* was carried out in chickens [27, 31], in turkeys [16, 17, 23, 24, 25], in starlings [1], in ducks [11], in Japanese quails [4, 12], in pigeons [32] and in ostriches [33]. Several inoculation routes were tested (intravenously, intratracheally, intra-air sac, intrapulmonary and using aerosol) [7, 9, 12, 13, 16, 17, 21, 23, 24]. Variation of sensibility between avian species, and sometimes between lineages of the same avian species [10] was demonstrated.

The aim of the present study was to assess the pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* in two lineages of chickens (*Gallus gallus*). SPF layer chickens and conventional broiler chickens were experimentally infected in an inhalation chamber in order to reproduce a "natural" contamination and to obtain a large repartition of conidia into the respiratory tract. Half of the chicks was injected subcutaneously with dexamethasone for 4 days before the infective challenge.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Aspergillus fumigatus* strain

Aspergillus fumigatus strain CBS 144.89 was used for all experiments of the present study. This strain was initially isolated from a human patient with invasive aspergillosis in France and obtained from the Centraalbureau voor Schimmelculture, Utrecht, The Netherlands,

To prepare the inoculum, the strain was grown on malt agar plates for 2 weeks at 37°C. Conidia were harvested by flooding the plates with sterile phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.01% (vol/vol) Tween 20. The conidia were concentrated by centrifugation (at 4000g for 30 min) and counted using a Malassez counting chamber.

2.2. Animals

Two types of chickens were used in this study: SPF White Leghorn PA12 layer chickens (PFIE, INRA Tours, France) and conventional JA657 broiler chickens (Couvoir du Pin, Angers, France). Animals were received at 1-day old and immediately confined in filtered cages (Charles River, USA) inside a type III PSM, under a negative pressure.

2.3. Inhalation chamber

To infect animals, we used a 37.5L closed Plexiglas box as aerosol chamber. The inoculum was introduced by aerosolizing a conidial suspension with a small particle nebulizer (Compressor Nebuliser Model NE-C29-E, Omron Corporation, Japan). This nebulizer produced aerosol output at 0.06 mL/min with a MMAD (Mass Median Aerodynamic Diameter) of approximately 3µm.
The compressor unit was connected by a tube to the nebulizer in the aerosol chamber. The compressor and the aerosol chamber were placed within a laminar flow hood in a negative pressure room during nebulisation.

2.4. Inoculum dose and time exposure

Preliminary studies were performed to determine the best experimental design. We first tested 3 inoculum doses (10^6, 10^7 and 10^8 conidia/mL) with a time exposure of 20 minutes, corresponding to a volume of 1.2 mL of inoculum. We then tested 2 doses (10^8 and 10^9 conidia/mL) with a time exposure of 30 minutes, corresponding to a volume of 1.8 mL. In conclusion of these 2 preliminary studies, we observed a good correlation between the inoculum dose and the amount of conidia found in the lungs just after inoculation (data not shown). We finally selected an inoculum dose of 10^9 conidia/mL and a time exposure of 1 hour in order to produce a massive exposure to aerosolized conidia. For all the experiments of the present study, the exposure time comprised two sets of 25 minutes of nebulization and 5 minutes of release.

2.5. Immunosuppression

Chicks were injected subcutaneously with dexamethasone (Dexadreson, Intervet SA) at 5mg/kg of body weight daily for the first 4 days after hatching [6].

2.6. Experimental design

The experimental design was submitted to an ethics committee.
Two sets of fifty 1-day-old chickens were used. The first set was composed of SPF White Leghorn PA12 layer chickens and the second set included conventional JA657 broiler chickens.

Within each set, 3 groups were randomly constituted: the first group of 12 animals was used as negative control (group C for Control); the two other groups (D and S) of 19 animals each were inoculated with conidia. Birds from group D (for Dexamethasone) were treated with dexamethasone and birds from group S (for Saline solution) received a physiological saline solution injection. In the control group, half of the animals were injected with dexamethasone (groups C-D) while remaining birds received a physiological saline solution (groups C-S).

Aerosol challenge was done on the fourth day after animal reception. At the end of exposure, 4 chickens in group C and 5 chickens in groups D and S, were immediately sacrified by injection of 0.1 mL of Nesdonal© and necropsied.

All remaining chickens were daily weighed from day of inoculation to the end of the experiment (Figure 1).

2.7. Necropsic examination

A necropsy was done on all dead or sacrified animals. Internal organs were carefully inspected for macroscopical lesions and entire lungs were systematically collected. The trachea and left thoracic air sac were aseptically incised and their mucous membranes sampled with a sterile swab. The level of feather contamination was estimated by brushing the body with a sterile small carpet square.

2.8. Mycology

For each animal, one lung was weighed and grinded with French Potter in 6 mL sterile PBS containing 0.01% (vol/vol) Tween 20. Two dilutions of each solution were seeded on malt chloramphenicol agar plates. Swabs and carpet squares were directly applied on malt chloramphenicol agar plates. Incubation temperature was 37°C.

Growth and count of *A. fumigatus* colonies was assessed 2 days after plate inoculation.

2.9. Multiple Locus VNTR Analysis (MLVA)

MLVA was used to confirm that the infection originated from the inoculated strain.

DNA isolation, PCR amplification and VNTR profile analysis were performed as described by Thierry *et al.* [30].

2.10. Statistical analysis

The effects of chicken lineage (layer *versus* broiler) and of immunosuppressive treatment (groups D *versus* S) on animals weight were studied using a linear mixed model. Independent variable was the daily weight. Chicken lineage and immunosuppressive treatment were the fixed effects, whereas the

group (cage in which animals were housed) and the individual (the animal) were treated as a nested random effect.

For each animals set, survival analysis was used to draw survival curves and to evaluate the effect of the immunosuppressive treatment on mortality, using an exact log-rank test. In dead animals, variations of pulmonary fungal burden according to the age at death were studied using a linear mixed model. The day of death was treated as a fixed effect and the group as a random effect.

Finally, at day 0 and at day 7, the effects of chicken lineage (set 1 *versus* set 2) and of immunosuppressive treatment (groups D *versus* S) on pulmonary fungal burden were analyzed using two linear mixed models (one for the animals sacrified at day 0, and one for those sacrified at day 7). Independent variable was the $\log_{10}$ of the number of CFU per gram of lung. Chicken lineage and immunosuppressive treatment were fixed effects, whereas the group was treated as a random effect.

All the analyses were conducted using R [29].

3. RESULTS

3.1. Weight

In a global model including all animals from both sets, significant mean weight differences were observed due to the chicken lineage: animals from set 1 (layer chickens) were lighter than animals from set 2 (conventional broilers) ($p<0.0001$). Significant mean weight differences were also observed due to the immunosuppressive treatment (animals from groups S were heavier than those from groups D, $p<0.0001$) and to the aerosol challenge (control animals were heavier than experimentally infected ones, groups D and S, $p = 0.02$). Mean weights variations are summarized in figure 2.

In set 2, a problem in room temperature control between day 4 and 5, led to a slight weight loss in chickens of all groups.

3.2. Clinical signs

In the first set (layer chickens), none of the animals exhibited clinical signs during the experiment.

In the second set (broiler chickens), clinical signs were observed in both groups D and S. Clinical signs included dyspnea, lateral recumbency and finally death (n=14).

3.3. Mortality

In the first set (layer chickens), no mortality was observed.

In the second set (broiler chickens), mortality occurred in both group D and S. Though more birds died in the first group, no significant difference was demonstrated ($p = 0.35$) (Figure 3).

3.4. Pathological findings

Control birds of both sets were devoided of macroscopical lesions.

All inoculated birds of the first set (layer chickens) and animals of group S from second set (broiler chickens), exhibited few granulomas in air sacs.

Immunocompromised chickens in the second set (broiler chickens), presented granulomatous foci, oedematous membranes and neo-vascularization on air sacs. Granulomas in lungs were also observed in some cases.

3.5. Mycological findings

All mycological samples (including samples from feathers) leaded to negative results in control birds of both sets.

An average of 3.10^4 CFU/g of lung was found in chickens sacrified immediatly after inoculation. No significant differences between the two sets ($p = 0.43$) or between dexamethasone exposed or non-exposed animals ($p = 0.74$) were found for this value (Figure 4).

No significant difference in pulmonary fungal burden was found in birds that spontaneously died during the experiments considering the day of death ($p = 0.55$).

On the contrary, the number of viable conidia was significantly higher in broiler chickens sacrificed on day 7 than in layer chickens ($p = 0.01$) (Figure 4). However, no difference was observed between groups S and D ($p = 0.13$). Individual results in groups S were more variable than in groups D for the two sets, due to the fact that a greater number of animals had negative cultures (Figure 4).

Fungal cultures from feathers, trachea and air sacs yielded similar results: a high level of contamination was found just after inoculation but cultures were negative at day 7. Only air sac swabs yielded positive results from one animal that died (n=14) during the experiment.

3.6. Molecular typing of *A. fumigatus*

All *A. fumigatus* isolates (n=5) collected from the animals presented the same MLVA genotype as that of the reference strain (CBS 144.89) used for the nebulization.

4. DISCUSSION

We developed and optimized an avian model of acute aspergillosis by aerosol inoculation. Considering the specificity of avian anatomy and physiology, we considered that this kind of model should be selected in order to further evaluate both the diagnosis and treatment of avian aspergillosis and to assess the pathogenicity and virulence of *Aspergillus fumigatus* in birds. Aerosol inoculation is supposed to allow a better distribution of conidia in respiratory tract in comparison to other routes like the intra-air sac, intratracheal or intrapulmonary injection, which notably bypass the upper respiratory system defences [5, 14, 16, 26]. The present model integrates all steps of the contamination including potential clearance mechanisms in the nasal cavities and primary airways. The main concern with aerosol inoculation is the standardization of conidia exposure. In preliminary studies, we demonstrated that the initial contamination level in lungs was reproducible and proportional to the concentration of the inoculum solution (data not shown).

Administration of dry conidia clearly demonstrated a better efficiency than humid aerosol in terms of subsequent mortality and morbidity in birds [14]. However, aerosolization of conidia in solution allows a better control of the inoculated dose.

In the present investigation, we performed immunosuppression in order to reduce individual variation of immune response and optimize the development of acute infection. The immunosuppressive treatment with dexamethasone was previously reported to suppress the PHA-elicited cutaneous basophile hypersensitivity (CBH) response in 5-day-old and 10-day-old chickens. A transitory decrease in bursa weight was also described in the 10-day-old chickens after treatment [6]. Repeated injection of dexamethasone depressed lymphocytes B and T and macrophages response [6]. Macrophages represent the first line of defence in lungs and have an important role in protection against fungal infection [9, 22]. Similar protocols have already been described in pigeons [2, 3] and turkeys [19]. In the present study, an acute aspergillosis was induced in broiler chickens. A variation in mortality rate, although not statistically significant, was observed between immunosuppressed and immunocompetent broilers (62.5% and 37.5 % of mortality, respectively). The chronology of deaths in the post-inoculation period differed also between immunosuppressed and immunocompetent broilers. Indeed, we observed deaths in immunosuppressed group overall period of 7 days whereas in the immunocompetent group the deaths occurred in a 2 days interval (days 3 and 4 post-inoculation).

All birds were weighed daily during the experiment. The results confirmed the depressive role of dexamethasone on growth [6]. No significant differences were observed on fungal burden in lungs at any time between immunosuppressed and immunocompetent birds for both sets.

The lineage (SPF layer breed versus conventional broiler breed) was clearly identified as the major factor that influenced the pathogenicity of *A. fumigatus*. Although no differences were observed in initial fungal burdens, an important variation in infection development was noticed: no mortality occurred in layer chickens whereas more than 50% of inoculated broilers died. Both lineages exhibited

the expected weight evolution considering the aims of their respective selection scheme. Broiler chickens are fast growers whereas layers are selected to produce eggs and conserve a light weight. The quantification of viable conidia in lungs at day 7 post inoculation, showed a significant difference between layers and broilers. Apparently, layer chickens were able to clear the infection much better than broiler chickens.

The pulmonary fungal burden was quantified for all birds that died spontaneously during the experiment. No difference was observed whatever the date of death post inoculation. In fact, the final concentration of viable conidia appeared to be quite constant. This mycological parameter was also evaluated for all birds sacrificed at the end of experiment at 7 days post-inoculation.

Immunosuppressed or immunocompetent SPF PA 12 layer chickens were proved to be resistant to the aerosol challenge and should not be used as models of avian aspergillosis. Immunosuppressed and conventional JA657 broiler chickens were much more susceptible. The difference between these two genetic types relied probably more to lineage than to health status (SPF versus conventional). The genetic selection of broilers on bodyweight may have impaired the efficacy of their immune defences [8, 15].

To rule out any possibility of contamination by ubiquitous conidia of *Aspergillus*, especially in dexamethasone treated groups, we characterized isolates by MLVA, a new method that was recently developed in our laboratory [30]. Using this typing method, it was possible to confirm that all *A. fumigatus* isolates collected during the experiment were corresponding to the inoculated strain (CBS 144.89).

In conclusion, the present study demonstrated the exacerbation of *A. fumigatus* pathogenicity in dexamethasone exposed conventional broiler chickens. These animals can be used in aspergillosis inhalational models. The aerosol inoculation of humid conidia was shown to be reproducible. In further investigations, the effect of repetitive or mixed inoculation could be assessed.

ACKNOWLEDGEMENTS

ST is a PhD student supported by the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES). DW has received a grant from the French Embassy in the People's Republic of China.

This research was supported by Janssen-Cilag company.

REFERENCES

[1] Atasever A., Gumussoy K.S., Pathological, clinical and mycological findings in experimental aspergillosis infections of starlings, J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. (2004) 51:19-22.

[2] Beernaert L.A., Pasmans F., Haesebrouck F., Martel A., Modelling *Aspergillus fumigatus* infections in racing pigeons (*Columba livia domestica*), Avian Pathol. (2008) 37:545-549.

[3] Beernaert L.A., Pasmans F., Baert K., Van Waeyenberghe L., Chiers K., Haesebrouck F., Martel A., Designing a treatment protocol with voriconazole to eliminate *Aspergillus fumigatus* from experimentally inoculated pigeons, Vet Microbiol. (2009) 139:393-397.

[4] Chaudhary S.K., Sadana J.R., Experimental aspergillosis in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). Clinical signs and haematological changes, Mycopathologia. (1988) 102:179-184.

[5] Corbanie E.A., Matthijs M.G., van Eck J.H., Remon J.P., Landman W.J., Vervaet C., Deposition of differently sized airborne microspheres in the respiratory tract of chickens, Avian Pathol. (2006) 35:475-485.

[6] Corrier D.E., Elissalde M.H., Ziprin R.L., DeLoach J.R., Effect of immunosuppression with cyclophosphamide, cyclosporin, or dexamethasone on *Salmonella* colonization of broiler chicks, Avian Dis. (1991) 35:40-45.

[7] Dyar P.M., Fletcher O.J., Page R.K., Aspergillosis in turkeys associated with use of contaminated litter, Avian Dis. (1984) 28:250-255.

[8] Faublée V., Boller M., Rôle pathogène expérimental d'*Aspergillus fumigatus* chez le poulet, Rec. Med. Vet. (1975) 151:481-489.

[9] Femenia F., Fontaine J.J., Lair-Fulleringer S., Berkova N., Huet D., Towanou N., Rakotovao F., Granet O.I., Le Loc'h G., Arne P., Guillot J., Clinical, mycological and pathological findings in turkeys experimentally infected by *Aspergillus fumigatus*, Avian Pathol. (2007) 36:213-219.

[10] Ghori H.M., Edgar S.A., Comparative susceptibility and effect of mild *Aspergillus fumigatus* infection on three strains of chickens, Poult Sci. (1979) 58:14-17.

[11] Graczyk T.K., Cranfield M.R., Klein P.N., Value of antigen and antibody detection, and blood evaluation parameters in diagnosis of avian invasive aspergillosis, Mycopathologia. (1997) 140:121-127.

[12] Gumussoy K.S., Uyanik F., Atasever A., Cam Y., Experimental *Aspergillus fumigatus* infection in quails and results of treatment with itraconazole, J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. (2004) 51:34-38.

[13] Julian R.J., Goryo M., Pulmonary aspergillosis causing right ventricular failure and ascites in meat-type chickens, Avian Pathol. (1990) 19:643-654.

[14] Klimes B. N.Z., Severa K., Therapy of Aspergillosis of Chickens with Fungicidin, Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B. (1964) 11:151-160.

[15] Koenen M.E., Boonstra-Blom A.G., Jeurissen S.H., Immunological differences between layer- and broiler-type chickens, Vet Immunol Immunopathol. (2002) 89:47-56.

[16] Kunkle R.A., Rimler R.B., Pathology of acute aspergillosis in turkeys, Avian Dis. (1996) 40:875-886.

[17] Kunkle R.A., Rimler R.B., Steadham E.M., Absence of protection against challenge with *Aspergillus fumigatus* by adoptive transfer of splenocytes from convalescent turkeys, Avian Dis. (1999) 43:678-684.

[18] Kunkle R.A., Fungal disease, in: Wiley-Blackwell (Ed.), Disease of Poultry, 2003.

[19] Le Loc'h G., P. Arne, C. Bourgerol, E. Risi, J. Pericard, J. Quinton, S. Bretagne, and J. Guillot., Detection of circulating serum galactomannan for the diagnosis of avian aspergillosis, 16th Annu. Cong. Intl. Soc. Hum.Anim. Mycol, 2006.

[20] Morris M.P., Fletcher O.J., Disease prevalence in Georgia turkey flocks in 1986, Avian Dis. (1988) 32:404-406.

[21] Peden W.M., Rhoades K.R., Pathogenicity differences of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* in turkeys, Avian Dis. (1992) 36:537-542.

[22] Reese S., Dalamani G., Kaspers B., The avian lung-associated immune system: a review, Vet Res. (2006) 37:311-324.

[23] Richard J.L., Cutlip R.C., Thurston J.R., Songer J., Response of turkey poults to aerosolized spores of *Aspergillus fumigatus* and aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*, Avian Dis. (1981) 25:53-67.

[24] Richard J.L., Thurston J.R., Rapid hematogenous dissemination of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* spores in turkey poults following aerosol exposure, Avian Dis. (1983) 27:1025-1033.

[25] Richard J.L., Peden W.M., Sacks J.M., Effects of adjuvant-augmented germling vaccines in turkey poults challenged with *Aspergillus fumigatus*, Avian Dis. (1991) 35:93-99.

[26] Sheppard D.C., Rieg G., Chiang L.Y., Filler S.G., Edwards J.E., Jr., Ibrahim A.S., Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis, Antimicrob Agents Chemother. (2004) 48:1908-1911.
[27] Taylor J.J., Burroughs E.J., Experimental avian aspergillosis, Mycopathol Mycol Appl. (1973) 51:131-141.
[28] Tell L.A., Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine, Med Mycol. (2005) 43 Suppl 1:S71-73.
[29] The_R_Development_Core_Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, 2009.
[30] Thierry S., Wang D., Arne P., Deville M., De Bruin B., Nieguitsila A., Pourcel C., Laroucau K., Chermette R., Huang W., Botterel F., Guillot J., Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing of *Aspergillus fumigatus*, BMC Microbiol. (2010) in press.
[31] Van Cutsem J., Antifungal activity of enilconazole on experimental Aspergillosis in chickens, Avian Dis. (1983) 27:36-42.
[32] Van Cutsem J., Van Gerven F., Janssen P.A., Oral and parenteral therapy with saperconazole (R 66905) of invasive aspergillosis in normal and immunocompromised animals, Antimicrob Agents Chemother. (1989) 33:2063-2068.
[33] Walker, Aspergillosis in the ostrich chick, Union South Africa Department Agriculture Annual Report. (1915):535-574.

Figure 1. Protocol sequence.

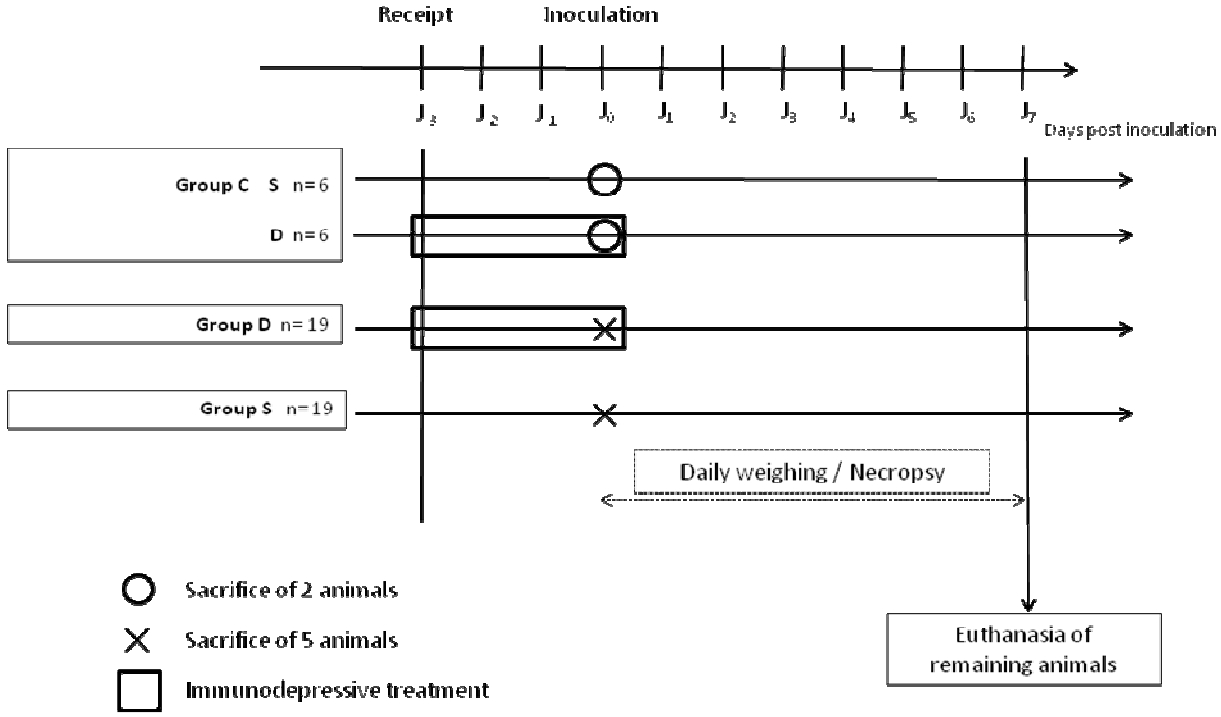


Figure 2. Mean weight variations of birds from set 1 (layer chickens) (left) and from set 2 (broiler chickens) (right), in control (grey triangles) and inoculated (black circles) animals, which were dexamethasone exposed (dashed line) or not (solid line).

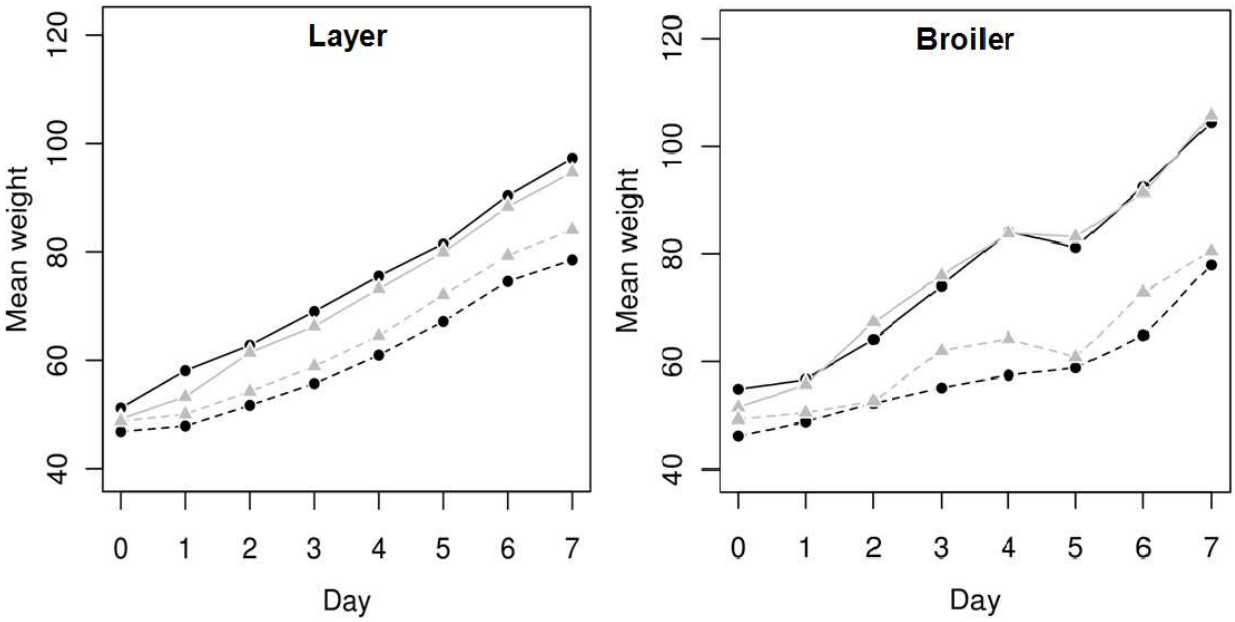


Figure 3. Survival time of groups D and S from set 2 (broiler chickens).

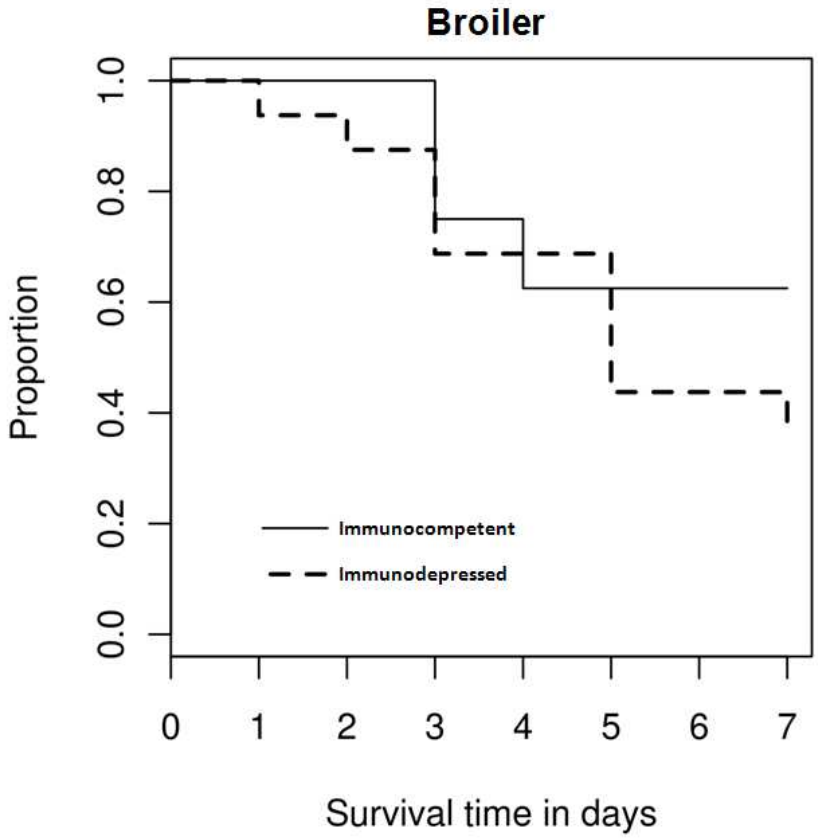
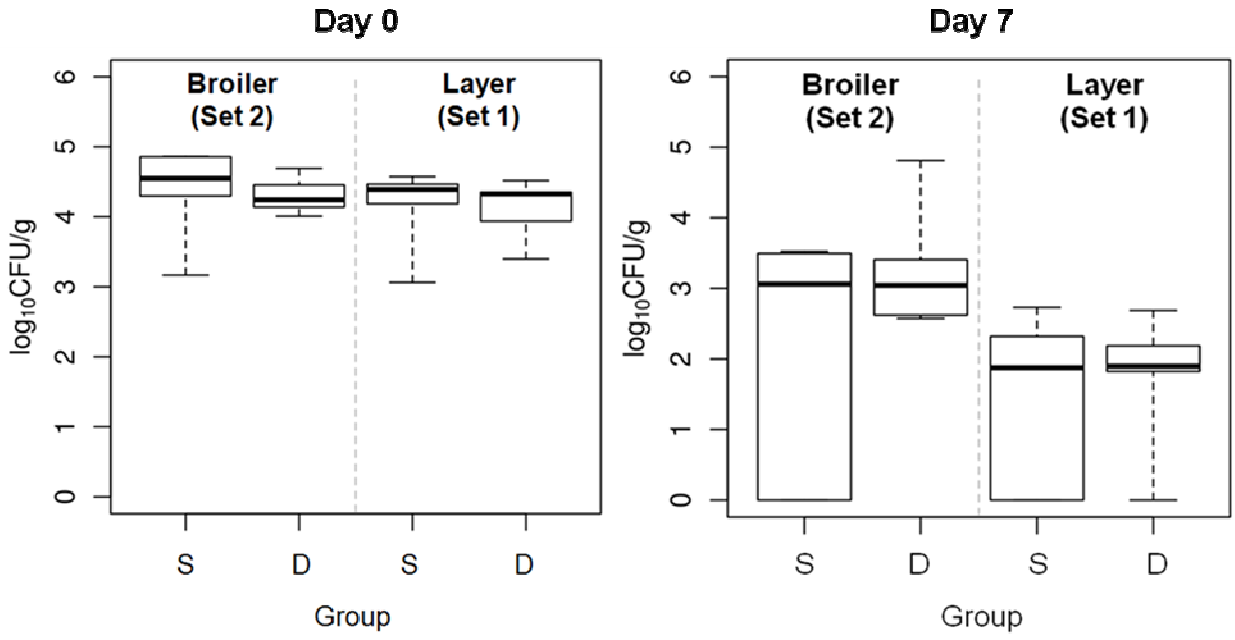


Figure 4. Number of CFU from the lung tissue 5 minutes after inoculation (day 0) and at 7 days post-inoculation (day 7).



2. Les modèles expérimentaux de chlamydiose (*C. psittaci*)

2.1. Modèles utilisant des mammifères

Seuls deux modèles utilisant des mammifères ont été développés pour *Chlamydophila psittaci.* Le premier fut décrit pour la souche M56 sur le lapin (Iversen *et al.*, 1976). Les animaux ont été inoculés par voie intraveineuse. L'infection a entraîné une forte perte de poids chez les animaux mais peu de mortalité, la bactérie a été retrouvée en plus grande quantité dans le système nerveux, le cœur et les reins. Dans le cadre de cette étude, trois souches de *C. psittaci* d'origine aviaire ont aussi été testées. Cependant, aucune mortalité n'a été observée.

Le second modèle « mammifère » décrit pour *C. psittaci* est le veau (*Bos taurus*) (Reinhold *et al.*, 2009). Dans cette étude, la voie d'inoculation a été la voie intra-pulmonaire. Sous anesthésie, les animaux ont reçu une injection dans huit bronches. L'inoculum utilisé allait de 10^6 à 10^9 UFI (Unité Formant Inclusion). Une augmentation des signes cliniques a été observée en fonction de l'augmentation de l'inoculum.

2.2. Modèles aviaires

Du fait de l'importance de la maladie chez les oiseaux d'élevages et d'agréments, plusieurs modèles aviaires ont été décrits pour *C. psittaci*. Le premier modèle aviaire été réalisé en 1959 par Page (Page, 1959). Des dindes ont été inoculées par aérosol ou voie orale. La souche utilisée par Page a depuis été typée comme appartenant au sérovar D (Andersen, 1991). Cette étude a démontré que, chez les dindes infectées par voie aérienne, les *Chlamydiae* étaient présentes dans les poumons, les sacs aériens et le sac péricardique 4 heures après l'inoculation. Dans les 48 heures suivant l'exposition, les *Chlamydiae* étaient présentes dans le sang, la rate, le foie et les reins. A 72 heures post inoculation, elles se trouvaient aussi dans la moelle osseuse, les organes reproducteurs et les muscles. Plus tard, les bactéries étaient retrouvées au niveau des cornets nasaux et du cloaque. Les animaux inoculés par voie orale n'ont montré aucun signe clinique.

Depuis, d'autres modèles expérimentaux aviaires de chlamydiose ont été décrits, notamment sur des oiseaux sauvages comme des étourneaux (*Sturnus vulgaris*), des Quiscales (*Quiscalus quiscula*), des vachers à têtes brunes (*Molothrus ater*), et des colombes incas (*Cardafella inca*) ainsi que des tourterelles (*Zenaidura macroura*), mais aussi et surtout sur des oiseaux d'élevages (Grimes *et al.*, 1979 ; Takahashi *et al.*, 1988). La principale espèce étudiée est la dinde (Page, 1959 ; Grimes *et al.*,

1979 ; Vanrompay *et al.*, 1999 ; Verminnen *et al.*, 2010), cependant des études ont aussi été menées sur le poulet (Takahashi *et al.*, 1988), sur des cailles (Takashima *et al.*, 1996) ainsi que sur certaines espèces de Psittacidés comme la perruche (*Melopsittacus undulatus*) (Harkinezhad *et al.*, 2009c) ou le perroquet (*Amazona viridigenalis*) (Gylstorff *et al.*, 1984).

Plusieurs inocula ont été testés lors de ces études allant de 10^2 à 10^8 bactéries injectées par animal (Takashima *et al.*, 1996 ; Vanrompay *et al.*, 1999).

Plusieurs voies d'inoculation ont aussi été testées chez les oiseaux comme la voie aérienne (Vanrompay *et al.*, 1999 ; Harkinezhad *et al.*, 2009c), la voie intra-sac aérien (Takahashi *et al.*, 1988), la voie orale (Takahashi *et al.*, 1988) et la voie parentérale (Vanrompay *et al.*, 2001).

Tous ces modèles furent décrits afin de caractériser la maladie et d'en étudier la physiopathologie. Pour certains, ils ont ensuite servis à tester l'efficacité de vaccin (Vanrompay *et al.*, 1999 ; Harkinezhad *et al.*, 2009c ; Verminnen *et al.*, 2010).

2.3. Mise au point d'un modèle de portage intestinal chez le canard mulard

En élevage de dindes, les infections à *C. psittaci* sont responsables de pertes de poids chez les oiseaux, de saisies à l'abattoir et de mortalités entrainant des pertes économiques (Anderson *et al.*, 1978 ; Andersen et Vanrompay, 2003). A ce titre, des modèles expérimentaux d'infections respiratoires pour cette espèce sont à l'heure actuelle bien documentés (Vanrompay *et al.*, 1994, 1995b ; Van Loock *et al.*, 2006 ; Harkinezhad *et al.*, 2009c).

La problématique posée par ce pathogène dans les élevages de canards est bien différente. En effet, chez le canard, l'infection se caractérise par un portage intestinal asymptomatique très répandu, notamment pour la filière canard gras (Léon *et al.*, 2004 ; Guérin *et al.*, 2006). Le problème est surtout un problème de santé publique en raison des nombreux cas humains de psittacoses déplorés, dont certains sévères, en lien avec ce type d'élevage (Hinton *et al.*, 1993 ; Laroucau *et al.*, 2009a ; Harkinezhad *et al.*, 2009b). L'origine de cette contamination est mal connue. En effet, la part des transmissions verticale et horizontale dans le développement de cette infection est encore mal évaluée. Aussi, l'excrétion massive des animaux observée, pour certains lots, alors qu'ils sont sur les parcours suggère un éventuel rôle de l'environnement dans la transmission de l'infection.

Le port d'Equipements de Protection Individuelle (EPI) est très largement conseillé dans le milieu professionnel pour limiter les risques d'exposition des personnes au contact des animaux excréteurs. Toutefois, le port de ces EPI se révèle parfois difficile au regard des conditions de travail.

Pour réduire le niveau d'excrétion des animaux, des traitements antibiotiques peuvent être mise et place. Cependant, leur utilisation dans le cadre du traitement prophylactique des animaux est difficilement envisageable étant donné le nombre important de lots qu'il faudrait traiter et les conséquence que cela pourrait avoir sur 'apparition de résistance aux molécules utilisées. Ce phénomène à dores et déjà été décrit en élevage de porcs, pour des souches de *C. suis* devenues résistantes aux tétracyclines (Andersen et Rogers, 1998b ; Lenart *et al.*, 2001 ; Di Francesco *et al.*, 2008 ; Sandoz et Rockey, 2010).

Pour mettre en place des actions visant à réduire l'excrétion, il y a une réelle nécessité de comprendre comment se développe l'infection au sein d'un lot. Les objectifs de cette première étude expérimentale ont été de vérifier si l'administration orale d'une suspension de *C. psittaci* permettait de reproduire ce qui était observé en élevage, c'est à dire un portage asymptomatique (excrétion de la bactérie, sans aucun signe clinique) et si une contamination inter-animale était possible.

2.3.1. Matériels et méthodes

2.3.1.1. Inoculum

La souche utilisée pour l'expérimentation, est une souche de *C. psittaci* appartenant au génotype E/B (souche 06-859). Cette souche a été isolée par culture sur œufs embryonnés de poules à partir d'un écouvillon cloacal prélevé sur un canard ne présentant pas de signes cliniques particuliers. L'inoculum a été préparé à partir de membranes vitellines qui ont été au préalable broyées à l'aide de billes avec du milieu 2SP complet (milieu Sucrose Phosphate 2X additionné de vancomycine, gentamycine, amphotéricine B et de Sérum de Veau Fœtal). Après, une centrifugation à 2000 rpm pendant 10 min, le surnageant a été aliquoté et congelé à -80°C. Les dilutions des inocula ont ensuite été faites extemporanément (1/100 et 1/10000) en PBS.

2.3.1.2. Animaux

Un total de 176 canetons mulards conventionnels non sexés âgés de 4 jours ont été utilisés pour cette étude. Les canetons ont été répartis en 3 groupes de 50 animaux (Groupes 1, 2 et 3) et un groupe contrôle de 26 animaux (Société Eclosion – Couvoir de Saint Branchs, Saint Branchs, France).

2.3.1.3. Protocole expérimental

Les animaux des groupes 1, 2 et 3 ont été confinés dans trois cellules séparées de l'animalerie A3 de l'INPREST (INRA Tours, France). Les 26 animaux constituant le groupe contrôle ont été hébergés à l'extérieur des installations protégées.

Au sein des groupes 1, 2 et 3, 43 animaux ont été inoculés avec respectivement, l'inoculum pur, l'inoculum dilué au 1/100ème (10^{-2}) ou l'inoculum dilué au 1/10000ème (10^{-4}). L'inoculation orale a été effectuée par gavage de 200 µL d'inoculum. Les 7 animaux restants dans chaque groupe (animaux sentinelles) ont été bagués et ont reçus 200 µl de PBS. Ces animaux ont été placés au contact des autres animaux inoculés afin de rendre compte d'une éventuelle contamination inter-animale.

Ensuite, 7 animaux inoculés de chaque groupe ont régulièrement été sacrifiés à J1, J4, J7 et J10 post infection. Les animaux sentinelles (non inoculés) ont été sacrifiés à J10 ainsi que 7 animaux du groupe contrôle (figure 42).

Avant l'inoculation, 14 canetons contrôles ont été sacrifiés (animaux âgés de 4 jours) afin de rendre compte du statut initial des animaux vis-à-vis de *C. psittaci*.

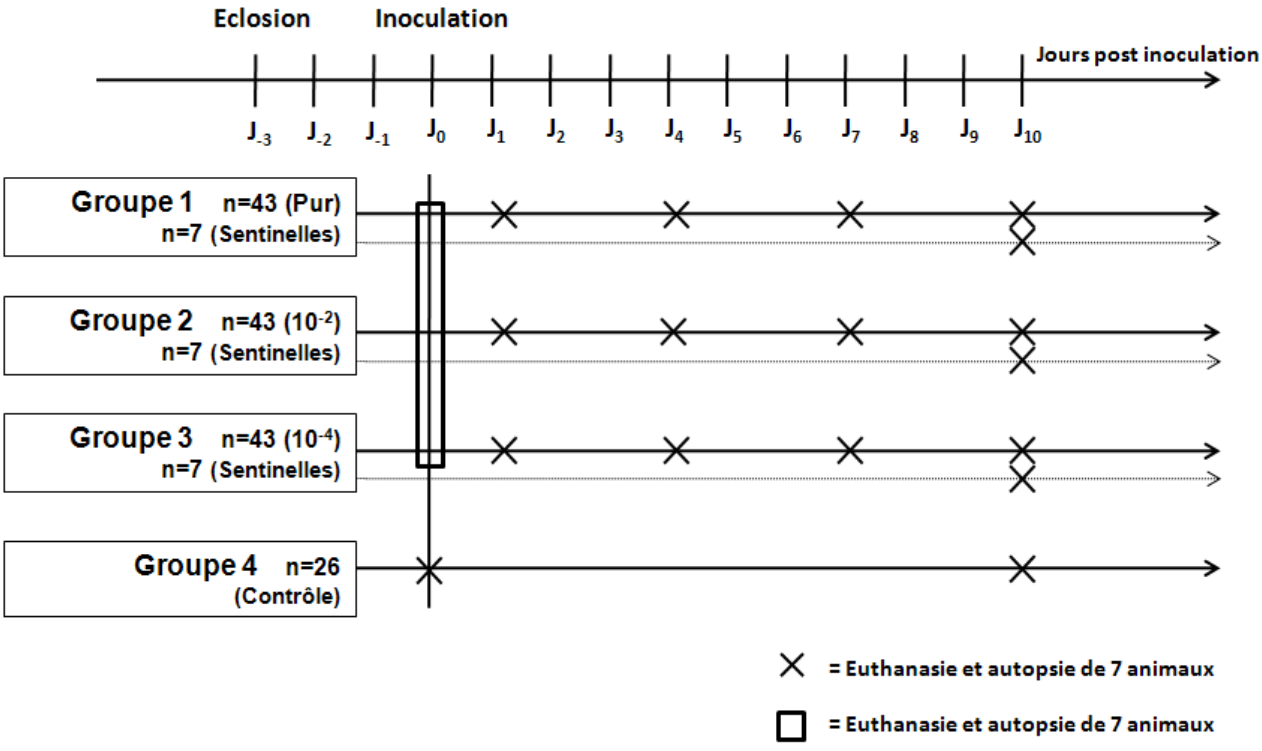


Figure 42. Chronologie du protocole.

2.3.1.4. Autopsies

Sur chacun des animaux sacrifiés, une autopsie a été pratiquée après la réalisation d'un écouvillonnage cloacal. Les organes suivants ont été prélevés : la rate, le foie, les poumons ainsi que différentes parties de l'intestin (le duodénum, le jéjunum, l'iléum, le cæcum et le rectum) (figure 6). Les prélèvements ont été conservés à -20°C jusqu'à leur analyse.

2.3.1.5. Traitement des échantillons par PCR

Chacun des organes a été pesé. Après extraction à l'aide du kit QIAmpDNA mini kit (protocole « tissue », Qiagen, Courtaboeuf, France), l'ADN a été élué dans 200 µl de tampon d'élution.
Les écouvillons ont été traités avec le même kit mais selon le protocole « swab » et l'ADN a été élué dans 150 µl de tampon d'élution.
Les ADN extraits ont été analysés à l'aide d'une PCR en temps réel (Ehricht et al., 2006). Cette PCR se base sur la détection d'une séquence du gène de l'ARN ribosomal 23S et utilise les amorces Ch23S-F (5'-CTGAAACCAGTAGCTTATAAGCGGT-3'), Ch23S-R (5'-ACCTCGCCGTTTAACTTAACTCC-3'), et la sonde Ch23S-p (FAM-5'-CTCATCATGCAAAAGGCACGCCG-3'-TAMRA). Chaque mélange réactionnel comprend 2 µL d'ADN à tester, 10 µL de Universal Mastermix 2X (Applied Biosystems), 0.5 µL de chaque amorce (25 µM), 2 µL de sonde (1 µM), et 5 µL d'eau. Le protocole d'amplification était le suivant : 95°C pendant 10 min puis 50 cycles comprenant une étape à 95°C pendant 15 s et une étape à 60°C pendant 60 s.
L'utilisation d'une gamme d'ADN titrée lors de chaque PCR a permis de quantifier le nombre de copies de génomes présents dans chaque échantillon. Cette valeur a ensuite été ramenée au poids de chacun des organes et un nombre de copies de génomes de *Chlamydiaceae* par gramme d'organe (Nb de copies/g) a ainsi pu être attribué à chacun des prélèvements. Dans le cas des écouvillons, le résultat correspond au nombre de copies de génomes de *Chlamydiaceae* par écouvillon (Nb de copies/écouvillon).

2.3.1.6. Culture des isolats sur œufs

Afin de vérifier la viabilité des bactéries détectées chez les animaux inoculés, les cæca des animaux du lot pur à J10 ont été mis en culture.
Ces prélèvements ont été broyés à l'aide de billes avec du milieu 2SP complet. Après, une centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min, le surnageant a été prélevé puis additionné de

vancomycine, streptomycine, kanamycine et de nystatine. Le mélange a ensuite été inoculé à 5 œufs de poules embryonnés. Les œufs ont été mirés quotidiennement. La membrane vitelline des embryons morts a été analysée par PCR.

2.3.1.7. Séquençage partiel du gène ompA

Le gène *ompA* des souches isolées a été partiellement séquencé à l'aide des amorces 5GPF (5'-ACGCATGCAAGACACTCCTCAAAGCC-3') et 3GPB (5'-ACGAATTCCTAGGTTCTGATAGCGGGAC-3') (Kaltenboeck *et al.*, 1993). La PCR a été réalisée dans un volume de 50 µl, contenant 5-10 ng d'ADN, 1 X de tampon de PCR, 1 Unité de Hot start Taq DNA polymerase (Qiagen), 0.25 µM de chaque dNTP (deoxynucleotide triphosphate) et 0.5 µM de chaque amorce. Le cycle de température utilisé comprenait une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 min suivie de 45 cycles consistant en une dénaturation à 95°C pendant 30 s, une hybridation des amorces à 59°C pendant 1 min, et une élongation à 72°C pendant 1 min 30 s. Une élongation finale de 10 min à 72°C a été réalisée. Les échantillons ont été purifiés à l'aide du QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), et séquencés par Europhins MWG Operon.

2.3.1.8. Analyse statistique

Chez les animaux inoculés, la relation entre le nombre de copies de génomes et le type de prélèvement (organe ou écouvillon) ainsi qu'avec la dose inoculée a été analysée. Ces relations ont été analysées séparément chez les animaux sacrifiés à J1, J4, J7 et J10 PI, grâce à quatre modèles linéaires mixtes. La variable à prédire était le $\log_{10}$ du nombre de copies de génome. Les variables étudiées étaient le type de prélèvement (l'un des huit organes étudiés ou l'écouvillon) et la dose inoculée (codée comme une variable qualitative à trois classes: inoculum pur, dilué à 10^{-2} ou dilué à 10^{-4}). La corrélation entre les prélèvements issus d'un même animal a été prise en compte en définissant l'individu comme variable aléatoire.

Le nombre de copies de génomes J10 PI obtenu chez les animaux inoculés a été comparé avec celui obtenu chez les animaux sentinelles. A cet effet, un modèle linéaire mixte a été utilisé. La variable à prédire était le $\log_{10}$ du nombre de copies de génomes. Les variables explicatives étaient l'organe (même codage que ci-dessus); le fait que l'animal ait été inoculé ou pas (variable binaire, oui/non); ainsi que la dose (pour les animaux inoculés: la dose inoculée; pour les animaux contacts : la dose inoculée aux canetons avec lesquels ils ont été mis en contact) (même codage que ci-dessus). Là

encore, la corrélation entre les prélèvements issus d'un même animal a été prise en compte en définissant l'individu comme variable aléatoire.

2.3.2. Résultats

2.3.2.1. Signes cliniques

Après l'inoculation, aucun signe clinique n'a été observé chez les animaux hormis une légère diarrhée pour les animaux du groupe 1 (inoculum pur). Aucune lésion n'a été observée lors des autopsies, pour aucun des lots.

2.3.2.2. Analyse PCR sur les organes

Analyse moyenne des organes

La moyenne du nombre de copies de génomes de *Chlamydiaceae* de tous les organes et de tous les animaux pour chacun des groupes a été faite. Sur la période étudiée (10 jours PI), une augmentation du nombre de copie de génomes a été observée pour les trois groupes, témoignant d'une multiplication bactérienne au sein de l'animal, après l'administration orale (figure 43).

Un effet dose est observé sur le développement de l'infection. En effet, pour les animaux inoculés avec la dose la plus concentrée (inoculum pur), la valeur maximum de nombre de copies de génomes est atteinte dès J4 PI, alors que pour les animaux inoculés avec les doses 10^{-2} et 10^{-4}, elle n'est atteinte respectivement qu'à J7 et J10 PI.

L'analyse des organes des animaux sentinelles (notés C) sacrifiés à J10 PI a mis en évidence un niveau de contamination équivalent à celui observé chez les animaux inoculés pour les 3 groupes ($p = 0.09$) (figure 43).

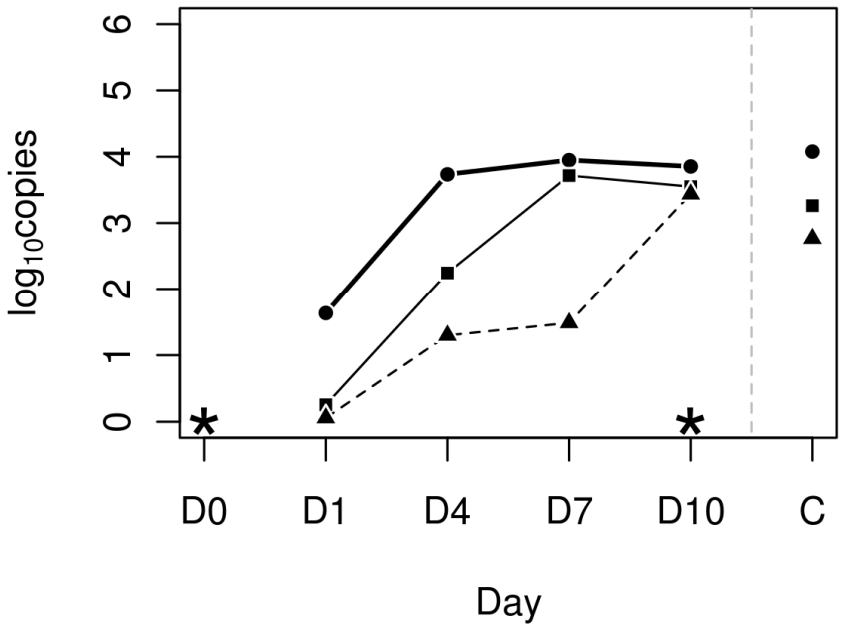


Figure 43. Cinétique de contamination des animaux par lots (rond : inoculum pur, carré : inoculum dilué à 10^{-2}, triangle : inoculum dilué à 10^{-4}) en fonction du temps. (C) Animaux sentinelles à J10. (*) Animaux contrôles.

Analyse par organe

La comparaison de la charge bactérienne des différents organes en fonction des groupes et du temps a été effectuée (figure 44). Une distribution inégale de la charge bactérienne a été observée au sein de l'organisme hôte. En effet, une forte contamination de la rate, du foie ainsi que du tractus intestinal « inférieur » (*i.e.* iléum, cæcum et rectum) a été observée, alors que celle des poumons et du tractus intestinal « supérieur » (*i.e.* duodénum et jéjunum) s'est révélée en moyenne 10 fois moindre. Le cæcum est significativement l'organe le plus contaminé ($p<0.001$) quelque soit le lot, et le statut des animaux (infectés ou sentinelles). La distribution de la charge bactérienne entre les animaux inoculés et les sentinelles est comparable pour l'ensemble des organes.

Aucune *Chlamydiaceae* n'a été détectée dans les organes des animaux contrôles sacrifiés à J0 et J10 PI (figure 44).

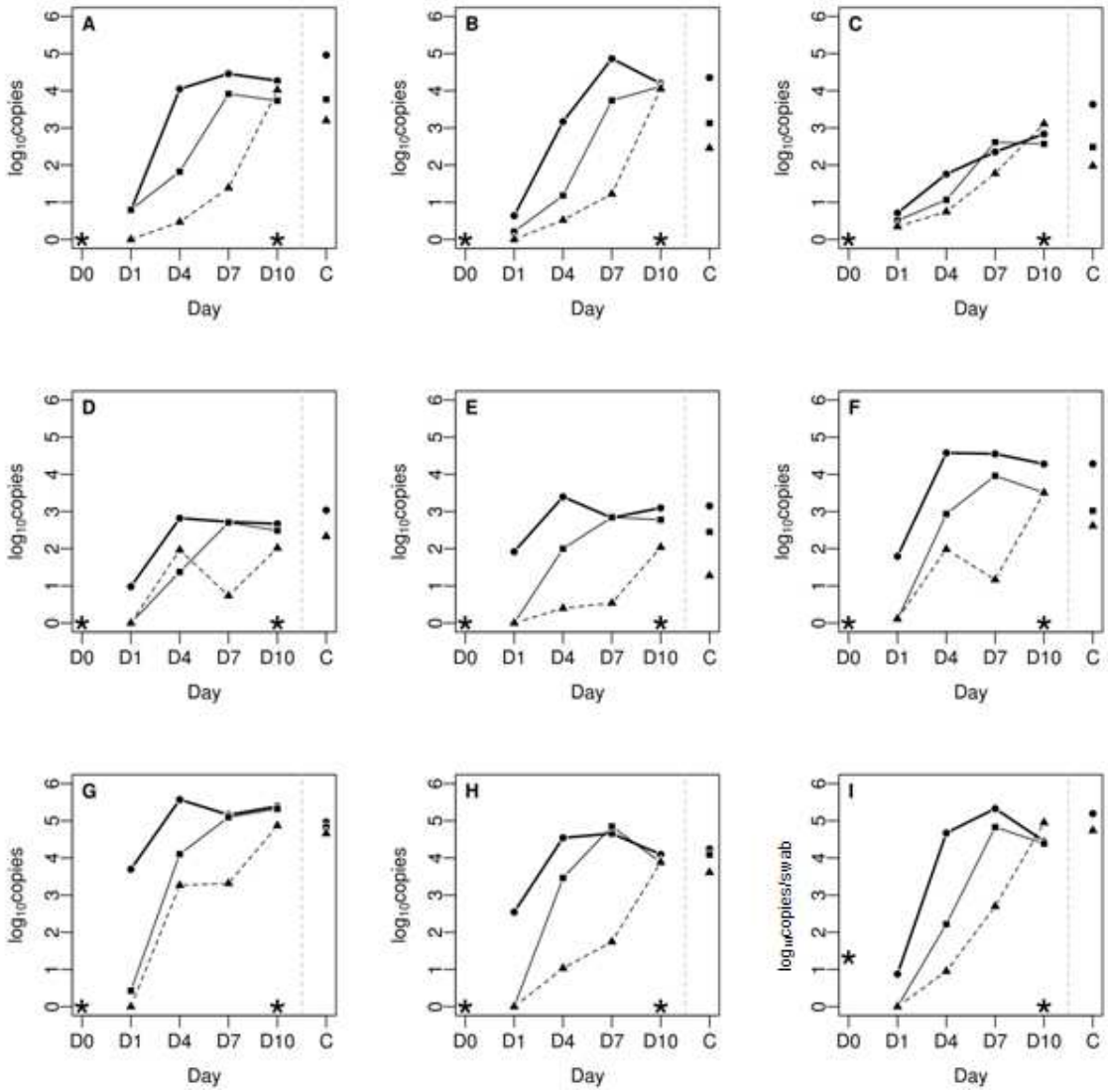


Figure 44. Evolution de la contamination des organes en fonction de la dose inoculée (rond : pur, carré : 10^{-2}, triangle : 10^{-4}) et du temps. A : Rate ; B : Foie ; C : Poumon ; D : Duodénum ; E : Jéjunum ; F : Iléum ; G : Cæcum ; H : Rectum ; I : Ecouvillon cloacal.

(C) Animaux sentinelles à J10. (✱) Animaux contrôles.

Analyse des écouvillons

L'analyse des écouvillons cloacaux effectués sur les animaux avant l'inoculation (n=14) a mis en évidence la présence de *C. psittaci*, à un faible taux, chez la plupart d'entre eux (11/14). Le séquençage partiel du gène *ompA* à partir d'un de ces prélèvements (le seul ayant un titre suffisant pour envisager un séquençage) a révélé une séquence identique à celle de la souche inoculée (génotype E/B, sous génotype 06-859).

Les écouvillons cloacaux réalisés à J10 PI sur les animaux du lot contrôle se sont tous révélés négatifs excepté un animal très légèrement positif.
Pour les lots inoculés, l'excrétion cloacale observée pour chacun des lots reflète fidèlement ce qui a été observé au niveau des organes.

2.3.2.3. Réisolement de la souche et caractérisation moléculaire

Les 7 cæca collectés à partir des animaux du lot 1 à J10 PI et à partir des animaux sentinelles du lot 1 à J10 PI ont été inoculés à des œufs embryonnés de poules. Trois souches ont été réisolées à partir de chacun de ces deux lots d'animaux.
Les séquences du gène *omp*A de ces 7 isolats étaient identiques à la séquence de la souche inoculée (séquence E/B_06-859).

2.3.3. Discussion

La souche de *C. psittaci* utilisée pour cette étude a été isolée à partir d'un canard ne présentant pas de signes cliniques lors d'une enquête menée dans un élevage suite à un cas de contamination humaine (Laroucau *et al.*, 2009). L'inoculation de cette souche par voie orale à des canetons mulards âgés de 4 jours a permis d'induire une multiplication de la bactérie au sein de l'hôte. Aucun signe clinique ni aucune lésion n'ont été observés chez les animaux durant cette expérimentation, quelle que soit la dose de l'inoculum, signifiant le développement d'une infection asymptomatique.
Un impact de la dose inoculée sur le développement de l'infection a été démontré. En effet, pour les animaux inoculés avec la dose la plus concentrée (inoculum pur), la valeur maximum de nombre de copie de génomes a été atteinte dès J_4 PI, alors que pour les animaux inoculés avec les doses 10^{-2} et 10^{-4}, elle ne l'a été respectivement qu'à J_7 et J_{10} PI. L'analyse des écouvillons a aussi montré des résultats comparables à la contamination observée dans les organes. Ces dernières données confirment la pertinence de la réalisation d'un tel prélèvement afin de d'étudier l'excrétion chez un animal infecté par *C. psittaci*.
L'analyse des organes a mis en évidence une distribution anatomique de la charge bactérienne inégale au sein de l'hôte. En effet, les résultats ont montré une présence de la bactérie dans tous les organes testés mais à des niveaux différents. En effet, une forte contamination de la rate, du foie ainsi que du tractus intestinal « inférieur » (*i.e.* iléum, cæcum et rectum) a été observée, alors que

celle des poumons et du tractus intestinal « supérieur » (*i.e.* duodénum et jéjunum) s'est révélée en moyenne 10 fois moindre.

Quelle que soit la dose inoculée, l'organe le plus contaminé a été le cæcum, et ce à tous les temps d'analyse. Cette observation montre la proximité de ce modèle avec les infections à *Salmonella enteritidis* décrites chez le poulet (Duchet-Suchaux *et al.*, 1995, 1997) ou encore avec les infections à *Chlamydia suis* décrites chez le porc (Guscetti *et al.*, 1998). Les modèles de portage développés pour les salmonelles chez le poulet ont démontré un fort taux de contamination de la rate, du foie et des cæca associé à une persistance accrue de la bactérie dans ces organes en comparaison des autres organes testés. Dans les modèles de portage porcin de *C. suis* la charge bactérienne a aussi montré une localisation prééminente au niveau du petit intestin.

L'introduction d'animaux sentinelles dans chacun des lots a permis de constater qu'à 10 jours PI, ceux-ci sont tout autant excréteurs et contaminés que les animaux inoculés. La transmission à d'autres animaux se fait donc très rapidement. Une cinétique d'abattage des animaux contacts dans le futur pourrait permettre de définir avec précision leur contamination. Dans de futures expérimentations, il pourrait être intéressant de n'inoculer qu'un nombre restreint d'animaux (inverser la proportion par exemple) et voir les mécanismes de diffusion.

Avant l'inoculation, certains animaux se sont révélés faiblement excréteurs. Ces animaux étant conventionnels (*i.e.* non EOPS), la contamination a pu avoir lieue via la mère (transmission verticale transovarienne) (Guérin *et al.*, 2006). Cependant, les analyses à 10 jours PI n'ont pas montré de fort niveau d'excrétion comme observé chez les animaux inoculés. Des analyses menées à 4 et 12 semaines PI (données non montrées) chez les animaux survivants issus du lot contrôle, ont mise en évidence un seul animal très faiblement positif à l'âge de 4 semaines et aucun animal excréteur à l'âge de 12 semaines. Cette charge bactérienne initiale détectée n'a donc pas été suffisante pour entrainer le développement d'une infection et un portage, les résultats obtenus sur les lots contrôles à partir des organes notamment en atteste. Cette transmission verticale n'est pas rare, une étude a mis en avant une contamination de 20 % des canetons issus d'un parquet de reproducteurs dont 5 femelles sur 20 présentaient une charge bactérienne modérée (Guérin *et al.*, 2006).

Les souches ré-isolées des organes ont présenté, sur la base de la séquence partielle gène *omp*A, les mêmes caractéristiques de la souche inoculée. La souche détectée chez les animaux contrôles avant inoculation s'est avérée indifférentiable de la souche inoculée.

Une partie de chaque organe prélevé a été conservée afin de mener des analyses histologiques. Ces analyses permettront d'étudier la réponse cellulaire précise de l'hôte vis-à-vis de l'agent pathogène.

Le niveau de contamination s'est révélé uniforme au sein de chacun des groupes, la charge bactérienne étant équivalente pour l'ensemble des animaux de chacun des groupes.

L'inoculum a été aliquoté et conservé à -80°C. Un titrage par la technique des plages de lyse (Rodolakis *et al.*, 1977) sera très prochainement réalisé.

Lors de cette étude, le temps d'expérimentation a été limité à 10 jours afin d'étudier les phases précoces de l'infection (ce temps a aussi été déterminé en fonction de ce qui se faisait chez Salmonella). il serait intéressant d'étudier l'évolution de l'infection à *C. psittaci* sur une plus longue durée, le niveau d'excrétion semblant décroitre dans le temps chez les animaux naturellement infectés.

Cette étude a été réalisée sur des canetons. En raison de la différence d'immunité existante entre les jeunes oiseaux et les adultes (Ask *et al.*, 2007), il serait intéressant d'étudier le développement de l'infection chez des oiseaux adultes et voir si l'infection se met en place d'une façon comparable.

La dose infectante la plus adéquate semble donc correspondre à l'inoculum 10^{-2}. En effet, cette dose permet d'obtenir un développement bactérien autorisant une bonne observation du déroulement de l'infection (qui s'installe doucement, et ne sature pas trop vite).

En conclusion, cette étude a permis de reproduire un portage intestinal sans signe clinique apparent de *Chlamydophila psittaci* chez le canard mulard, ce qui est comparable aux observations faites en élevage. Une meilleure connaissance des modes de transmission de ce pathogène au sein des élevages de canards pourrait fournir de nouveaux moyens de luttes. Ce modèle animal pourrait aussi être utilisé dans le cadre de l'évaluation de traitements ou de vaccins visant à abaisser le niveau d'excrétion par les canards afin de limiter l'exposition des professionnels, des congénères et éventuellement, de la faune sauvage.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le premier objectif de ce travail de thèse a consisté à étudier la diversité génétique d'isolats d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydophila psittaci* provenant d'élevages avicoles. La technique MLVA a été appliquée pour les deux pathogènes et s'est révélée discriminante, facile à mettre en œuvre, stable et reproductible.

Le second objectif a été de mettre au point des modèles d'infection expérimentale permettant de reproduire le plus fidèlement possible l'infection des oiseaux par *Aspergillus fumigatus* ou *Chlamydophila psittaci*.

1. Diversité génétique d'*Aspergillus fumigatus*

Lors du travail de thèse, nous avons décrit une nouvelle méthode de typage d'*Aspergillus fumigatus* basée sur le polymorphisme de 10 marqueurs VNTR. La méthode MLVA s'est révélée très discriminante et a permis un regroupement intéressant des génotypes. L'analyse par MST (*Minimum Spanning Tree*) des 255 génotypes obtenus à partir des 330 isolats examinés, a permis de mettre en évidence trois clusters principaux. Un premier cluster inclut la plupart des isolats collectés sur des oiseaux en France, un second cluster contient la majorité des isolats provenant de Chine et enfin un troisième cluster comprend la plupart des isolats collectés dans un couvoir français. Il existe donc un regroupement des génotypes en fonction de l'origine géographique des isolats. Cependant, l'analyse n'a pas permis de différencier les génotypes correspondant à des isolats provenant d'élevages du même département en France ou de la même province en Chine. Ces résultats suggèrent donc un regroupement géographique des isolats à une échelle assez large.

Afin de confirmer ce regroupement et d'évaluer la « limite de discrimination géographique » de la MLVA, il est nécessaire de typer des isolats provenant d'autres origines plus ou moins éloignées. Il serait également intéressant de vérifier la stabilité des « profils géographiques » au cours du temps. Pour cela, il faudrait recueillir des isolats dans des élevages d'une même région plusieurs années de suite.

Aux vues des résultats obtenus pour *A. fumigatus,* il est sans doute possible de développer une méthode de typage MLVA pour les autres espèces du genre *Aspergillus*. Parmi toutes les espèces décrites, *A. flavus* serait le tout premier candidat. En effet, *A. flavus* la deuxième espèce mise en cause lors d'aspergillose chez l'homme en Europe et elle semble prépondérante en Arabie Saoudite, en Tunisie et dans plusieurs autres pays africains (Hadrich *et al*., 2010). Par ailleurs, *A. flavus* est capable de produire des aflatoxines (Hesseltine *et al.*, 1966) et il pourrait être intéressant de définir des VNTR en rapport avec la mycotoxinogénèse.

Une perspective possible du travail de thèse serait de comparer les résultats du typage MLVA avec ceux d'autres méthodes telles que les microsatellites et le CSP-typing. L'analyse du polymorphisme des microsatellites demeure la méthode la plus utilisée dans le cadre d'études épidémiologiques. Elle bénéficie d'un pouvoir discriminant très élevé (De Valk *et al.*, 2008). Une étude a aussi montré la capacité de cette technique à regrouper les génotypes en fonction de leur origine (Balajee *et al.*, 2008). Le CSP-typing est une méthode plus récemment décrite qui, bien que moins discriminante que les microsatellites, s'est relevée capable de regrouper les génotypes en fonction de leur origine épidémique avec un lien très fort avec les résultats de la RFLP *Afut1* (Balajee *et al.*, 2007).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons démontré la présence d'une insertion de 450 pb au sein du marqueur Asp_20 chez certains isolats. Cette insertion correspond à un gène codant pour une endonucléase. Cette séquence semble donc être un transposon, c'est-à-dire une séquence ADN capable de se cliver et de se réinsérer à d'autres endroits du génome. Une caractérisation plus précise de cette séquence et de son rôle biologique est souhaitable.

Trois des 10 marqueurs VNTR sélectionnés se localisent dans des régions codantes de gènes. Il serait donc intéressant de déterminer l'impact de la variation du nombre de répétition dans ces marqueurs sur le génome, les protéines générées et donc sur la biologie du champignon.

D'autre part, lors du travail de thèse, nous avons évalué l'intérêt de la MLVA pour *A. fumigatus* dans le cadre d'une enquête épidémiologique au sein d'un couvoir de dindes. Les résultats du génotypage des isolats collectés dans cet environnement ont permis de répondre à plusieurs questions concernant l'impact des protocoles de désinfection sur la contamination, le mode de circulation des isolats au sein du bâtiment ou encore le lien possible entre les isolats environnementaux du couvoir et des isolats issus d'animaux provenant du couvoir.

Afin de confirmer l'intérêt de la méthode MLVA dans le cadre d'études épidémiologiques, il serait intéressant de mener d'autres études notamment au sein d'élevages régulièrement exposés à une contamination massive ou régulière par *A. fumigatus*.

2. Diversité génétique de *Chlamydophila psittaci*

Pour *Chlamydophila psittaci,* la technique MLVA mise au point lors du travail de thèse repose sur la détection de 8 marqueurs VNTR répartis sur l'ensemble du génome de la bactérie. Au total, 170 isolats ont été examinés ce qui a permis de définir 20 génotypes différents. La technique MLVA s'est avérée plus discriminante que les méthodes décrites précédemment (le sérotypage et PCR-RFLP). Cependant, la MLVA n'a pu différencier dans tous les cas les isolats de génotype PCR-RFLP B et E. Par ailleurs, le profil MLVA obtenu pour le génotype PCR-RFLP E/B est identique à celui obtenu pour le génotype PCR-RFLP C. A partir des profils MLVA, l'analyse par UPGMA a conduit à un regroupement

intéressant des profils MLVA. Les isolats de sérotype/génotype PCR-RFLP A sont regroupés, ainsi que les deux isolats de sérotype/génotype PCR-RFLP D et enfin le seul sérotype/génotype PCR-RFLP H testé se trouve dans une branche séparée des autres. On note également que 22 des 26 isolats de sérotype/génotype PCR-RFLP B sont regroupés au sein d'une seule et même branche de l'arbre.

La grande majorité des isolats examinés lors du travail de thèse appartient au génotype A (122/170). La forte proportion de ce génotype, le plus souvent isolé lors de diagnostic de chlamydiose chez les Psittacidés, peut introduire un problème de sur-représentation dans notre analyse. Pour la suite de ce travail de thèse, il conviendrait donc d'inclure un plus grand nombre de souches appartenant aux autres génotypes

Il serait aussi intéressant de comparer les résultats obtenus grâce à la MLVA avec d'autres méthodes de génotypage comme la MLST ou encore le séquençage de la MOMP sur un grand nombre d'échantillons. Récemment, l'application de la technique MLST, technique basée sur l'analyse des séquences de 7 gènes de ménage, à l'espèce *C. psittaci* a mis en avant un lien entre les génotypes et l'hôte (Pannekoek *et al.*, 2010). Ce type de regroupement des génotypes s'avère tout à fait concordant avec les résultats obtenus grâce à la technique MLVA. Cette étude a aussi permis d'avancer des hypothèses évolutives sur ce pathogène, notamment sur l'adaptation à son hôte. C'est une méthode précise qui apporte des informations représentatives au niveau génomique.

Quant à la technique basée sur le séquençage du gène codant la protéine MOMP, elle apporte des informations sur la biologie de la bactérie puisque cette protéine est fortement immunogène et semble très importante dans la spécificité d'hôte des différentes souches de *C. psittaci* (Kaltenboeck *et al.*, 1993). Cette étude précise de la MOMP peut aussi être apportée grâce à la technique des Microarray (Sachse *et al.*, 2008). Cette méthode a permis de décrire des sous génotypes non différentiables par la technique MLVA.

La MLVA permet de connaitre rapidement un génotype basé sur d'autres zones du génome, majoritairement codantes, variables mais dont l'implication biologique est difficilement estimable. Cette méthode est rapide et peu onéreuse mais semble apporter des résultats moins précis que la MLST. Aux vues de toutes ces caractéristiques ces différentes méthodes s'avèrent complémentaires.

La majorité des marqueurs VNTR définis lors du travail de thèse se situe dans des gènes codant pour des protéines membranaires. Il serait donc intéressant de déterminer si un lien existe entre les génotypes et certaines particularités biologiques, comme une chimiorésistance ou la virulence. Cette implication d'une séquence répétée en tandem dans la biologie, notamment la virulence, de *Chlamydophila pecorum* a été mise en avant par Yousef Mohamad *et al.* (Yousef Mohamad, 2008).

3. Infection expérimentale à *Aspergillus fumigatus*

Pour s'approcher des conditions « naturelles » de contamination dans les élevages, il nous est apparu intéressant de mettre au point un modèle d'inoculation des oiseaux par un aérosol de conidies. Ce type d'inoculation permet une meilleure distribution des conidies dans le tractus respiratoire en comparaison des autres voies d'inoculation utilisée (intra-sac aérien, intra-pulmonaire, etc.). Par ailleurs, ce type d'inoculation permet d'intégrer toutes les étapes d'une contamination dite « naturelle » y compris les mécanismes de défense présents dans les cavités nasales et l'appareil respiratoire supérieur (Hayter et Besch, 1974).

L'inoculation par voie aérienne s'est révélée reproductible, standardisable et efficace pour l'obtention d'une aspergillose aiguë chez l'oiseau. Nous avons testé l'impact de deux paramètres : le statut immunitaire de l'hôte et la lignée de poulets. Les résultats obtenus montrent un fort impact de la lignée sur l'apparition de la maladie puisque aucune mortalité n'a été observée dans la lignée pondeuse alors que plus de 50 % de mortalité a été observée dans la lignée poulets de chair. Au sein de cette dernière, un effet de l'immunodépression a été démontré. L'immunodépression a aussi entrainé un changement de chronologie dans l'apparition de la mortalité dans les groupes. En effet, avec les poulets de chair immunodéprimés, la mortalité été observée sur les 7 jours de l'expérimentation alors que chez les animaux de cette même lignée mais immunocompétents, la mortalité est survenue dans un intervalle de 2 jours seulement. L'utilisation de la technique MLVA développée précédemment pour *A. fumigatus* a permis de vérifier lors de cette étude que seule la souche inoculée était retrouvée chez les animaux.

Une des limites de ce travail a été le nombre d'animaux utilisés rendant certains résultats difficilement exploitables. Il serait donc intéressant de tester ce modèle sur un plus grand nombre d'animaux tout en respectant, autant que faire se peut, la règle des 3R. La seconde limite de ce travail a été l'absence d'analyse anatomopathologique. La mise en évidence des agents pathogènes dans les tissus est pourtant indispensable pour rendre compte de la pathogénie de l'infection et il faudra impérativement inclure l'analyse anatomopathologique lors de futures expérimentations.

Le modèle d'inoculation par voie aérienne a été créé dans le but de reproduire une infection « naturelle » et ce afin de tester des outils diagnostics ou valider des méthodes de lutte. Or dans le cadre de l'élevage avicole, les animaux les plus touchés par l'aspergillose sont les dindes (Kunkle, 2003). Il serait par conséquent très intéressant de transposer le modèle sur des poussins à des dindonneaux.

Il serait pertinent de comparer « l'efficacité » des conidies humides par rapport à celle des conidies sèches (qui sont inhalées par les oiseaux dans les conditions naturelles) dans le cadre de notre

modèle à l'image de ce qui a été fait par Klimes *et al.* (Klimes *et al.*, 1964). Pour cela, il faudra mettre au point un protocole permettant de démontrer les avantages et inconvénients de chaque inoculum. Une fois le modèle transposé à la dinde, les modes de traitement ou de prévention pourront être testés.

Le modèle d'infection expérimentale pourra aussi être utile dans le cadre du développement de nouveaux outils diagnostics de l'aspergillose aviaire. Lors du stage de master 2 de Guillaume Le Loc'h, la recherche de biomarqueurs par spectrométrie de masse a été effectuée à partir de sérums de dindes infectées expérimentalement par injection intra-sac aérien (Leloc'h *et al.*, 2006). Plusieurs biomarqueurs ont été détectés par spectrométrie (MALDI-TOF) après traitement des sérums avec des billes magnétiques fonctionnalisées : 13 pics avec les billes WCX, 12 avec les billes HIC 8, un avec les billes GLYCO. Parmi ceux-ci, un pic à 1630 Da a pu être partiellement séquencé et une forte homologie de séquence avec une protéine d'*A. fumigatus* a été détectée. Il conviendrait de confirmer ces résultats très encourageants avec des dindes infectées par voie aérienne.

Une autre perspective pourrait être l'utilisation du modèle aviaire dans le cadre d'inoculations avec un mélange de souches. L'utilisation conjointe du modèle animal et de la MLVA permettrait de suivre très précisément les étapes du développement des isolats et de savoir si certains isolats sont capables de s'imposer sur les autres. Un modèle utilisant un mélange de souches a été établi chez la souris (Sarfati *et al.*, 2002). Dans cette étude, 6 souches pigmentées ou non ont été inoculées simultanément à des souris. Des isolats ont ensuite été collectés à partir des animaux sacrifiés ou morts, puis testés par RFLP afin de déterminer quelle souche s'était majoritairement développée au sein de l'hôte. Cette étude a révélé que les souches sauvages n'avaient pas la même virulence (entre elles). Par ailleurs, les souches non pigmentées semblent moins virulentes que les souches sauvages (pigmentées).

4. Infection expérimentale à *Chlamydophila psittaci*

Au sein des élevages de canards en France, *C. psittaci* représente un problème de santé publique. En effet, l'exposition des personnels à des animaux infectés et excréteurs mais ne montrant aucun signe clinique constitue un risque microbiologique important. Récemment le risque de transmission des *Chlamydiaceae* des animaux d'élevage vers la faune sauvage a aussi été démontré (Lemus *et al.*, 2010). Afin de mieux caractériser ce problème, il nous est apparu indispensable de développer un modèle animal reproduisant le portage asymptomatique de la bactérie.

Lors du travail de thèse, nous avons évalué la possibilité de contamination par voie orale des oiseaux, l'impact de la dose inoculée ainsi que le développement de l'infection et sa localisation anatomique

chez les oiseaux. Enfin, en utilisant des animaux sentinelles placés au contact des animaux infectés, nous avons testé la possibilité de contamination inter-animale. Les résultats de cette étude ont montré que l'inoculation par voie orale était possible puisque qu'un développement bactérien a été observé chez les animaux en fonction du temps. De plus, un portage asymptomatique a bien été reproduit car aucun signe clinique n'a été observé et aucune lésion n'a été détectée à l'autopsie. Lors de cette étude, nous avons aussi observé un effet de la dose inoculée sur le développement bactérien. En effet, plus le titre bactérien de l'inoculum est élevé plus le développement de l'infection, caractérisé par l'augmentation du nombre de copies de génomes de *Chlamydiaceae* dans les organes testés, est rapide. Cependant, nous avons observé que, dans le cas des trois doses inoculées, le taux de contamination finale des animaux à J10 était identique. Les résultats ont aussi permis de démontrer une répartition particulière des bactéries au sein de l'organisme : on note une forte contamination de la rate et du foie ainsi que du tractus digestif « inférieur » (iléum, cæcum et rectum). Cependant, quels que soient la dose inoculée et le temps après l'inoculation, le caecum demeure l'organe le plus contaminé. Les résultats de l'écouvillonnage cloacal des animaux ont mis en avant un lien direct entre contamination générale de l'animal et excrétion. Les résultats de contamination des animaux sentinelles ont clairement démontré l'existence d'une contamination inter-animale très forte. Le dernier jour de l'expérimentation (J10 post-inoculation), ces animaux se sont révélés aussi fortement contaminés que les animaux inoculés et ont présenté une même distribution de la charge bactérienne.

Le modèle d'infection expérimentale pourra être utilisé de multiples façons. Afin de mieux caractériser le portage asymptomatique, il serait intéressant de mettre au point un protocole expérimental plus long. Les données épidémiologiques d'élevages montrent une alternance de phases de forte et de faible excrétion de *C. psittaci* par les animaux et le modèle expérimental permettrait de comprendre pourquoi l'excrétion n'est pas constante. De plus, un tel modèle permettrait de déterminer si cette infection perdure dans le temps au niveau de tous les organes ou si seuls quelques organes restent contaminés et servent de « réservoir » pour la bactérie, comme dans le cas des infections à salmonelles chez le poulet (Duchet-Suchaux *et al.*, 1995).

Le travail de thèse a démontré l'existence d'une contamination inter-animale rapide. Il serait, par conséquent, intéressant d'utiliser une plus grande proportion d'animaux sentinelles pour permettre d'établir une cinétique d'abattage et ainsi de caractériser cette contamination horizontale temporellement et aussi d'établir plus précisément par quelle(s) voie(s) elle s'effectue. L'utilisation de ce modèle dans le cadre d'une étude permettant de comparer l'évolution de la charge bactérienne entre des animaux inoculés et des animaux sentinelles semble pertinente.

On peut aussi suggérer que le modèle soit utilisé dans le cadre de l'évaluation de traitements ou de vaccins permettant de diminuer l'excrétion des animaux et donc de limiter le risque d'exposition des personnels, des congénères et de la faune sauvage.

Les infections à *Chlamydophila psittaci* sont souvent synonymes d'infection respiratoire aiguë et de nombreux modèles étayant cette symptomatologie ont été développés. Cependant, les études faites en élevages de canards en France font état d'un autre type d'infection à *C. psittaci*, le portage asymptomatique. Le modèle développé ici a confirmé ces observations, démontrant que cette bactérie est aussi capable de se maintenir dans un hôte sans entrainer de signes cliniques. Il a aussi été montré dans cette étude que ce microorganisme n'est pas seulement un pathogène respiratoire mais qu'il peut aussi coloniser les intestins. Dès lors, de nombreuses questions sont soulevées. Une de ces questions est l'appartenance ou non de cette bactérie à la flore intestinale des canards en tant qu'agent commensal, comme cela est suggéré dans le cas des bovins (Reinhold *et al.*, 2010). Cette absence de signe clinique suggère aussi la possibilité que la pathologie serait due à une co-infection par un autre germe, facilitée par le développement de *C. psittaci* au sein de l'hôte. Il serait alors pertinent d'évaluer cette possibilité grâce à un modèle de co-infection avec un autre pathogène tel qu'*Aspergillus fumigatus*, *Escherichia coli* ou encore *Salmonella enterica*.

Un tel portage asymptomatique est aussi observé chez les pigeons (Haag-Wackernagel, 1995). Ce type d'infection pourrait alors être particulier de seulement quelques génotypes. Il serait donc intéressant d'inoculer par voie orale des canards avec une souche de génotype A, génotype généralement impliqué dans les pathologies respiratoires, afin de déterminer si un portage asymptomatique est aussi possible avec ce génotype.

Ce travail de thèse a donc permis de mettre au point deux nouvelles méthodes de typage MLVA pour deux pathogènes majeurs des oiseaux : *Chlamydophila psittaci* et *Aspergillus fumigatus*. Le pouvoir discriminant et la facilité d'exécution de ces techniques en font des outils de choix pour des études épidémiologiques dans le cadre d'élevages avicoles. L'application de ces techniques pourra sans doute apporter des réponses pertinentes à propos de la circulation de ces microorganismes au sein des élevages et du lien avec des cas humains associés.

Ce travail de thèse a aussi permis d'apporter des informations originales à propos de la pathogénie de l'aspergillose et de la chlamydiose par la création de deux nouveaux modèles aviaires. Les deux modèles mis au point répondent à une problématique qui est propre à chaque pathogène. Cependant, ces modèles ont tous les deux procuré de nouvelles données sur ces infections et ouvrent de nombreuses perspectives. Ces modèles sont des bases solides pour de futures expérimentations visant à développer des méthodes de lutte efficaces vis-à-vis de l'aspergillose et de la chlamydiose chez les oiseaux.

REFERENCES

1. **Abadia, G., I. Capek, G. André-Fontaine, and E. Laurens.** 2006. Etude de séroprévalence de la chlamydiose aviaire chez certains professionnels avicoles en Bretagne et Pays de la Loire, 2001-2002. Bulletin épidémiologique hebdomadaire InVS **n°27/28, 204-205**.
2. **Abadia, G., P. Sail N'Diaye, P. Masson, E. Laurens, B. Delemotte, and E. Choutet.** 2001. Les chlamydioses d'origine aviaire - Maladies professionnelles. Médecine et Maladies Infectieuses **31 supplement 2**.
3. **Adair, D. M., P. L. Worsham, K. K. Hill, A. M. Klevytska, P. J. Jackson, A. M. Friedlander, and P. Keim.** 2000. Diversity in a variable-number tandem repeat from Yersinia pestis. J Clin Microbiol **38:**1516-9.
4. **Adams, T. H.** 1994. Asexual Sporulation in Higher Fungi, p. 367-382. *In* N. A. Gow and G. M. Gadd (ed.), The Growing Fungus, vol. Part Five.
5. **Adams, T. H., J. K. Wieser, and J. H. Yu.** 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol Mol Biol Rev **62:**35-54.
6. **Adl, S. M., A. G. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Fredericq, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. McCourt, L. Mendoza, O. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegel, and M. F. Taylor.** 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. J Eukaryot Microbiol **52:**399-451.
7. **Aimanianda, V., J. Bayry, S. Bozza, O. Kniemeyer, K. Perruccio, S. R. Elluru, C. Clavaud, S. Paris, A. A. Brakhage, S. V. Kaveri, L. Romani, and J. P. Latge.** 2009. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. Nature **460:**1117-21.
8. **Airenne, S., H. M. Surcel, H. Alakarppa, K. Laitinen, J. Paavonen, P. Saikku, and A. Laurila.** 1999. Chlamydia pneumoniae infection in human monocytes. Infect Immun **67:**1445-9.
9. **Amstein, P., and K. F. Meyer.** 1969. Psittacosis and omithosis, p. 384-391. *In* M. Petrak (ed.), Diseases of cage and aviary birds. Lea and Febiger, Philadelphia.
10. **Andersen, A. A.** 1998a. Chlamydiosis. *In* D. Kendall/Hunt Publishing, Iowa, USA (ed.), A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fourth Edition.
11. **Andersen, A. A.** 1991. Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. J Clin Microbiol **29:**707-11.
12. **Andersen, A. A.** 1997. Two new serovars of Chlamydia psittaci from North American birds. J Vet Diagn Invest **9:**159-64.
13. **Andersen, A. A., and D. G. Rogers.** 1998b. Presented at the the Ninth International Symposium on Human Chlamydial Infection, San Francisco, California, USA.
14. **Andersen, A. A., and D. Vanrompay.** 2000. Avian chlamydiosis. Rev Sci Tech **19:**396-404.
15. **Andersen, A. A., and D. Vanrompay.** 2003. Avian Chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). *In* Y. M. Saif (ed.), Diseases of poultry 11th Edition.
16. **Anderson, D. C., P. A. Stoesz, and A. F. Kaufmann.** 1978. Psittacosis outbreak in employees of a turkey-processing plant. Am J Epidemiol **107:**140-8.
17. **Anderson, I. E., S. I. Baxter, S. Dunbar, A. G. Rae, H. L. Philips, M. J. Clarkson, and A. J. Herring.** 1996. Analyses of the genomes of chlamydial isolates from ruminants and pigs support the adoption of the new species Chlamydia pecorum. Int J Syst Bacteriol **46:**245-51.
18. **Aquino, V. R., L. Z. Goldani, and A. C. Pasqualotto.** 2007. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. Mycopathologia **163:**191-202.
19. **Arca-Ruibal, B., U. Wernery, R. Zachariah, T. A. Bailey, A. Di Somma, C. Silvanose, and P. McKinney.** 2006. Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons. Vet Rec **158:**442-4.
20. **Arzey, G. G., and K. E. Arzey.** 1990. Chlamydiosis in layer chickens. Aust Vet J **67:**461.
21. **Ask, B., E. H. van der Waaij, E. J. Glass, and S. C. Bishop.** 2007. Modeling immunocompetence development and immunoresponsiveness to challenge in chicks. Poult Sci **86:**1336-50.
22. **Askew, D. S.** 2008. *Aspergillus fumigatus*: virulence genes in a street-smart mold. Curr Opin Microbiol **11:**331-7.
23. **Atasever, A., and K. S. Gumussoy.** 2004. Pathological, clinical and mycological findings in experimental aspergillosis infections of starlings. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med **51:**19-22.
24. **Aufauvre-Brown, A., J. Cohen, and D. W. Holden.** 1992. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol **30:**2991-3.

25. **Baddley, J. W.** 2010. Clinical risk factors for invasive aspergillosis. Med Mycol.
26. **Baddley, J. W., P. G. Pappas, A. C. Smith, and S. A. Moser.** 2003. Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. J Clin Microbiol **41:**5525-9.
27. **Bain, J. M., A. Tavanti, A. D. Davidson, M. D. Jacobsen, D. Shaw, N. A. Gow, and F. C. Odds.** 2007. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol **45:**1469-77.
28. **Bal, A. M., and I. M. Gould.** 2007. Empirical antimicrobial treatment for chemotherapy-induced febrile neutropenia. Int J Antimicrob Agents **29:**501-9.
29. **Balajee, S. A., H. A. de Valk, B. A. Lasker, J. F. Meis, and C. H. Klaassen.** 2008. Utility of a microsatellite assay for identifying clonally related outbreak isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Microbiol Methods **73:**252-6.
30. **Balajee, S. A., J. L. Gribskov, E. Hanley, D. Nickle, and K. A. Marr.** 2005. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot Cell **4:**625-32.
31. **Balajee, S. A., D. Nickle, J. Varga, and K. A. Marr.** 2006. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. Eukaryot Cell **5:**1705-12.
32. **Balajee, S. A., S. T. Tay, B. A. Lasker, S. F. Hurst, and A. P. Rooney.** 2007. Characterization of a novel gene for strain typing reveals substructuring of *Aspergillus fumigatus* across North America. Eukaryot Cell **6:**1392-9.
33. **Bankowski, R. A., P. Amstein, and K. F. Meyer.** 1977. Psittacosis/omithosis. *In* K. R.W. (ed.), Current Veterinary Therapy VI, vol. 698-703. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
34. **Banon, H.** 1999. Presented at the Séminaire canard UCAAB, 21-22 octobre.
35. **Barnes, R. C.** 1989. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. Clin Microbiol Rev **2:**119-36.
36. **Bart-Delabesse, E., J. F. Humbert, E. Delabesse, and S. Bretagne.** 1998. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol **36:**2413-8.
37. **Bauck, L., S. Orosz, and G. M. Dorrestein.** 1997. Avian medicine and surgery. WB Saunders, Philadelphia.
38. **Bedson, S. P.** 1930. A Paper on filterable viruses and practical medicine. Br Med J **2:**505-508.
39. **Beernaert, L. A., F. Pasmans, K. Baert, L. Van Waeyenberghe, K. Chiers, F. Haesebrouck, and A. Martel.** 2009. Designing a treatment protocol with voriconazole to eliminate *Aspergillus fumigatus* from experimentally inoculated pigeons. Vet Microbiol **139:**393-7.
40. **Beernaert, L. A., F. Pasmans, F. Haesebrouck, and A. Martel.** 2008. Modelling *Aspergillus fumigatus* infections in racing pigeons (*Columba livia domestica*). Avian Pathol **37:**545-9.
41. **Beernaert, L. A., F. Pasmans, L. Van Waeyenberghe, F. Haesebrouck, and A. Martel.** 2010. *Aspergillus* infections in birds: a review. Avian Pathol **39:**325-31.
42. **Bennedsen, M., and A. Filskov.** 2000. Presented at the Fourth Meeting of the European Society for Chlamydia, Helsinki, Finland.
43. **Bennett, J.** 2010. An Overview of the Genus *Aspergillus*. *In* M. Machida and K. Gomi (ed.), *Aspergillus* Molecular Biology and Genomics.
44. **Benson, G.** 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Res **27:**573-80.
45. **Berger, L., K. Volp, S. Mathews, R. Speare, and P. Timms.** 1999. Chlamydia pneumoniae in a free-ranging giant barred frog (Mixophyes iteratus) from Australia. J Clin Microbiol **37:**2378-80.
46. **Berkova, N., S. Lair-Fulleringer, F. Femenia, D. Huet, M. C. Wagner, K. Gorna, F. Tournier, O. Ibrahim-Granet, J. Guillot, R. Chermette, P. Boireau, and J. P. Latge.** 2006. *Aspergillus fumigatus* conidia inhibit tumour necrosis factor- or staurosporine-induced apoptosis in epithelial cells. Int Immunol **18:**139-50.
47. **Bertelli, C., F. Collyn, A. Croxatto, C. Ruckert, A. Polkinghorne, C. Kebbi-Beghdadi, A. Goesmann, L. Vaughan, and G. Greub.** 2010. The *Waddlia* genome: a window into chlamydial biology. PLoS One **5:**e10890.
48. **Bertout, S., F. Renaud, R. Barton, F. Symoens, J. Burnod, M. A. Piens, B. Lebeau, M. A. Viviani, F. Chapuis, J. M. Bastide, R. Grillot, and M. Mallie.** 2001. Genetic polymorphism of *Aspergillus fumigatus* in clinical samples from patients with invasive aspergillosis: investigation using multiple typing methods. J Clin Microbiol **39:**1731-7.
49. **Bienenstock, J., N. Johnston, and D. Y. Perey.** 1973. Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics. Lab Invest **28:**686-92.

50. **Bienenstock, J., N. Johnston, and D. Y. Perey.** 1973. Bronchial lymphoid tissue. II. Functional characterisitics. Lab Invest **28:**693-8.
51. **Blanchard, J. F., H. K. Armenian, R. Peeling, P. P. Friesen, C. Shen, and R. C. Brunham.** 2000. The relation between Chlamydia pneumoniae infection and abdominal aortic aneurysm: case-control study. Clin Infect Dis **30:**946-7.
52. **Bocquet, P., S. Patris, C. Dumartin, S. Gottot, G. Rykner, and G. Brucker.** 1995. [The epidemiological surveillance network for nosocomial invasive aspergillosis of the Assistance Publique-Hopitaux de Paris]. Ann Med Interne (Paris) **146:**79-83.
53. **Bouchara, J. P., M. Sanchez, A. Chevailler, A. Marot-Leblond, J. C. Lissitzky, G. Tronchin, and D. Chabasse.** 1997. Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus* conidia. Infect Immun **65:**2717-24.
54. **Bourgeois, V.** 1991. L'aspergillose du dindon. Contribution à l'étude de l'épidémiologie chez les repoducteurs mâles. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort.
55. **Bozza, S., C. Clavaud, G. Giovannini, T. Fontaine, A. Beauvais, J. Sarfati, C. D'Angelo, K. Perruccio, P. Bonifazi, S. Zagarella, S. Moretti, F. Bistoni, J. P. Latge, and L. Romani.** 2009. Immune sensing of *Aspergillus fumigatus* proteins, glycolipids, and polysaccharides and the impact on Th immunity and vaccination. J Immunol **183:**2407-14.
56. **Brackenbury, J. H.** 1987. Ventilation of the lung-air sac system, p. 39-71. *In* T. J. Sellar (ed.), Bird Respiration, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Fla.
57. **Branson, W. R., G. J. Harrison, and L. R. Harrison.** 1994. Avian medicine: principle and application. Winger Publishing, Inc.
58. **Bromley, I. M., and K. Donaldson.** 1996. Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung. Thorax **51:**1203-9.
59. **Brown, P. A., and P. T. Redig.** 1994. Presented at the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians, Reno, Nevada, USA.
60. **Brumfield, H. P., H. Benson, and B. S. Pomeroy.** 1961. Procedure for modified complement fixation test with turkey, duck and chicken serum antibody. *In* A. a. o. a. pathologists (ed.), Avian diseases.
61. **Bush, R. M., and K. D. Everett.** 2001. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. Int J Syst Evol Microbiol **51:**203-20.
62. **Cacciuttolo, E., G. Rossi, S. Nardoni, R. Legrottaglie, and P. Mani.** 2009. Anatomopathological aspects of avian aspergillosis. Vet Res Commun.
63. **Caillot, D., J. F. Couaillier, A. Bernard, O. Casasnovas, D. W. Denning, L. Mannone, J. Lopez, G. Couillault, F. Piard, O. Vagner, and H. Guy.** 2001. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. J Clin Oncol **19:**253-9.
64. **Calenge, F., P. Kaiser, A. Vignal, and C. Beaumont.** 2010. Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. Genet Sel Evol **42:**11.
65. **Cavalier-Smith, T.** 2002. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of *Protozoa*. Int J Syst Evol Microbiol **52:**297-354.
66. **Chalmers, W. S.** 1984. Incidence of chlamydial antibodies in commercial duck flocks. Vet Rec **115:**651-2.
67. **Chandenier, J., S. Bernard, J. Montharu, E. Bailly, F. Fetissof, M. de Monte, G. Desoubeaux, P. Diot, and D. Richard-Lenoble.** 2009. The utility of a nebulised intra-tracheal rat model of invasive pulmonary aspergillosis. Mycoses **52:**239-45.
68. **Chang, G. T., and J. W. Moulder.** 1978. Loss of inorganic ions from host cells infected with Chlamydia psittaci. Infect Immun **19:**827-32.
69. **Chaudhary, S. K., and J. R. Sadana.** 1988. Experimental aspergillosis in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). Clinical signs and haematological changes. Mycopathologia **102:**179-84.
70. **Chermette, R., and J. Bussieras.** 1993. Fascicule V: Mycologie vétérinaire, p. 179. *In* E. N. V. d'Alfort (ed.), Abrégé de Parasitologie vétérinaire, Maisons-Alfort.
71. **Chute, H. L., E. Lacombe, D. C. O'Meara, and H. D. Tresner.** 1956. The fungous flora of chickens with infections of the respiratory tract. Am J Vet Res **17:**763-5.
72. **Clemons, K. V., and D. A. Stevens.** 2005. The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. Med Mycol **43 Suppl 1:**S101-10.

73. **Corbanie, E. A., M. G. Matthijs, J. H. van Eck, J. P. Remon, W. J. Landman, and C. Vervaet.** 2006. Deposition of differently sized airborne microspheres in the respiratory tract of chickens. Avian Pathol **35:**475-85.
74. **Cornet, M., L. Fleury, C. Maslo, J. F. Bernard, and G. Brucker.** 2002. Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area. J Hosp Infect **51:**288-96.
75. **Corrier, D. E., M. H. Elissalde, R. L. Ziprin, and J. R. DeLoach.** 1991. Effect of immunosuppression with cyclophosphamide, cyclosporin, or dexamethasone on *Salmonella* colonization of broiler chicks. Avian Dis **35:**40-5.
76. **Corsaro, D., V. Thomas, G. Goy, D. Venditti, R. Radek, and G. Greub.** 2007. 'Candidatus Rhabdochlamydia crassificans', an intracellular bacterial pathogen of the cockroach Blatta orientalis (Insecta: Blattodea). Syst Appl Microbiol **30:**221-8.
77. **Corsaro, D., D. Venditti, and M. Valassina.** 2002. New parachlamydial 16S rDNA phylotypes detected in human clinical samples. Res Microbiol **153:**563-7.
78. **Cox, H. U., P. G. Hoyt, R. P. Poston, T. G. Snider, 3rd, T. X. Lemarchand, and K. L. O'Reilly.** 1998. Isolation of an avian serovar of Chlamydia psittaci from a case of bovine abortion. J Vet Diagn Invest **10:**280-2.
79. **Crespo, R., S. Yamashiro, and D. B. Hunter.** 1998. Development of the thoracic air sacs of turkeys with age and rearing conditions. Avian Dis **42:**35-44.
80. **De Eshougues, J. R., A. Zaffran, and F. Cohenadad.** 1951. [Acute pulmonary mycosis by *Aspergillus brodeni*.]. Bull Mem Soc Med Hop Paris **67:**1122-8.
81. **De Hoog, G. S., H. Gene, and M. J. Figueras.** 2000. Atlas of Clinical Fungi 2nd Edition
82. **de Repentigny, L.** 1989. Serological techniques for diagnosis of fungal infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **8:**362-75.
83. **de Valk, H. A., C. H. Klaassen, and J. F. Meis.** 2008. Molecular typing of *Aspergillus* species. Mycoses **51:**463-76.
84. **de Valk, H. A., J. F. Meis, S. Bretagne, J. M. Costa, B. A. Lasker, S. A. Balajee, A. C. Pasqualotto, M. J. Anderson, L. Alcazar-Fuoli, E. Mellado, and C. H. Klaassen.** 2009. Interlaboratory reproducibility of a microsatellite-based typing assay for *Aspergillus fumigatus* through the use of allelic ladders: proof of concept. Clin Microbiol Infect **15:**180-7.
85. **de Valk, H. A., J. F. Meis, I. M. Curfs, K. Muehlethaler, J. W. Mouton, and C. H. Klaassen.** 2005. Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol **43:**4112-20.
86. **de Valk, H. A., J. F. Meis, B. E. de Pauw, P. J. Donnelly, and C. H. Klaassen.** 2007. Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol **45:**1415-9.
87. **Denamur, E., C. Sayada, A. Souriau, J. Orfila, A. Rodolakis, and J. Elion.** 1991. Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*. J Gen Microbiol **137:**2525-30.
88. **Denning, D. W., K. V. Clemons, L. H. Hanson, and D. A. Stevens.** 1990. Restriction endonuclease analysis of total cellular DNA of *Aspergillus fumigatus* isolates of geographically and epidemiologically diverse origin. J Infect Dis **162:**1151-8.
89. **Desoutter, A.** 2008. Intérêt des modèles expérimentaux d'aspergillose ; étude particulière des stades précoces de l'infection chez les poussins (*Gallus gallus*). Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort.
90. **Di Francesco, A., M. Donati, M. Rossi, S. Pignanelli, A. Shurdhi, R. Baldelli, and R. Cevenini.** 2008. Tetracycline-resistant *Chlamydia suis* isolates in Italy. Vet Rec **163:**251-2.
91. **Diaz-Guerra, T. M., E. Mellado, M. Cuenca-Estrella, L. Gaztelurrutia, J. I. Navarro, and J. L. Tudela.** 2000. Genetic similarity among one *Aspergillus flavus* strain isolated from a patient who underwent heart surgery and two environmental strains obtained from the operating room. J Clin Microbiol **38:**2419-22.
92. **Dilbeck, P. M., J. F. Evermann, T. B. Crawford, A. C. Ward, C. W. Leathers, C. J. Holland, C. A. Mebus, L. L. Logan, F. R. Rurangirwa, and T. C. McGuire.** 1990. Isolation of a previously undescribed rickettsia from an aborted bovine fetus. J Clin Microbiol **28:**814-6.
93. **Draghi, A., 2nd, V. L. Popov, M. M. Kahl, J. B. Stanton, C. C. Brown, G. J. Tsongalis, A. B. West, and S. Frasca, Jr.** 2004. Characterization of "*Candidatus piscichlamydia salmonis*" (order *Chlamydiales*), a

chlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). J Clin Microbiol **42:**5286-97.

94. **Duan, Y. J., A. Souriau, A. M. Mahe, D. Trap, A. A. Andersen, and A. Rodolakis.** 1999. Serotyping of chlamydial clinical isolates from birds with monoclonal antibodies. Avian Dis **43:**22-8.
95. **Duarte-Escalante, E., G. Zuniga, O. N. Ramirez, S. Cordoba, N. Refojo, R. Arenas, L. Delhaes, and R. Reyes-Montes Mdel.** 2009. Population structure and diversity of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from different sources and geographic origins. Mem Inst Oswaldo Cruz **104:**427-33.
96. **Duchet-Suchaux, M., P. Lechopier, J. Marly, P. Bernardet, R. Delaunay, and P. Pardon.** 1995. Quantification of experimental *Salmonella enteritidis* carrier state in B13 leghorn chicks. Avian Dis **39:**796-803.
97. **Duchet-Suchaux, M., F. Mompart, F. Berthelot, C. Beaumont, P. Lechopier, and P. Pardon.** 1997. Differences in frequency, level, and duration of cecal carriage between four outbred chicken lines infected orally with *Salmonella enteritidis*. Avian Dis **41:**559-67.
98. **Duke, G. E.** 1993. Avian digestion, p. 428-437. *In* M. J. Swenson and W. O. Reece (ed.), Dukes physiology of domestic fowl, 11th Ed. Cornell University Press, Ithaca, NY.
99. **Dyar, P. M., O. J. Fletcher, and R. K. Page.** 1984. Aspergillosis in turkeys associated with use of contaminated litter. Avian Dis **28:**250-5.
100. **Dyce, K. M., W. O. Sack, and C. J. Wensing.** 2002. Avian anatomy. *In* K. M. Dyce, W. O. Sack, and C. J. Wensing (ed.), Textbook of veterinary anatomy, 3rd Ed. WB Saunders, Philadelphia.
101. **Eb, F., and J. Orfila.** 1982. Serotyping of *Chlamydia psittaci* by the micro-immunofluorescence test: isolates of ovine origin. Infect Immun **37:**1289-91.
102. **Eb, F., J. Orfila, and J. F. Lefebvre.** 1976. Ultrastructural study of the development of the agent of ewe's abortion. J Ultrastruct Res **56:**177-85.
103. **Eeckhout, E., A. Volckaert, A. Naessens, and W. Schandevyl.** 1986. [Ornithosis as a general systemic disorder]. Ned Tijdschr Geneeskd **130:**1487-9.
104. **Ehricht, R., P. Slickers, S. Goellner, H. Hotzel, and K. Sachse.** 2006. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. Mol Cell Probes **20:**60-3.
105. **Eichner, R. D., M. Al Salami, P. R. Wood, and A. Mullbacher.** 1986. The effect of gliotoxin upon macrophage function. Int J Immunopharmacol **8:**789-97.
106. **ENITA.** 2002. Productions animales HORS SOL 3ème Ed, Bordeaux.
107. **Erbeck, D. H., and S. A. Nunn.** 1999. Chlamydiosis in pen-raised bobwhite quail (Colinus virginianus) and chukar partridge (Alectoris chukar) with high mortality. Avian Dis **43:**798-803.
108. **Esteban, A., M. L. Abarca, M. R. Bragulat, and F. J. Cabanes.** 2005. Influence of pH and incubation time on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in culture media. J Food Prot **68:**1435-40.
109. **Evans, H. E.** 1966. Anatomy of the budgie and other birds, p. 79-163. *In* W. Rosskopf and R. Woerpel (ed.), Diseases of cage and aviary birds, 3rd Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
110. **Everett, K. D., R. M. Bush, and A. A. Andersen.** 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int J Syst Bacteriol **49 Pt 2:**415-40.
111. **Fabry, J., M. F. Blech, F. Carpentier, C. Cordonnier, B. Dupont, A. Durocher, D. Fiere, J. P. Gachie, B. Grandbastien, R. Herbrecht, B. Leclercq, M. Leporrier, J. C. Lucet, N. Milpied, F. Squinazi, E. Thervet, and A. Thiebaut.** 2000. Prévention du risque aspergillaire chez les patients immunodéprimés (Hématologie, Transplantation), Conférence de consensus, Institut Pasteur, Paris, France.
112. **Fagerland, J. A., and L. H. Arp.** 1993a. Distribution and quantitation of plasma cells, T lymphocyte subsets, and B lymphocytes in bronchus-associated lymphoid tissue of chickens: age-related differences. Reg Immunol **5:**28-36.
113. **Fagerland, J. A., and L. H. Arp.** 1993b. Structure and development of bronchus-associated lymphoid tissue in conventionally reared broiler chickens. Avian Dis **37:**10-8.
114. **Fando, J. L., I. Alaba, C. Escarmis, J. L. Fernandez-Luna, E. Mendez, and M. Salinas.** 1985. The mode of action of restrictocin and mitogillin on eukaryotic ribosomes. Inhibition of brain protein synthesis, cleavage and sequence of the ribosomal RNA fragment. Eur J Biochem **149:**29-34.
115. **Faublée, V., and M. Boller.** 1975. Rôle pathogène expérimental d'*Aspergillus fumigatus* chez le poulet. Rec. Med. Vet. **151:**481-489.

116. **Fedde, M. R.** 1998. Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. Poult Sci **77:**1130-8.
117. **Femenia, F., J. J. Fontaine, S. Lair-Fulleringer, N. Berkova, D. Huet, N. Towanou, F. Rakotovao, O. I. Granet, G. Le Loc'h, P. Arne, and J. Guillot.** 2007. Clinical, mycological and pathological findings in turkeys experimentally infected by *Aspergillus fumigatus*. Avian Pathol **36:**213-9.
118. **Femenia, F., D. Huet, S. Lair-Fulleringer, M. C. Wagner, J. Sarfati, L. Shingarova, J. Guillot, P. Boireau, R. Chermette, and N. Berkova.** 2009. Effects of conidia of various *Aspergillus* species on apoptosis of human pneumocytes and bronchial epithelial cells. Mycopathologia **167:**249-62.
119. **FranceAgriMer.** 2010. Le marché des produits laitiers, carnés et avicoles en 2009.
120. **Freidank, H. M., H. Vogele, and K. Eckert.** 1997. Evaluation of a new commercial microimmunofluorescence test for detection of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, and *Chlamydia psittaci*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **16:**685-8.
121. **Frothingham, R., and W. A. Meeker-O'Connell.** 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology **144 (Pt 5):**1189-96.
122. **Fudge, A. M.** 1984. Update on chlamydiosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract **14:**201-21.
123. **Fukushi, H., and K. Hirai.** 1992. Proposal of Chlamydia pecorum sp. nov. for Chlamydia strains derived from ruminants. Int J Syst Bacteriol **42:**306-8.
124. **Fulleringer, S. L., D. Seguin, S. Warin, A. Bezille, C. Desterque, P. Arne, R. Chermette, S. Bretagne, and J. Guillot.** 2006. Evolution of the environmental contamination by thermophilic fungi in a turkey confinement house in France. Poult Sci **85:**1875-80.
125. **Ganiere, J. P.** 2008. Chlamydophilose (chlamydiose) aviaire (ornithose-psittacose). ENVN.
126. **Garcia-Hermoso, D., O. Cabaret, G. Lecellier, M. Desnos-Ollivier, D. Hoinard, D. Raoux, J. M. Costa, F. Dromer, and S. Bretagne.** 2007. Comparison of microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing for DNA-Based typing of *Candida albicans*. J Clin Microbiol **45:**3958-63.
127. **Geens, T., A. Desplanques, M. Van Loock, B. M. Bonner, E. F. Kaleta, S. Magnino, A. A. Andersen, K. D. Everett, and D. Vanrompay.** 2005. Sequencing of the *Chlamydophila psittaci* ompA gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. J Clin Microbiol **43:**2456-61.
128. **Ghori, H. M., and S. A. Edgar.** 1979. Comparative susceptibility and effect of mild *Aspergillus fumigatus* infection on three strains of chickens. Poult Sci **58:**14-7.
129. **Ghori, H. M., and S. A. Edgar.** 1973. Comparative susceptibility of chickens, turkeys and Coturnix quail to aspergillosis. Poult Sci **52:**2311-5.
130. **Girardin, H., J. P. Latge, T. Srikantha, B. Morrow, and D. R. Soll.** 1993. Development of DNA probes for fingerprinting *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol **31:**1547-54.
131. **Girjes, A. A., A. Hugall, D. M. Graham, T. F. McCaul, and M. F. Lavin.** 1993. Comparison of type I and type II Chlamydia psittaci strains infecting koalas (Phascolarctos cinereus). Vet Microbiol **37:**65-83.
132. **Gordon, F. B., and A. L. Quan.** 1965. Occurence of Glycogen in Inclusions of the Psittacosis-Lymphogranuloma Venereum-Trachoma Agents. J Infect Dis **115:**186-96.
133. **Goupil, F., D. Pelle-Duporte, S. Kouyoumdjian, B. Carbonnelle, and E. Tuchais.** 1998. [Severe pneumonia with a pneumococcal aspect during an ornithosis outbreak]. Presse Med **27:**1084-8.
134. **Goy, G., A. Croxatto, and G. Greub.** 2008. Waddlia chondrophila enters and multiplies within human macrophages. Microbes Infect **10:**556-62.
135. **Graczyk, T. K., M. R. Cranfield, and P. N. Klein.** 1997. Value of antigen and antibody detection, and blood evaluation parameters in diagnosis of avian invasive aspergillosis. Mycopathologia **140:**121-7.
136. **Greenberger, P. A., and R. Patterson.** 1987. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Model of bronchopulmonary disease with defined serologic, radiologic, pathologic and clinical findings from asthma to fatal destructive lung disease. Chest **91:**165S-171S.
137. **Grenouillet, F., L. Millon, J. M. Bart, S. Roussel, I. Biot, E. Didier, A. S. Ong, and R. Piarroux.** 2007. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for rapid typing of *Candida glabrata*. J Clin Microbiol **45:**3781-4.
138. **Greub, G., and D. Raoult.** 2002. Parachlamydiaceae: potential emerging pathogens. Emerg Infect Dis **8:**625-30.
139. **Grimes, J. E.** 1985. Direct complement fixation and isolation attempts for detecting *Chlamydia psittaci* infection of psittacine birds. Avian Dis **29:**873-7.

140. **Grimes, J. E., K. J. Owens, and J. R. Singer.** 1979. Experimental transmission of *Chlamydia psittaci* to turkeys from wild birds. Avian Dis **23:**915-26.
141. **Grimes, J. E., and P. B. Wyrick.** 1991. Chlamydiosis (ornithosis). *In* B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, W. M. Read, and H. W. Yoder (ed.), Diseases of poultry 9th Edition.
142. **Grissa, I., P. Bouchon, C. Pourcel, and G. Vergnaud.** 2008. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. Biochimie **90:**660-8.
143. **Guérin, J.-L., A. Ballot, B. Sraka, and O. Léon.** 2006. Presented at the 7èmes Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras, Arcachon, 18 - 19 octobre 2006.
144. **Guérin, J. L.** www.avicampus.fr.
145. **Guerin, J. L., and C. Boissieu.** 2010. L'autopsie en pathologie aviaire, avicampus. ENVT.
146. **Guillot, J., and R. Chermette.** 2001. [Aspergillosis in birds]. Rev Prat **51:**704-7.
147. **Gumussoy, K. S., F. Uyanik, A. Atasever, and Y. Cam.** 2004. Experimental *Aspergillus fumigatus* infection in quails and results of treatment with itraconazole. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **51:**34-8.
148. **Guscetti, F., R. Hoop, I. Schiller, L. Corboz, T. Sydler, and A. Pospischil.** 2000. Experimental enteric infection of gnotobiotic piglets with a *Chlamydia psittaci* strain of avian origin. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **47:**561-72.
149. **Guscetti, F., I. Schiller, T. Sydler, L. Corboz, and A. Pospischil.** 1998. Experimental *Chlamydia psittaci* serotype 1 enteric infection in gnotobiotic piglets: histopathological, immunohistochemical and microbiological findings. Vet Microbiol **62:**251-63.
150. **Guscetti, F., I. Schiller, T. Sydler, E. Heinen, and A. Pospischil.** 2009. Experimental enteric infection of gnotobiotic piglets with *Chlamydia suis* strain S45. Vet Microbiol **135:**157-68.
151. **Gylstorff, I., J. R. Jakoby, and H. Gerbermann.** 1984. [Comparative studies of psittacosis control on a drug basis. II. Efficacy trial of different drugs in different dosage forms in experimentally infected parrots (*Amazona viridigenalis*)]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr **97:**91-9.
152. **Haag-Wackernagel, D.** 1995. Regulation of the street pigeon in Basel. Wildlife Society Bulletin **23 n°2:**pp 256-260.
153. **Hadrich, I., F. Makni, A. Ayadi, and S. Ranque.** 2010. Microsatellite typing to trace Aspergillus flavus infections in a hematology unit. J Clin Microbiol **48:**2396-401.
154. **Haines, J.** 1995. Aspergillus in compost: straw man or fatal flaw? Biocycle **36:**32-35
155. **Hamet, N.** 1990. Contribution à la prophylaxie de l'aspergillose des volailles. Université Joseph Fourier - Grenoble I, Grenoble.
156. **Hammerschlag, M. R.** 2000. Chlamydia pneumoniae and the lung. Eur Respir J **16:**1001-7.
157. **Harkinezhad, T., T. Geens, and D. Vanrompay.** 2009a. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. Vet Microbiol **135:**68-77.
158. **Harkinezhad, T., K. Schautteet, and D. Vanrompay.** 2009c. Protection of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) against *Chlamydophila psittaci* challenge by DNA vaccination. Vet Res **40:**61.
159. **Harkinezhad, T., K. Verminnen, M. De Buyzere, E. Rietzschel, S. Bekaert, and D. Vanrompay.** 2009b. Prevalence of *Chlamydophila psittaci* infections in a human population in contact with domestic and companion birds. J Med Microbiol **58:**1207-12.
160. **Harrison, G. J.** 1989. A practitioner's view of the problem of avian chlamydiosis. J Am Vet Med Assoc **195:**1525-8.
161. **Heddema, E. R., E. J. van Hannen, B. Duim, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and Y. Pannekoek.** 2006. Genotyping of Chlamydophila psittaci in human samples. Emerg Infect Dis **12:**1989-90.
162. **Hesseltine, C. W., O. L. Shotwell, J. J. Ellis, and R. D. Stubblefield.** 1966. Aflatoxin formation by Aspergillus flavus. Bacteriol Rev **30:**795-805.
163. **Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon, O. E. Eriksson, S. Huhndorf, T. James, P. M. Kirk, R. Lucking, H. Thorsten Lumbsch, F. Lutzoni, P. B. Matheny, D. J. McLaughlin, M. J. Powell, S. Redhead, C. L. Schoch, J. W. Spatafora, J. A. Stalpers, R. Vilgalys, M. C. Aime, A. Aptroot, R. Bauer, D. Begerow, G. L. Benny, L. A. Castlebury, P. W. Crous, Y. C. Dai, W. Gams, D. M. Geiser, G. W. Griffith, C. Gueidan, D. L. Hawksworth, G. Hestmark, K. Hosaka, R. A. Humber, K. D. Hyde, J. E. Ironside, U. Koljalg, C. P. Kurtzman, K. H. Larsson, R. Lichtwardt, J. Longcore, J. Miadlikowska, A. Miller, J. M. Moncalvo, S. Mozley-Standridge, F. Oberwinkler, E. Parmasto, V. Reeb, J. D. Rogers, C. Roux, L. Ryvarden, J. P. Sampaio, A. Schussler, J. Sugiyama, R. G. Thorn, L. Tibell, W. A. Untereiner, C.**

Walker, Z. Wang, A. Weir, M. Weiss, M. M. White, K. Winka, Y. J. Yao, and N. Zhang. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol Res **111:**509-47.

164. **Hill, K. J.** 1971. The structure of the alimentary tract, p. 1-22. *In* D. J. Bell and B. M. Freeman (ed.), Physiology and biochemistry of the domestic fowl, vol. 1. Academic Press, London.
165. **Hinson, K. F., A. J. Moon, and N. S. Plummer.** 1952. Broncho-pulmonary aspergillosis; a review and a report of eight new cases. Thorax **7:**317-33.
166. **Hinton, D. G., A. Shipley, J. W. Galvin, J. T. Harkin, and R. A. Brunton.** 1993. Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant. Aust Vet J **70:**174-6.
167. **Hogan, L. H., B. S. Klein, and S. M. Levitz.** 1996. Virulence factors of medically important fungi. Clin Microbiol Rev **9:**469-88.
168. **Horvath, J. A., and S. Dummer.** 1996. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Am J Med **100:**171-8.
169. **Huminer, D., S. Pitlik, D. Kitayin, Y. Weissman, and Z. Samra.** 1992. Prevalence of Chlamydia psittaci infection among persons who work with birds. Isr J Med Sci **28:**739-41.
170. **Huminer, D., Z. Samra, Y. Weisman, and S. Pitlik.** 1988. Family outbreaks of psittacosis in Israel. Lancet **2:**615-8.
171. **Hunter, P. R., and M. A. Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol **26:**2465-6.
172. **Illner, F.** 1992. Zur Frage der ijbertragung des Gmithosevirus durch das Ei. Mh. Vet. Med. **17:**116-117.
173. **Israel, H. L., G. S. Lenchner, and G. W. Atkinson.** 1982. Sarcoidosis and aspergilloma. The role of surgery. Chest **82:**430-2.
174. **ITAVI.** 2010. Situation de la production et des marchés des oeufs et des produits d'oeufs. Note réalisée par le service économie de l'ITAVI.
175. **Iversen, J. O., R. P. Hanson, and J. Spalatin.** 1976. Experimental chlamydiosis in wild and domestic lagomorphs. J Wildl Dis **12:**215-20.
176. **Jackson, J. C., L. A. Higgins, and X. Lin.** 2009. Conidiation color mutants of Aspergillus fumigatus are highly pathogenic to the heterologous insect host Galleria mellonella. PLoS One **4:**e4224.
177. **Jackson, M., N. White, P. Giffard, and P. Timms.** 1999. Epizootiology of Chlamydia infections in two free-range koala populations. Vet Microbiol **65:**255-64.
178. **Jahn, B., A. Koch, A. Schmidt, G. Wanner, H. Gehringer, S. Bhakdi, and A. A. Brakhage.** 1997. Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. Infect Immun **65:**5110-7.
179. **Janssen_Animal_Health.** 2006. Aspergillus prevention in hatcheries.
180. **Jeurissen, S. H., E. M. Janse, G. Koch, and G. F. De Boer.** 1989. Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens. Cell Tissue Res **258:**119-24.
181. **Johnston, W. B., M. S. Eidson, K.A., M. G. Stobierski, R. E. Besser, L. A. F. Conti, K., K. F. Reilly, B. Ritchie, and T. N. J. Tully.** 2000. Compendium of Measures To Control *Chlamydia psittaci* Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis). Committee of the National Association of State Public Health Veterinarians
182. **Jones, M. P., and S. E. Orosz.** 2000. Presented at the Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine.
183. **Julian, R. J., and M. Goryo.** 1990. Pulmonary aspergillosis causing right ventricular failure and ascites in meat-type chickens. Avian Pathol **19:**643-54.
184. **Kaibu, H., K. Iida, S. Ueki, H. Ehara, Y. Shimasaki, S. Watanabe, H. Anzai, W. Takebu, T. Muta, T. Kusaba, T. Kishimoto, and S. Ando.** 2006. Psittacosis in all four members of a family in Nagasaki, Japan. Jpn J Infect Dis **59:**349-50.
185. **Kaiser, P.** 2010. Advances in avian immunology--prospects for disease control: a review. Avian Pathol **39:**309-24.
186. **Kaleta, E. F., and E. M. Taday.** 2003. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. Avian Pathol **32:**435-61.
187. **Kaltenboeck, B., K. G. Kousoulas, and J. Storz.** 1993. Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (ompA) genes of the four chlamydial species. J Bacteriol **175:**487-502.
188. **Kauffold, J., F. Melzer, A. Berndt, G. Hoffmann, H. Hotzel, and K. Sachse.** 2006. Chlamydiae in oviducts and uteri of repeat breeder pigs. Theriogenology **66:**1816-23.

189. **Keim, P., L. B. Price, A. M. Klevytska, K. L. Smith, J. M. Schupp, R. Okinaka, P. J. Jackson, and M. E. Hugh-Jones.** 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J Bacteriol **182:**2928-36.
190. **Kempf, I., D. Trap, A. M. Mahe, H. M. Hafez, P. Kermorgant, and P. Colin.** 2000. La Chlamydiose de la dinde en Bretagne : quelques résultats sérologiques. Sci. Tech. Avicoles **33**.
191. **Khoufache, K., O. Puel, N. Loiseau, M. Delaforge, D. Rivollet, A. Coste, C. Cordonnier, E. Escudier, F. Botterel, and S. Bretagne.** 2007. Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells. BMC Microbiol **7:**5.
192. **Kim, E., and L. E. Graham.** 2008. EEF2 analysis challenges the monophyly of *Archaeplastida* and *Chromalveolata*. PLoS One **3:**e2621.
193. **King, A. S., and J. McLelland.** 1984. Birds - Their structure and function, 2nd ed.
194. **King, A. S., and V. Molony.** 1971. The anatomy of respiration, p. 93-169. *In* D. J. Bell and B. M. Freeman (ed.), Physiology and biochemistry of the domestic fowl, vol. 1. Academic Press, London.
195. **Klaassen, C. H., H. A. de Valk, S. A. Balajee, and J. F. Meis.** 2009. Utility of CSP typing to sub-type clinical *Aspergillus fumigatus* isolates and proposal for a new CSP type nomenclature. J Microbiol Methods **77:**292-6.
196. **Klimes, B., Z. Novak, and K. Severa.** 1964. Therapy of Aspergillosis of Chickens with Fungicidin. Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B **11:**151-160.
197. **Klint, M., H. H. Fuxelius, R. R. Goldkuhl, H. Skarin, C. Rutemark, S. G. Andersson, K. Persson, and B. Herrmann.** 2007. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis. J Clin Microbiol **45:**1410-4.
198. **Koenen, M. E., A. G. Boonstra-Blom, and S. H. Jeurissen.** 2002. Immunological differences between layer- and broiler-type chickens. Vet Immunol Immunopathol **89:**47-56.
199. **Kuhlman, J. E., E. K. Fishman, and S. S. Siegelman.** 1985. Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: characteristic findings on CT, the CT halo sign, and the role of CT in early diagnosis. Radiology **157:**611-4.
200. **Kunkle, R. A.** 2003. Fungal diseases. *In* Y. M. Saif (ed.), Diseases of poultry 11th Edition.
201. **Kunkle, R. A., and R. B. Rimler.** 1996. Pathology of acute aspergillosis in turkeys. Avian Dis **40:**875-86.
202. **Kunkle, R. A., R. B. Rimler, and E. M. Steadham.** 1999. Absence of protection against challenge with *Aspergillus fumigatus* by adoptive transfer of splenocytes from convalescent turkeys. Avian Dis **43:**678-84.
203. **Kunkle, R. A., and R. E. Sacco.** 1998. Susceptibility of convalescent turkeys to pulmonary aspergillosis. Avian Dis **42:**787-90.
204. **Kuo, C. C., L. A. Jackson, L. A. Campbell, and J. T. Grayston.** 1995. Chlamydia pneumoniae (TWAR). Clin Microbiol Rev **8:**451-61.
205. **Kuo, C. C., S. P. Wang, and J. T. Grayston.** 1975. Comparative infectivity of trachoma organisms in HeLa 229 cells and egg cultures. Infect Immun **12:**1078-82.
206. **Kutlin, A., P. M. Roblin, S. Kumar, S. Kohlhoff, T. Bodetti, P. Timms, and M. R. Hammerschlag.** 2007. Molecular characterization of Chlamydophila pneumoniae isolates from Western barred bandicoots. J Med Microbiol **56:**407-17.
207. **Lair-Fulleringer, S., J. Guillot, C. Desterke, D. Seguin, S. Warin, A. Bezille, R. Chermette, and S. Bretagne.** 2003. Differentiation between isolates of *Aspergillus fumigatus* from breeding turkeys and their environment by genotyping with microsatellite markers. J Clin Microbiol **41:**1798-800.
208. **Lamy, B., M. Moutaouakil, J. P. Latge, and J. Davies.** 1991. Secretion of a potential virulence factor, a fungal ribonucleotoxin, during human aspergillosis infections. Mol Microbiol **5:**1811-5.
209. **Laroucau, K., B. de Barbeyrac, F. Vorimore, M. Clerc, C. Bertin, T. Harkinezhad, K. Verminnen, F. Obeniche, I. Capek, C. Bebear, B. Durand, G. Zanella, D. Vanrompay, B. Garin-Bastuji, and K. Sachse.** 2009a. Chlamydial infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France. Vet Microbiol **135:**82-9.
210. **Laroucau, K., S. Thierry, F. Vorimore, K. Blanco, E. Kaleta, R. Hoop, S. Magnino, D. Vanrompay, K. Sachse, G. S. Myers, P. M. Bavoil, G. Vergnaud, and C. Pourcel.** 2008. High resolution typing of *Chlamydophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). Infect Genet Evol **8:**171-81.
211. **Laroucau, K., F. Vorimore, C. Bertin, K. Y. Mohamad, S. Thierry, W. Hermann, C. Maingourd, C. Pourcel, D. Longbottom, S. Magnino, K. Sachse, E. Vretou, and A. Rodolakis.** 2009b. Genotyping of *Chlamydophila abortus* strains by multilocus VNTR analysis. Vet Microbiol **137:**335-44.

212. **Lasiewski, R. C.** 1972. Respiratory function of birds, p. 288-335. *In* D. S. Farner and J. R. King (ed.), Avian biology, vol. 2, New-York.
213. **Lasker, B. A.** 2002. Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol **40:**2886-92.
214. **Latge, J. P.** 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev **12:**310-50.
215. **Latge, J. P., and J. S. Steinbach.** 2009. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis, vol. 568. ASM Press, Washington.
216. **Le Fleche, P., M. Fabre, F. Denoeud, J. L. Koeck, and G. Vergnaud.** 2002. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. BMC Microbiol **2:**37.
217. **Le Fleche, P., Y. Hauck, L. Onteniente, A. Prieur, F. Denoeud, V. Ramisse, P. Sylvestre, G. Benson, F. Ramisse, and G. Vergnaud.** 2001. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol **1:**2.
218. **Le Loc'h, G., P. Arne, C. Bourgerol, E. Risi, J. Pericard, J. Quinton, S. Bretagne, and J. Guillot.** 2006. Presented at the 16th Annu. Cong. Intl. Soc. Hum.Anim. Mycol.
219. **Lehnert, C.** 1962. Zur frage der ijbertragung des Gmithosevirus tiber das Brutei bei Enten. Berl. Mnch. Tierarztl. Wschr. **75:**151-152.
220. **Lemus, J. A., J. A. Fargallo, P. Vergara, D. Parejo, and E. Banda.** 2010. Natural cross chlamydial infection between livestock and free-living bird species. PLoS One **5:**e13512.
221. **Lenart, J., A. A. Andersen, and D. D. Rockey.** 2001. Growth and development of tetracycline-resistant Chlamydia suis. Antimicrob Agents Chemother **45:**2198-203.
222. **Léon, O., B. Sraka, A. Ballot, C. Armand, and J. L. Guérin.** 2004. Presented at the 6èmes Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras, Arcachon.
223. **Lepage, O. M., M. F. Perron, and J. L. Cadore.** 2004. The mystery of fungal infection in the guttural pouches. Vet J **168:**60-4.
224. **Lepinay, A., R. Robineaux, J. Orfila, C. Moncel, H. Coet, and J. M. Boutry.** 1971b. [Phase contrast microcinematographic analysis of the intracellular development of Chlamydia psittaci]. Arch Gesamte Virusforsch **35:**161-76.
225. **Lepinay, A., R. Robineaux, J. Orfila, L. Orme-Rosselli, and J. M. Boutry.** 1971a. [Ultrastructure and cytochemistry of Chlamydia Psittaci]. Arch Gesamte Virusforsch **33:**271-80.
226. **Levin, E. J.** 1956. Pulmonary intracavitary fungus ball. Radiology **66:**9-16.
227. **Levison, D. A., W. Guthrie, C. Ward, D. M. Green, and P. G. Robertson.** 1971. Infective endocarditis as part of psittacosis. Lancet **2:**844-7.
228. **Lewis, V. J., W. L. Thacker, and S. H. Mitchell.** 1977. Enzyme-linked immunosorbent assay for chlamydial antibodies. J Clin Microbiol **6:**507-10.
229. **Lillehoj, H. S., and J. M. Trout.** 1996. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. Clin Microbiol Rev **9:**349-60.
230. **Lin, D., P. F. Lehmann, B. H. Hamory, A. A. Padhye, E. Durry, R. W. Pinner, and B. A. Lasker.** 1995. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol **33:**1596-601.
231. **Livezey, B. C., and R. L. Zusi.** 2007. Higher-order phylogeny of modern birds (*Theropoda*, Aves: *Neornithes*) based on comparative anatomy. II. Analysis and discussion. Zool J Linn Soc **149:**1-95.
232. **Louis, C., G. Nicolas, F. Eb, J. F. Lefebvre, and J. Orfila.** 1980. Modifications of the envelope of Chlamydia psittaci during its developmental cycle: freeze-fracture study of complementary replicas. J Bacteriol **141:**868-75.
233. **Lovett, J., J. W. Messer, and R. B. Read, Jr.** 1971. The microflora of Southern Ohio poultry litter. Poult Sci **50:**746-51.
234. **Lunel, F. V., L. Licciardello, S. Stefani, H. A. Verbrugh, W. J. Melchers, J. F. Meis, S. Scherer, and A. van Belkum.** 1998. Lack of consistent short sequence repeat polymorphisms in genetically homologous colonizing and invasive *Candida albicans* strains. J Bacteriol **180:**3771-8.
235. **Madan, T., P. Eggleton, U. Kishore, P. Strong, S. S. Aggrawal, P. U. Sarma, and K. B. Reid.** 1997. Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. Infect Immun **65:**3171-9.
236. **Magdelaine, P.** 2003. Economie et avenir des filières avicoles et cunicoles. Prod. anim., INRA.

237. **Magdelaine, P., and P. Dulion.** 2005. Presented at the Sixièmes Journées de la Recherche Avicole, St Malo, France, 30-31 mars 2005.
238. **Magnino, S., D. Haag-Wackernagel, I. Geigenfeind, S. Helmecke, A. Dovc, E. Prukner-Radovcic, E. Residbegovic, V. Ilieski, K. Laroucau, M. Donati, S. Martinov, and E. F. Kaleta.** 2009. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. Vet Microbiol **135:**54-67.
239. **Maina, J. N., and M. Africa.** 2000. Inspiratory aerodynamic valving in the avian lung: functional morphology of the extrapulmonary primary bronchus. J Exp Biol **203:**2865-76.
240. **Marshall, D. G., D. C. Coleman, D. J. Sullivan, H. Xia, C. A. O'Morain, and C. J. Smyth.** 1996. Genomic DNA fingerprinting of clinical isolates of Helicobacter pylori using short oligonucleotide probes containing repetitive sequences. J Appl Bacteriol **81:**509-17.
241. **Matsumoto, A.** 1982a. Electron microscopic observations of surface projections on Chlamydia psittaci reticulate bodies. J Bacteriol **150:**358-64.
242. **Matsumoto, A.** 1982b. Surface projections of Chlamydia psittaci elementary bodies as revealed by freeze-deep-etching. J Bacteriol **151:**1040-2.
243. **Mazzola-Rossi, E.** 2007. Etude de la sensibilité de 5 lignées de poulets (*Gallus gallus*) vis-à-vis de l'infection expérimentale par *Aspergillus fumigatus*. Rapport de Master 2, Université Paris VI Pierre et Marie Curie.
244. **McAlpin, C. E., and B. Mannarelli.** 1995. Construction and characterization of a DNA probe for distinguishing strains of *Aspergillus flavus*. Appl Environ Microbiol **61:**1068-72.
245. **McDonald, S. E., and E. V. Bayer.** 1981. Psittacosis in pet birds. California Veterinarian **4:**6-17.
246. **McLelland, J.** 1979. Digestive system, p. 69-181. *In* A. S. King and J. McLelland (ed.), Form and function in birds, vol. 1. Academic Press, London.
247. **McLelland, J., and V. Molony.** 1983. Respiration, p. 63-85. *In* B. M. Freeman (ed.), Physiology and biochemistry of the domestic fowl, vol. 4. Academic Press, London.
248. **Meler, E., M. Dunn, and M. Lecuyer.** 2008. A retrospective study of canine persistent nasal disease: 80 cases (1998-2003). Can Vet J **49:**71-6.
249. **Mellado, E., T. M. Diaz-Guerra, M. Cuenca-Estrella, V. Buendia, J. Aspa, E. Prieto, J. R. Villagrasa, and J. L. Rodriguez-Tudela.** 2000. Characterization of a possible nosocomial aspergillosis outbreak. Clin Microbiol Infect **6:**543-8.
250. **Menard, A., M. Clerc, A. Subtil, F. Megraud, C. Bebear, and B. de Barbeyrac.** 2006. Development of a real-time PCR for the detection of *Chlamydia psittaci*. J Med Microbiol **55:**471-3.
251. **Meyer, K. F.** 1960. Some Remarks Concerning the Ecology of Bedsonia Infections, p. 261-265, Cellular and molecular life sciences, vol. 16.
252. **Meyer, K. F., and B. Eddie.** 1933. Latente Psittakoseinfektion bei Sittichen. Zschr. Infektkrankh. d. Haustiere **44:**237-242.
253. **Mignon-Grasteau, S., A. Boissy, J. Bouix, J. M. Faure, A. D. Fischer, G. N. Hinch, P. Jensen, P. Le Neindre, P. Mormède, P. Prune, M. Vandeputte, and C. Beaumont.** 2005. Genetics of adaptation and domestication in livestock. Livestock Production Science **93:**3-14.
254. **Monod, M., S. Capoccia, B. Lechenne, C. Zaugg, M. Holdom, and O. Jousson.** 2002. Secreted proteases from pathogenic fungi. Int J Med Microbiol **292:**405-19.
255. **Monod, O., G. Pesle, and Segretain.** 1951. [Bronchiectazing aspergilloma.]. Presse Med **59:**1557-9.
256. **Montiel, D., M. J. Dickinson, H. A. Lee, P. S. Dyer, D. J. Jeenes, I. N. Roberts, S. James, L. J. Fuller, K. Matsuchima, and D. B. Archer.** 2003. Genetic differentiation of the *Aspergillus* section Flavi complex using AFLP fingerprints. Mycol Res **107:**1427-34.
257. **Moody, S. F., and B. M. Tyler.** 1990. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of the *Aspergillus flavus* group: *A. flavus, A. parasiticus,* and *A. nomius*. Appl Environ Microbiol **56:**2441-52.
258. **Moore, F. M., and M. L. Petrak.** 1985. Chlamydia immunoreactivity in birds with psittacosis: localization of *chlamydiae* by the peroxidase-antiperoxidase method. Avian Dis **29:**1036-42.
259. **Morris, G., M. H. Kokki, K. Anderson, and M. D. Richardson.** 2000. Sampling of *Aspergillus* spores in air. J Hosp Infect **44:**81-92.
260. **Morris, M. P., and O. J. Fletcher.** 1988. Disease prevalence in Georgia turkey flocks in 1986. Avian Dis **32:**404-6.
261. **Moulder, J. W.** 1983. Inhibition of onset of overt multiplication of Chlamydia psittaci in persistently infected mouse fibroblasts (L cells). Infect Immun **39:**898-907.

262. **Moulder, J. W.** 1991. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. Microbiol Rev **55:**143-90.
263. **Moulder, J. W.** 1966. The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses. Annu Rev Microbiol **20:**107-30.
264. **Mousa, H. A. A., A. A. El Monla, W. W. Reda, and M. H. H. Ahmed.** 1996. Detection of Chlamydiosis in Domestic Ducks in Giza Governorate, Egypt. Vet. Med. J., Giza. **44:**37-40.
265. **Mullbacher, A., P. Waring, and R. D. Eichner.** 1985. Identification of an agent in cultures of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immunomodulating activity in vitro. J Gen Microbiol **131:**1251-8.
266. **Neuveglise, C., J. Sarfati, J. P. Latge, and S. Paris.** 1996. Afut1, a retrotransposon-like element from *Aspergillus fumigatus*. Nucleic Acids Res **24:**1428-34.
267. **Newman, C. P., S. R. Palmer, F. D. Kirby, and E. O. Caul.** 1992. A prolonged outbreak of ornithosis in duck processors. Epidemiol Infect **108:**203-10.
268. **Nierman, W. C., A. Pain, M. J. Anderson, J. R. Wortman, H. S. Kim, J. Arroyo, M. Berriman, K. Abe, D. B. Archer, C. Bermejo, J. Bennett, P. Bowyer, D. Chen, M. Collins, R. Coulsen, R. Davies, P. S. Dyer, M. Farman, N. Fedorova, T. V. Feldblyum, R. Fischer, N. Fosker, A. Fraser, J. L. Garcia, M. J. Garcia, A. Goble, G. H. Goldman, K. Gomi, S. Griffith-Jones, R. Gwilliam, B. Haas, H. Haas, D. Harris, H. Horiuchi, J. Huang, S. Humphray, J. Jimenez, N. Keller, H. Khouri, K. Kitamoto, T. Kobayashi, S. Konzack, R. Kulkarni, T. Kumagai, A. Lafon, J. P. Latge, W. Li, A. Lord, C. Lu, W. H. Majoros, G. S. May, B. L. Miller, Y. Mohamoud, M. Molina, M. Monod, I. Mouyna, S. Mulligan, L. Murphy, S. O'Neil, I. Paulsen, M. A. Penalva, M. Pertea, C. Price, B. L. Pritchard, M. A. Quail, E. Rabbinowitsch, N. Rawlins, M. A. Rajandream, U. Reichard, H. Renauld, G. D. Robson, S. Rodriguez de Cordoba, J. M. Rodriguez-Pena, C. M. Ronning, S. Rutter, S. L. Salzberg, M. Sanchez, J. C. Sanchez-Ferrero, D. Saunders, K. Seeger, R. Squares, S. Squares, M. Takeuchi, F. Tekaia, G. Turner, C. R. Vazquez de Aldana, J. Weidman, O. White, J. Woodward, J. H. Yu, C. Fraser, J. E. Galagan, K. Asai, M. Machida, N. Hall, B. Barrell, and D. W. Denning.** 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature **438:**1151-6.
269. **Nietfeld, J. C.** 2001. Chlamydial infections in small ruminants. Vet Clin North Am Food Anim Pract **17:**301-14, vi.
270. **Norme_Française.** AFNOR NF U-47-007.
271. **O'Gorman, C. M., H. T. Fuller, and P. S. Dyer.** 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen Aspergillus fumigatus. Nature **457:**471-4.
272. **O'Malley, B.** 2005. Clinical anatomy and physiology of exotic species: Structure and function of mammals, birds, reptiles and amphibians. Elsevier Saunders.
273. **O'Meara, D. C., and H. L. Chute.** 1959. Presented at the 31st Northeastern Conference on Avian Disease, University of Connecticut, Storrs, Conn.
274. **Ohya, K., Y. Takahara, E. Kuroda, S. Koyasu, S. Hagiwara, M. Sakamoto, M. Hisaka, K. Morizane, S. Ishiguro, T. Yamaguchi, and H. Fukushi.** 2008. Chlamydophila felis CF0218 is a novel TMH family protein with potential as a diagnostic antigen for diagnosis of C. felis infection. Clin Vaccine Immunol **15:**1606-15.
275. **OIE.** 2005. Chapitre 2.7.4. Chlamydiose aviaire. *In* Office_International_des_Epizooties (ed.), Manuel terrestre.
276. **Ok, M., J. P. Latge, C. Baeuerlein, F. Ebel, M. Mezger, M. Topp, O. Kurzai, D. Killian, M. Kapp, G. U. Grigoleit, H. Sennefelder, J. Arroyo, H. Einsele, and J. Loeffler.** 2009. Immune responses of human immature dendritic cells can be modulated by the recombinant *Aspergillus fumigatus* antigen Aspf1. Clin Vaccine Immunol **16:**1485-92.
277. **Oldach, D. W., C. A. Gaydos, L. M. Mundy, and T. C. Quinn.** 1993. Rapid diagnosis of *Chlamydia psittaci* pneumonia. Clin Infect Dis **17:**338-43.
278. **Olias, P., I. D. Jacobsen, and A. D. Gruber.** 2010. Fungal species identification from avian lung specimens by single hypha laser microdissection and PCR product sequencing. Med Mycol.
279. **Orfila, J.** 1982. [General characteristics of Chlamydia]. Rev Int Trach Pathol Ocul Trop Subtrop Sante Publique**:**25-9.
280. **Page, L. A.** 1959. Experimental ornithosis in turkeys. *In* A. A. o. A. Pathologists (ed.), Avian diseases.
281. **Page, L. A.** 1966. Interspecies transfer of psittacosis-LGV-trachoma agents: pathogenicity of two avian and two mammalian strains for eight species of birds and mammals. Am J Vet Res **27:**397-407.

282. **Page, L. A.** 1978. Stimulation of cell-mediated immunity of chlamydiosis in turkeys by inoculation of chlamydial bacterin. Am J Vet Res **39:**473-80.

283. **Page, L. A., J. M. Patterson, M. H. Roepke, and F. O. Glaser.** 1967. Studies on the biophysical characteristics of antibodies produced in birds and mammals in response to exerpimental chlamydial infection (psittacosis). J Immunol **98:**732-8.

284. **Pannekoek, Y., V. Dickx, D. S. Beeckman, K. A. Jolley, W. C. Keijzers, E. Vretou, M. C. Maiden, D. Vanrompay, and A. Van der Ende.** 2010. Multi Locus Sequence Typing of *Chlamydia* Reveals an Association between *Chlamydia psittaci* Genotypes and Host Species. PLoS One **5**.

285. **Pantchev, A., R. Sting, R. Bauerfeind, J. Tyczka, and K. Sachse.** 2009b. Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. Comp Immunol Microbiol Infect Dis **33:**473-84.

286. **Pantchev, A., R. Sting, R. Bauerfeind, J. Tyczka, and K. Sachse.** 2009a. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. Vet J **181:**145-50.

287. **Paris, S., and J. P. Latge.** 2001. Afut2, a new family of degenerate gypsy-like retrotransposon from *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol **39:**195-8.

288. **Parta, M., Y. Chang, S. Rulong, P. Pinto-DaSilva, and K. J. Kwon-Chung.** 1994. HYP1, a hydrophobin gene from *Aspergillus fumigatus*, complements the rodletless phenotype in *Aspergillus nidulans*. Infect Immun **62:**4389-95.

289. **Pasanen, A. L., P. Kalliokoski, P. Pasanen, M. J. Jantunen, and A. Nevalainen.** 1991. Laboratory studies on the relationship between fungal growth and atmospheric temperature and humidity Environment International **17:**225-228.

290. **Patel, R., and C. V. Paya.** 1997. Infections in solid-organ transplant recipients. Clin Microbiol Rev **10:**86-124.

291. **Patterson, J. E., A. Zidouh, P. Miniter, V. T. Andriole, and T. F. Patterson.** 1997. Hospital epidemiologic surveillance for invasive aspergillosis: patient demographics and the utility of antigen detection. Infect Control Hosp Epidemiol **18:**104-8.

292. **Peden, W. M., and K. R. Rhoades.** 1992. Pathogenicity differences of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* in turkeys. Avian Dis **36:**537-42.

293. **Pelle-Duporte, D., and J. C. Gendre.** 2001. Épidémie d'ornithose dans un abattoir de volailles. Arch. Mal. Prof. **85:**49-57.

294. **Pelle-Duporte, D., S. Kouyoumdjian, E. Tuchais, B. Carbonelle, and B. Simon.** 1996. Une épidémie d'ornithose dans un abattoir de volailles. Arch. Mal. Prof. **57:**51-54.

295. **Pendaries, C.** 2010. Synthèse n°2010/119. Agreste-Aviculture.

296. **Pepys, J., R. W. Riddell, K. M. Citron, Y. M. Clayton, and E. I. Short.** 1959. Clinical and immunologic significance of *Aspergillus fumigatus* in the sputum. Am Rev Respir Dis **80:**167-80.

297. **Perrone, G., G. Mule, A. Susca, P. Battilani, A. Pietri, and A. Logrieco.** 2006. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. Appl Environ Microbiol **72:**680-5.

298. **Petraitis, V., R. Petraitiene, A. H. Groll, K. Roussillon, M. Hemmings, C. A. Lyman, T. Sein, J. Bacher, I. Bekersky, and T. J. Walsh.** 2002. Comparative antifungal activities and plasma pharmacokinetics of micafungin (FK463) against disseminated candidiasis and invasive pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits. Antimicrob Agents Chemother **46:**1857-69.

299. **Pier, A. C., and J. L. Richard.** 1992. Mycoses and mycotoxicoses of animals caused by aspergilli. Biotechnology **23:**233-48.

300. **Pinello, C., J. L. Richard, and L. H. Tiffany.** 1977. Mycoflora of a turkey confinement brooder house. Poult Sci **56:**1920-1926.

301. **Polkinghorne, A., N. Borel, A. Becker, Z. H. Lu, D. R. Zimmermann, E. Brugnera, A. Pospischil, and L. Vaughan.** 2009. Molecular evidence for chlamydial infections in the eyes of sheep. Vet Microbiol **135:**142-6.

302. **Popov, V., F. Eb, J. F. Lefebvre, J. Orfila, and A. Viron.** 1978. Morphological and cytochemical study of Chlamydia with EDTA regressive technique and Gautier staining in ultrathin frozen sections of infected cell cultures: a comparison with embedded material. Ann Microbiol (Paris) **129 B:**313-37.

303. **Pospischil, A., R. Thoma, M. Hilbe, P. Grest, and J. O. Gebbers.** 2002. Abortion in woman caused by caprine Chlamydophila abortus (Chlamydia psittaci serovar 1). Swiss Med Wkly **132:**64-6.

304. **Pourcel, C., F. Andre-Mazeaud, H. Neubauer, F. Ramisse, and G. Vergnaud.** 2004. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. BMC Microbiol **4:**22.

305. **Pourcel, C., K. Hormigos, L. Onteniente, O. Sakwinska, R. H. Deurenberg, and G. Vergnaud.** 2009. Improved multiple-locus variable-number tandem-repeat assay for *Staphylococcus aureus* genotyping, providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value. J Clin Microbiol **47:**3121-8.

306. **Puers, C., H. A. Hammond, L. Jin, C. T. Caskey, and J. W. Schumm.** 1993. Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01[AATG]n and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder. Am J Hum Genet **53:**953-8.

307. **Raclasky, V., J. Trtkova, L. Ruskova, V. Buchta, R. Bolehovska, M. Vackova, and P. Hamal.** 2006. Primer R108 performs best in the RAPD strain typing of three *Aspergillus* species frequently isolated from patients. Folia Microbiol (Praha) **51:**136-40.

308. **Rake, G., and H. P. Jones.** 1942. Studies on Lymphogranuloma Venereum : I. Development of the Agent in the Yolk Sac of the Chicken Embryo. J Exp Med **75:**323-38.

309. **Rank, R. G., and M. M. Sanders.** 1992. Pathogenesis of endometritis and salpingitis in a guinea pig model of chlamydial genital infection. Am J Pathol **140:**927-36.

310. **Rath, P. M., K. Petermeier, P. E. Verweij, and R. Ansorg.** 2002. Differentiation of *Aspergillus ustus* strains by random amplification of polymorphic DNA. J Clin Microbiol **40:**2231-3.

311. **Read, T. D., R. C. Brunham, C. Shen, S. R. Gill, J. F. Heidelberg, O. White, E. K. Hickey, J. Peterson, T. Utterback, K. Berry, S. Bass, K. Linher, J. Weidman, H. Khouri, B. Craven, C. Bowman, R. Dodson, M. Gwinn, W. Nelson, R. DeBoy, J. Kolonay, G. McClarty, S. L. Salzberg, J. Eisen, and C. M. Fraser.** 2000. Genome sequences of Chlamydia trachomatis MoPn and Chlamydia pneumoniae AR39. Nucleic Acids Res **28:**1397-406.

312. **Redig, P. T.** 1994. Presented at the The Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians, Reno, Nevada, USA.

313. **Reese, S., G. Dalamani, and B. Kaspers.** 2006. The avian lung-associated immune system: a review. Vet Res **37:**311-24.

314. **Reinhold, P., C. Ostermann, S. Langenberg, S. Stahlberg, I. Lemser, E. Schubert, and K. Sachse.** 2009. Presented at the First European Meeting on Animal Chlamydioses (EMAC), Murcia, Spain.

315. **Reinhold, P., K. Sachse, and B. Kaltenboeck.** 2010. Chlamydiaceae in cattle: Commensals, trigger organisms, or pathogens? Vet J.

316. **Rementeria, A., N. Lopez-Molina, A. Ludwig, A. B. Vivanco, J. Bikandi, J. Ponton, and J. Garaizar.** 2005. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. Rev Iberoam Micol **22:**1-23.

317. **Renwick, J., P. Daly, E. P. Reeves, and K. Kavanagh.** 2006. Susceptibility of larvae of Galleria mellonella to infection by Aspergillus fumigatus is dependent upon stage of conidial germination. Mycopathologia **161:**377-84.

318. **Richard, J. L., R. C. Cutlip, J. R. Thurston, and J. Songer.** 1981. Response of turkey poults to aerosolized spores of *Aspergillus fumigatus* and aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. Avian Dis **25:**53-67.

319. **Richard, J. L., W. M. Peden, and J. M. Sacks.** 1991. Effects of adjuvant-augmented germling vaccines in turkey poults challenged with *Aspergillus fumigatus*. Avian Dis **35:**93-9.

320. **Richard, J. L., and J. R. Thurston.** 1983. Rapid hematogenous dissemination of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* spores in turkey poults following aerosol exposure. Avian Dis **27:**1025-33.

321. **Richard, J. L., J. R. Thurston, W. M. Peden, and C. Pinello.** 1984. Recent studies on aspergillosis in turkey poults. Mycopathologia **87:**3-11.

322. **Rockey, D. D., and A. Matsumoto.** 2000. The chlamydial developmental cycle, p. 403-425. *In* Y. V. Brun and L. J. Shimkets (ed.), Prokaryotic Development. ASM Press, Washington D. C.

323. **Rodolakis, A.** 1993. Les infections à *Chlamydia psittaci* : acquisitions récentes et applications au diagnostic et à l'épidémiologie des chlamydioses aviaires, canines et félines. Prat. Méd. Chir. Anim. Comp. **28:**321-330.

324. **Rodolakis, A., and L. Chancerelle.** 1977. [Plaque assay for Chlamydia psittaci in tissue samples (author's transl)]. Ann Microbiol (Paris) **128B:**81-5.

325. **Rodolakis, A., J. Salinas, and J. Papp.** 1998. Recent advances on ovine chlamydial abortion. Vet Res **29:**275-88.
326. **Roger, A. J., and A. G. Simpson.** 2009. Evolution: revisiting the root of the eukaryote tree. Curr Biol **19:**R165-7.
327. **Rogers, D. G., and A. A. Andersen.** 2000. Intestinal lesions caused by a strain of *Chlamydia suis* in weanling pigs infected at 21 days of age. J Vet Diagn Invest **12:**233-239.
328. **Rogers, D. G., and A. A. Andersen.** 1996. Intestinal lesions caused by two swine chlamydial isolates in gnotobiotic pigs. J Vet Diagn Invest **8:**433-40.
329. **Rogozin, I. B., M. K. Basu, M. Csuros, and E. V. Koonin.** 2009. Analysis of rare genomic changes does not support the unikont-bikont phylogeny and suggests cyanobacterial symbiosis as the point of primary radiation of eukaryotes. Genome Biol Evol **1:**99-113.
330. **Rohde, G., E. Straube, A. Essig, P. Reinhold, and K. Sachse.** 2010. Chlamydial zoonoses. Dtsch Arztebl Int **107:**174-80.
331. **Roosendaal, R., J. M. Walboomers, O. R. Veltman, I. Melgers, C. Burger, O. P. Bleker, D. M. MacClaren, C. J. Meijer, and A. J. van den Brule.** 1993. Comparison of different primer sets for detection of *Chlamydia trachomatis* by the polymerase chain reaction. J Med Microbiol **38:**426-33.
332. **Ross, B. C., K. Raios, K. Jackson, and B. Dwyer.** 1992. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from Mycobacterium tuberculosis and its use as an epidemiological tool. J Clin Microbiol **30:**942-6.
333. **Ruhnke, M., A. Bohme, D. Buchheidt, K. Donhuijsen, H. Einsele, R. Enzensberger, A. Glasmacher, H. Gumbel, C. P. Heussel, M. Karthaus, E. Lambrecht, T. Sudhoff, and H. Szelenyi.** 2003. Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). Ann Hematol **82 Suppl 2:**S141-8.
334. **Sachse, K., E. Grossmann, A. Berndt, C. Schutt, K. Henning, D. Theegarten, O. Anhenn, and P. Reinhold.** 2004. Respiratory chlamydial infection based on experimental aerosol challenge of pigs with Chlamydia suis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27:**7-23.
335. **Sachse, K., K. Laroucau, H. Hotzel, E. Schubert, R. Ehricht, and P. Slickers.** 2008. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of *ompA* genes. BMC Microbiol **8:**63.
336. **Saito, T., J. Ohnishi, Y. Mori, Y. Iinuma, S. Ichiyama, and F. Kohi.** 2005. Infection by Chlamydophilia avium in an elderly couple working in a pet shop. J Clin Microbiol **43:**3011-3.
337. **Salisch, H., K. Von Malottki, M. Ryll, and K.-H. Hinz.** 1996. Chlamydial infections of poultry and human health. World's Poultry Science Journal **52: 279-308**.
338. **Sambyal, D. S., K. K. Baxi, and R. C. Katcoh.** 1981. A study of the mycoflora of hatcheries. Mykosen **24:**313-7.
339. **Sandoz, K. M., and D. D. Rockey.** 2010. Antibiotic resistance in *Chlamydiae*. Future Microbiol **5:**1427-42.
340. **Sarfati, J., M. Diaquin, J. P. Debeaupuis, A. Schmidt, D. Lecaque, A. Beauvais, and J. P. Latge.** 2002. A new experimental murine aspergillosis model to identify strains of Aspergillus fumigatus with reduced virulence. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi **43:**203-13.
341. **Sauter, E. A., C. F. Petersen, E. E. Steele, J. F. Parkinson, J. E. Dixon, and R. C. Stroh.** 1981. The airborne microflora of poultry houses. Poult Sci **60:**569-74.
342. **Sayada, C., A. A. Andersen, C. Storey, A. Milon, F. Eb, N. Hashimoto, K. Hirai, J. Elion, and E. Denamur.** 1995. Usefulness of omp1 restriction mapping for avian *Chlamydia psittaci* isolate differentiation. Res Microbiol **146:**155-65.
343. **Schachter, J., and H. D. Caldwell.** 1980. Chlamydiae. Annu Rev Microbiol **34:**285-309.
344. **Scheid, P., and J. Piiper.** 1972. Cross current gas exchange in avian lungs: Effect of reversed parabronchial air flow in ducks, p. 304-312, Respiration physiology, vol. 16.
345. **Scheid, P., and J. Piiper.** 1989. Respiratory mechanics and air flow in birds, p. 369-392. *In* A. S. King and J. McLelland (ed.), Form and function in birds. Academic Press, London.
346. **Schiller, I., A. Schifferli, P. Gysling, and A. Pospischil.** 2004. Growth characteristics of porcine chlamydial strains in different cell culture systems and comparison with ovine and avian chlamydial strains. Vet J **168:**74-80.

347. **Schmidt, A., and M. H. Wolff.** 1997. Morphological characteristics of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patient samples. Mycoses **40:**347-51.
348. **Schmidt, H., M. Ehrmann, R. F. Vogel, M. H. Taniwaki, and L. Niessen.** 2003. Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP. Syst Appl Microbiol **26:**138-46.
349. **Schmidt, H., M. H. Taniwaki, R. F. Vogel, and L. Niessen.** 2004. Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. J Appl Microbiol **97:**899-909.
350. **Schouls, L. M., H. G. van der Heide, L. Vauterin, P. Vauterin, and F. R. Mooi.** 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:**5496-505.
351. **Schvoerer, C., and P. Guillaumot.** 1998. Epidémie de psittacose dans un abattoir de volailles du Morbihan, DRASS de Bretagne. CIRE- Ouest, Rennes.
352. **Segal, B. H., and T. J. Walsh.** 2006. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. Am J Respir Crit Care Med **173:**707-17.
353. **Semighini, C. P., G. Delmas, S. Park, D. Amstrong, D. Perlin, and G. H. Goldman.** 2001. New restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers for *Aspergillus fumigatus*. FEMS Immunol Med Microbiol **31:**15-9.
354. **Shatkin, A. A., O. E. Orlova, V. L. Popov, S. R. Beskina, and V. N. Pankratova.** 1985. [Persistent Chlamydia infection in cell culture]. Vestn Akad Med Nauk SSSR**:**51-5.
355. **Sheppard, D. C., G. Rieg, L. Y. Chiang, S. G. Filler, J. E. Edwards, Jr., and A. S. Ibrahim.** 2004. Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother **48:**1908-11.
356. **Sherif, R., and B. H. Segal.** 2010. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. Curr Opin Pulm Med **16:**242-50.
357. **Shewen, P. E.** 1980. Chlamydial infection in animals: a review. Can Vet J **21:**2-11.
358. **Simpson, A. G., and A. J. Roger.** 2002. Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. Curr Biol **12:**R691-3.
359. **Simpson, A. G., and A. J. Roger.** 2004. Excavata and the Origin of Amitochondriate Eukaryotes, p. 27-54. *In* R. P. Hirt and D. S. Horner (ed.), Organelles, Genomes and Eukaryote Phylogeny, vol. 1.
360. **Sipsas, N. V., G. P. Bodey, and D. P. Kontoyiannis.** 2005. Perspectives for the management of febrile neutropenic patients with cancer in the 21st century. Cancer **103:**1103-13.
361. **Skowasch, K., P. Wiegand, and B. Brinkmann.** 1992. pMCT 118 (D1S80): a new allelic ladder and an improved electrophoretic separation lead to the demonstration of 28 alleles. Int J Legal Med **105:**165-8.
362. **Smith, K. A., K. K. Bradley, M. G. Stobierski, and L. A. Tengelsen.** 2005. Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* (formerly *Chlamydia psittaci*) infection among humans (psittacosis) and pet birds. National Association of State Public Health Veterinarians (NASPHV) Psittacosis Compendium Committee.
363. **Soloff, B. L., R. G. Rank, and A. L. Barron.** 1982. Ultrastructural studies of chlamydial infection in guinea-pig urogenital tract. J Comp Pathol **92:**547-58.
364. **Spalatin, J., C. E. Fraser, R. Connell, R. P. Hanson, and D. T. Berman.** 1966. Agents of psittacosis-lymphogranuloma venereum group isolated from muskrats and snowshoe hares in Saskatchewan. Can J Comp Med Vet Sci **30:**260-4.
365. **Spreadbury, C. L., B. W. Bainbridge, and J. Cohen.** 1990. Restriction fragment length polymorphisms in isolates of *Aspergillus fumigatus* probed with part of the intergenic spacer region from the ribosomal RNA gene complex of *Aspergillus nidulans*. J Gen Microbiol **136:**1991-4.
366. **Sraka, B.** 2004. Détection et quantification du portage de Chlamydophila psittaci chez le canard mulard en gavage : enquête de prévalence. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse.
367. **Stamp, J. T.** 1950. Abortion of sheep. Vet Rec **62:**778-80.
368. **Steenkamp, E. T., J. Wright, and S. L. Baldauf.** 2006. The protistan origins of animals and fungi. Mol Biol Evol **23:**93-106.
369. **Steinbach, W. J., D. A. Stevens, D. W. Denning, and R. B. Moss.** 2003. Advances against aspergillosis. Clin Infect Dis **37 Suppl 3:**S155-6.

370. **Stephens, R. S., R. Sanchez-Pescador, E. A. Wagar, C. Inouye, and M. S. Urdea.** 1987. Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. J Bacteriol **169:**3879-85.
371. **Sting, R., and H. M. Hafez.** 1992. Purification of *Chlamydia psittaci* antigen by affinity chromatography on polymyxin B agarose for use in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Zentralbl Bakteriol **277:**436-45.
372. **Storey, C., M. Lusher, P. Yates, and S. Richmond.** 1993. Evidence for Chlamydia pneumoniae of non-human origin. J Gen Microbiol **139:**2621-6.
373. **Sudler, C., L. E. Hoelzle, I. Schiller, and R. K. Hoop.** 2004. Molecular characterisation of chlamydial isolates from birds. Vet Microbiol **98:**235-41.
374. **Sutton, P., N. R. Newcombe, P. Waring, and A. Mullbacher.** 1994. In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. Infect Immun **62:**1192-8.
375. **Sutton, P., P. Waring, and A. Mullbacher.** 1996. Exacerbation of invasive aspergillosis by the immunosuppressive fungal metabolite, gliotoxin. Immunol Cell Biol **74:**318-22.
376. **Svirshchevskaya, E. V., M. A. Shevchenko, D. Huet, F. Femenia, J. P. Latge, P. Boireau, and N. P. Berkova.** 2009. Susceptibility of mice to invasive aspergillosis correlates with delayed cell influx into the lungs. Int J Immunogenet **36:**289-99.
377. **Sykes, J. E.** 2005. Feline chlamydiosis. Clin Tech Small Anim Pract **20:**129-34.
378. **Takahashi, T., I. Takashima, and N. Hashimoto.** 1988. A chicken model of systemic infection with *Chlamydia psittaci*: comparison of the virulence among avian and mammalian strains. Nippon Juigaku Zasshi **50:**622-31.
379. **Takashima, I., M. Hiyoshi, H. Kariwa, R. Mukaiya, and N. Hashimoto.** 1996. Experimental *Chlamydia psittaci* infection of Japanese quail. Microbiol Immunol **40:**265-70.
380. **Tanaka, C., T. Miyazawa, M. Watarai, and N. Ishiguro.** 2005. Bacteriological survey of feces from feral pigeons in Japan. J Vet Med Sci **67:**951-3.
381. **Tappe, J. P., A. A. Andersen, and N. F. Cheville.** 1989. Respiratory and pericardial lesions in turkeys infected with avian or mammalian strains of Chlamydia psittaci. Vet Pathol **26:**386-95.
382. **Taylor, D. R.** 2009. Risk assessment in asthma and COPD: a potential role for biomarkers? Thorax **64:**261-4.
383. **Taylor, J. J., and E. J. Burroughs.** 1973. Experimental avian aspergillosis. Mycopathol Mycol Appl **51:**131-41.
384. **Taylor, J. W., and M. C. Fisher.** 2003. Fungal multilocus sequence typing--it's not just for bacteria. Curr Opin Microbiol **6:**351-6.
385. **Tell, L. A.** 2005. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. Med Mycol **43 Suppl 1:**S71-3.
386. **Thau, N., M. Monod, B. Crestani, C. Rolland, G. Tronchin, J. P. Latge, and S. Paris.** 1994. rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. Infect Immun **62:**4380-8.
387. **The_R_Development_Core_Team.** 2009. R: A Language and Environment for Statistical Computing, Version 2.9.2 (2009-08-24) ed.
388. **Thierry, S., D. Wang, P. Arne, M. Deville, B. De Bruin, A. Nieguitsila, C. Pourcel, K. Laroucau, R. Chermette, W. Huang, F. Botterel, and J. Guillot.** 2010. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing of *Aspergillus fumigatus*. BMC Microbiol **10:**315.
389. **Thornton, C. R.** 2010. Detection of invasive aspergillosis. Adv Appl Microbiol **70:**187-216.
390. **Thygeson, P., L. Hanna, C. Dawson, J. Zichosch, and E. Jawetz.** 1962. Inoculation of human volunteer with egg-grown inclusion conjunctivitis virus. Am J Ophthalmol **53:**786-95.
391. **Toth, T. E., P. Siegel, and H. Veit.** 1987. Cellular defense of the avian respiratory system. Influx of phagocytes: elicitation versus activation. Avian Dis **31:**861-7.
392. **Tran-Dinh, N., and D. Carter.** 2000. Characterization of microsatellite loci in the aflatoxigenic fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Mol Ecol **9:**2170-2.
393. **Tsai, H. F., Y. C. Chang, R. G. Washburn, M. H. Wheeler, and K. J. Kwon-Chung.** 1998. The developmentally regulated alb1 gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. J Bacteriol **180:**3031-8.
394. **Tsai, S. S., J. H. Park, K. Hirai, and C. Itakura.** 1992. Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. Avian Pathol **21:**699-709.

395. **Upadhyay, S. K., L. Mahajan, S. Ramjee, Y. Singh, S. F. Basir, and T. Madan.** 2009. Identification and characterization of a laminin-binding protein of *Aspergillus fumigatus*: extracellular thaumatin domain protein (AfCalAp). J Med Microbiol **58:**714-22.
396. **Van Alstine, W. G., and L. H. Arp.** 1988. Histologic evaluation of lung and bronchus-associated lymphoid tissue in young turkeys infected with Bordetella avium. Am J Vet Res **49:**835-9.
397. **van Belkum, A., W. J. Melchers, C. Ijsseldijk, L. Nohlmans, H. Verbrugh, and J. F. Meis.** 1997. Outbreak of amoxicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b: variable number of tandem repeats as novel molecular markers. J Clin Microbiol **35:**1517-20.
398. **Van Cutsem, J.** 1983. Antifungal activity of enilconazole on experimental Aspergillosis in chickens. Avian Dis **27:**36-42.
399. **Van Cutsem, J., F. Van Gerven, and P. A. Janssen.** 1989. Oral and parenteral therapy with saperconazole (R 66905) of invasive aspergillosis in normal and immunocompromised animals. Antimicrob Agents Chemother **33:**2063-8.
400. **Van Loock, M., K. Loots, M. Van Heerden, D. Vanrompay, and B. M. Goddeeris.** 2006. Exacerbation of *Chlamydophila psittaci* pathogenicity in turkeys superinfected by *Escherichia coli*. Vet Res **37:**745-55.
401. **Van Loock, M., D. Vanrompay, B. Herrmann, J. Vander Stappen, G. Volckaert, B. M. Goddeeris, and K. D. Everett.** 2003. Missing links in the divergence of Chlamydophila abortus from Chlamydophila psittaci. Int J Syst Evol Microbiol **53:**761-70.
402. **Vanhee, L. M., H. J. Nelis, and T. Coenye.** 2010. What can be learned from genotyping of fungi? Med Mycol **48 Suppl 1:**S60-9.
403. **Vanrompay, D., A. A. Andersen, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 1993a. Serotyping of European isolates of *Chlamydia psittaci* from poultry and other birds. J Clin Microbiol **31:**134-7.
404. **Vanrompay, D., P. Butaye, C. Sayada, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 1997. Characterization of avian Chlamydia psittaci strains using omp1 restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. Res Microbiol **148:**327-33.
405. **Vanrompay, D., E. Cox, P. Kaiser, S. Lawson, M. Van Loock, G. Volckaert, and B. Goddeeris.** 2001. Protection of turkeys against *Chlamydophila psittaci* challenge by parenteral and mucosal inoculations and the effect of turkey interferon-gamma on genetic immunization. Immunology **103:**106-12.
406. **Vanrompay, D., E. Cox, G. Volckaert, and B. Goddeeris.** 1999. Turkeys are protected from infection with *Chlamydia psittaci* by plasmid DNA vaccination against the major outer membrane protein. Clin Exp Immunol **118:**49-55.
407. **Vanrompay, D., R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 1995a. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. Vet Microbiol **45:**93-119.
408. **Vanrompay, D., R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 1992. Diagnosis of avian chlamydiosis: specificity of the modified Gimenez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures. Zentralbl Veterinarmed B **39:**105-12.
409. **Vanrompay, D., R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 1994. Pathogenicity for turkeys of *Chlamydia psittaci* strains belonging to the avian serovars A, B and D. Avian Pathol **23:**247-62.
410. **Vanrompay, D., R. Ducatelle, F. Haesebrouck, and W. Hendrickx.** 1993b. Primary pathogenicity of an European isolate of *Chlamydia psittaci* from turkey poults. Vet Microbiol **38:**103-13.
411. **Vanrompay, D., J. Mast, R. Ducatelle, F. Haesebrouck, and B. Goddeeris.** 1995b. *Chlamydia psittaci* in turkeys: pathogenesis of infections in avian serovars A, B and D. Vet Microbiol **47:**245-56.
412. **Veen, P. J.** 1973. Torticollis and disease of the respiratory tract, caused by *Aspergillus fumigatus* in fowl. Netherlands J Vet Sci **5:**132-133.
413. **Vergnaud, G., and F. Denoeud.** 2000. Minisatellites: mutability and genome architecture. Genome Res **10:**899-907.
414. **Vergnaud, G., and C. Pourcel.** 2006. Multiple Locus VNTR (Variable Number Tandem Repeat) Analysis, p. 83-104. *In* E. Stackebrandt (ed.), Molecular identification, Systematics and Population Structure of Prokaryotes. Springer-Verlag.
415. **Verminnen, K., D. S. Beeckman, N. N. Sanders, S. De Smedt, and D. C. Vanrompay.** 2010. Vaccination of turkeys against *Chlamydophila psittaci* through optimised DNA formulation and administration. Vaccine **28:**3095-105.
416. **Verminnen, K., M. Van Loock, H. M. Hafez, R. Ducatelle, F. Haesebrouck, and D. Vanrompay.** 2006. Evaluation of a recombinant enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Chlamydophila psittaci* antibodies in turkey sera. Vet Res **37:**623-32.

417. **Verweij, P. E., and J. F. Meis.** 2000. Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. Transpl Infect Dis **2:**80-7.
418. **Verweij, P. E., J. F. Meis, J. Sarfati, J. A. Hoogkamp-Korstanje, J. P. Latge, and W. J. Melchers.** 1996. Genotypic characterization of sequential *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol **34:**2595-7.
419. **Vonberg, R. P., and P. Gastmeier.** 2006. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. J Hosp Infect **63:**246-54.
420. **Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and et al.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res **23:**4407-14.
421. **Wages, D. P.** 1987. Diseases of pigeons. Vet Clin North Am Small Anim Pract **17:**1089-107.
422. **Walker.** 1915. Aspergillosis in the ostrich chick. Union South Africa Department Agriculture Annual Report**:**535-574.
423. **Wang, Y. W., H. Watanabe, D. C. Phung, S. K. Tung, Y. S. Lee, J. Terajima, S. Y. Liang, and C. S. Chiou.** 2009. Multilocus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing and phylogenetic analysis of *Shigella flexneri*. BMC Microbiol **9:**278.
424. **Ward, M. E.** 1983. Chlamydial classification, development and structure. Br Med Bull **39:**109-15.
425. **Wardlaw, A., and D. M. Geddes.** 1992. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: a review. J R Soc Med **85:**747-51.
426. **Warris, A., C. H. Klaassen, J. F. Meis, M. T. De Ruiter, H. A. De Valk, T. G. Abrahamsen, P. Gaustad, and P. E. Verweij.** 2003. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from water, air, and patients shows two clusters of genetically distinct strains. J Clin Microbiol **41:**4101-6.
427. **Watson, M. W., P. R. Lambden, and I. N. Clarke.** 1991. Genetic diversity and identification of human infection by amplification of the chlamydial 60-kilodalton cysteine-rich outer membrane protein gene. J Clin Microbiol **29:**1188-93.
428. **Whittaker, R. H.** 1969. New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. Science **163:**150-60.
429. **Wilt, P. C., N. Kordova, and J. C. Wilt.** 1972. Preliminary characterization of a chlamydial agent isolated from embryonated snow goose eggs in northern Canada. Can J Microbiol **18:**1327-32.
430. **Wittenbrink, M. M., M. Mrozek, and W. Bisping.** 1993. Isolation of Chlamydia psittaci from a chicken egg: evidence of egg transmission. Zentralbl Veterinarmed B **40:**451-2.
431. **Wollschlager, C., and F. Khan.** 1984. Aspergillomas complicating sarcoidosis. A prospective study in 100 patients. Chest **86:**585-8.
432. **Wood-Gush, D. G. M.** 1958. A history of the domestic chicken from antiquity to the 19th century. Poult Sci **37:**321-326.
433. **Wyman, A. R., and R. White.** 1980. A highly polymorphic locus in human DNA. Proc Natl Acad Sci U S A **77:**6754-8.
434. **Yang, J. M., H. X. Liu, Y. X. Hao, C. He, and D. M. Zhao.** 2006. Development of a rapid real-time PCR assay for detection and quantification of four familiar species of *Chlamydiaceae*. J Clin Virol **36:**79-81.
435. **Yousef Mohamad, K., A. Rekiki, G. Myers, P. M. Bavoil, and A. Rodolakis.** 2008. Identification and characterisation of coding tandem repeat variants in incA gene of Chlamydophila pecorum. Vet Res **39:**56.

ANNEXES

Communications

Communications orales :

THIERRY S, DE BRUIN B, DEVILLE M, ARNE P, BOTTEREL F, BRETAGNE S, NIEGUITSILA A, POURCEL C, LAROUCAU K, GUILLOT J., « **High performance typing of *Aspergillus fumigatus* by MLVA (MultiLocus VNTR Analysis)** », Congrès National de la Société Française de Mycologie Médicale, 28 Novembre 2008, Paris.

THIERRY S., « **Analyse du polymorphisme de marqueurs VNTR pour le pathogène opportuniste *Aspergillus fumigatus* : Un nouvel outil pour suivre la contamination des couvoirs, des bâtiments d'élevage et des oiseaux** », Journées des Doctorants et post-Doctorants ANSES, 21-22 Janvier 2010, Maisons-Alfort.

THIERRY S, ARNE P, DEVILLE M, LAROUCAU K, CHERMETTE R, BOTTEREL F, BRETAGNE S, POURCEL C, GUILLOT J., « **Une nouvelle technique de typage moléculaire d'*Aspergillus fumigatus* : est-ce bien nécessaire ?** », Congrès SFMM-SFP-SMV, 19-21 Mai 2010, Angers.

THIERRY S., « **Mise au point et validation d'une nouvelle technique de typage moléculaire d'*Aspergillus fumigatus*** », Journée des Doctorants ENVA, 22 Octobre 2010, Maisons-Alfort.

Communications écrites :

THIERRY S, DE BRUIN B, DEVILLE M, ARNE P, NIEGUITSILA A, BOTTEREL F, BRETAGNE S, POURCEL C, LAROUCAU K, GUILLOT J., « **Development of a high resolution typing for *Aspergillus fumigatus* : Multilocus VNTR Analysis** », ISHAM Congress, 25-29 Mai 2009, Tokyo, Japon.

THIERRY S, LE LOC'H G, MAZZOLA E, DESOUTTER A, FEMENIA F, HUET D, DEVILLE M, CHERMETTE R, TAFANI JP, GUILLOT J, ARNE P., « **Experimental model of pulmonary aspergillosis in domestic birds** », 18-21 Octobre 2009, Athènes, Grèce.

THIERRY S, TAFANI JP, DEVILLE M, CHERMETTE R, GUILLOT J, ARNE P., « **Development of an inhalational model of pulmonary aspergillosis in chickens** », 4th Advances Against Aspergillosis, 4-6 Février 2010, Rome, Italie.

WANG DY, THIERRY S, DEVILLE M, ARNE P, CHERMETTE R, LAROUCAU K, HUANG WY, GUILLOT J., « **Genetic diversity of *Aspergillus fumigatus* isolates from domestic birds in China (Guangxi province) and France** », 4th Advances Against Aspergillosis, 4-6 Février 2010, Rome, Italie.

Development of a high resolution typing for *Aspergillus fumigatus* : Multilocus VNTR Analysis

Thierry S[1], De Bruin B[1], Deville M[1,2], Arné P[1], Nieguitsila A[1], Botterel F[3], Bretagne S[3], Pourcel C[4], Laroucau K[5], Guillot J[1,2]

1 UMR AFSSA, ENVA, BIPAR, USC INRA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort; 2 Parasitology-Mycology Dept, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort; 3 Parasitology Dept, Faculté de Médecine de Créteil; 4 Genetic and Microbiology Institute, Université Paris-Sud 11, Orsay; 5 Bacterial Zoonoses Unit, AFSSA, Maisons-Alfort, France

Abstract

The genetic relationship between clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* can be studied using genetic fingerprinting with DNA-based methods. In the present study, we describe a new molecular typing method for *Aspergillus fumigatus*. This method is based on the detection of small genomic sequences (greater than 9 bp) repeated at least 3 times. A research of such sequences, called VNTR (Variable Number Tandem Repeat), was performed on whole available genome of *A. fumigatus* strain Af293 and a total of 77 VNTR were detected. These VNTR markers were tested on 30 clinical isolates and ten of them, spread on 4 different chromosomes, were finally selected for their applicability and discriminatory power.

A total number of 223 independent isolates (including 146 isolates from birds with or without aspergillosis, 76 isolates from patients with or without invasive aspergillosis and the reference strain CBS 144.89) were tested with the panel of 10 VNTR markers. After DNA extraction, amplification was obtained with the ten different couples of primers with the same PCR program for all markers. Amplicons were separated on agarose gel and the results were analysed using a specific software (Quantity One, Biorad). This analysis generated 210 different patterns. The Simpson's Diversity Index for the individual markers ranged from 0.4471 to 0.8344. The combination of all 10 markers yielded an index of 0.9995. Specific advantages and disadvantages of the MLVA method were evaluated in terms of applicability, ease of use, exchangeability and reproducibility within a laboratory. In the present study, the amplicons were easily analysed on agarose gel, but the reproducibility of the MLVA method can be increased by the use of fluorescently-labeled primers and access to high-resolution electrophoresis platforms.

This study confirmed the great diversity of genotypes in the *A. fumigatus* populations. The minimum spanning tree generated with the 223 isolates shows two main clusters that may be related to the clinical origin. One cluster included most of avian isolates whereas the other one included most of human isolates.

Introduction

Infection due to *Aspergillus fumigatus* remains a major cause of death in most warm-blooded vertebrates (mammals and birds). In humans, aspergillosis can be contracted during hospitalization (1), especially by patients during their first month after bone marrow transplantation. In birds, aspergillosis is commonly reported in turkey poults in large confinement houses (2), quails, marine birds that are brought into rehabilitation, captive raptors, and penguins being maintained in zoological parks. Young birds appear to be much more susceptible than adults. Tracking the sources of contamination is an essential preventive measure. Molecular tools provide a means of comparing isolates from patients or animals and from their environment to determine the source of contamination.

The MLVA method is based on the detection of small genomic sequences (greater or equal to 9 bp) repeat in tandem. The detection of this sequence, called VNTR for Variable Number Tandem Repeat, is made by PCR of targeted sequences and electrophosesis on agarose gel (3).

Material & methods

Aspergillus fumigatus isolates

- 51 isolates obtained from cases of aspergillosis in various avian species;
- 95 isolates collected from healthy ducks living in two farms;
- 76 isolates collected from patients of the haematology service at Henri Mondor Hospital (Créteil, France).

The reference strain CBS 144.89 was also included.
Strains were cultivated on Malt Agar at 37°C until conidia formation.

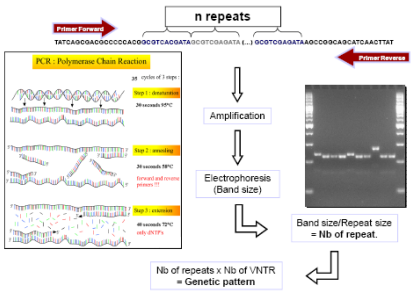
Isolates identification

Fungal isolates were identified macroscopically and microscopically. Definitive identification of *Aspergillus fumigatus* was further confirmed by sequencing of ß-Tubulin genes (4).

DNA isolation

Conidia were collected from sporulated cultures. Homogenisation was carried out using a high-speed mini-bead beater. Lysis and DNA extraction were performed using the Nucleospin DNA Extraction Kit.

Molecular analysis



Results & Discussion

Selection of VNTR markers for MLVA analysis

The research of VNTR markers was performed on the genome of *A. fumigatus* strain Af293 using Data Base of the University of Orsay and the Tandem Repeat Finder software associated. A total number of 77 tandem repeats (≥9bp) were identified. In order to evaluate polymorphisms within these potential markers, primers were chosen on both sides of the repeats and an initial set of 30 *A. fumigatus* isolates was analysed.
Migrations of PCR products on agarose gels indicated that 10 out of 77 VNTR markers (called Asp167, Asp202, Asp330, Asp443, Asp446, Asp165, Asp252, Asp345, Asp204, and Asp20) were polymorphic.
This panel of 10 VNTR markers was further evaluated on 193 other isolates, including one reference strain.

Discriminatory power

After typing by MLVA, 210 different genotypes were obtained.
In fact, only 13 genotypes were shared by two isolates.
The discriminatory power of the typing method was evaluated by using the Simpson's index of diversity (D).

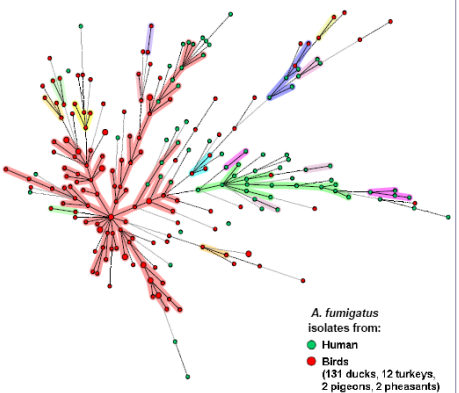
$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{s} n_j(n_j - 1)$$

- N = Number of isolates tested
- n_j = Number of isolates of *j* pattern

Simpson's index of MLVA method = 0,9995

Dendrograms

Data were analysed with Bionumerics software as a character dataset. The clustering was performed using the minimum spanning tree method.



Minimum spanning tree generated with 223 *A. fumigatus* isolates

Conclusions

For the first time, the characterization of VNTR markers is reported in *A. fumigatus* and the use of the MLVA typing system was investigated. The selected 10 VNTR markers are polymorphic, and reproducible typing can be obtained by the use of fluorescently-labeled primers and access to high resolution platforms analysis with an automatic sequencer.

This study confirmed the great diversity of genotypes in *A. fumigatus* populations. On the minimum spanning tree generated with the 223 isolates, two main clusters were generated. The first one (underlined in pink) included most of avian isolates whereas the second one (underlined in green) included most of human isolates.

References

(1)Latgé JP, 1999. *Aspergillus fumigatus* and asper-gillosis. Clin Microbiol Rev. 12:310-50

(2)Morris MP, Fletcher OJ, 1988. Disease prevalence in Georgian turkeys flocks in 1986. Avian Dis. 32:404-6

(3)Laroucau *et al.*, 2008. High resolution typing of *Chalmydophila psittaci* by Multi locus VNTR Analysis (MLVA). Infect Genet Evol. 8:171-81

(4)Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008. *Aspergillus* section *fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. Antimicrob Agents Chemother 52:1244-51

Experimental models of pulmonary aspergillosis in domestic birds

Thierry S[1], Le Loch' G[1], Mazzola E[1], Desouter A[1], Féménia F[1], Huet D[1], Deville M[1], Chermette R[1], Tafani JP[2] , Guillot J[1], Arné P[1]

1 UMR AFSSA, ENVA, BIPAR, USC INRA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France; 2 APCIS; Maisons-Alfort, France

Introduction

Aspergillus fumigatus thrives on decaying vegetation and organic debris. It releases large amounts of conidia, which are dispersed by air. Once inhaled, conidia are eliminated by most individuals. Birds are considered to be much more susceptible than mammals. Respiratory aspergillosis remains a major cause of morbidity and mortality in turkey poults in large confinement houses, quails, marine birds that are brought into rehabilitation, captive raptors, and penguins being maintained in zoological parks.

In vivo models allowing reproduction of aspergillosis in birds are very useful for studying host pathogen interactions and evaluating the effect of control measures. Depending on the aims of the experiment, different ways of inoculation can be used.

Models mimicking natural contamination may lead to a better understanding of infection in farm environment. Therefore, we developed experimental infections with *A. fumigatus* in turkeys (*Meleagris gallopavo*) and chickens (*Gallus gallus*) using two different inoculation routes (intra air-sac injection and aerosol).

Inoculation

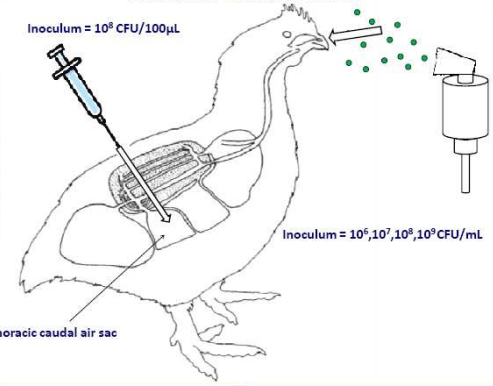
Intra air-sac injection

Sensitivity tested on different lineages of Leghorn chicks and Turkeys.

Groups	Avian species	Lineages	Nb of animals
1	Chicks	ND3	20
2	Chicks	PHA	20
3	Chicks	CC	20
4	Chicks	NS	20
5	Chicks	Fayoumi	20
6	Turkey	-	20

Daily observations : clinical status and weight.
Surviving animals euthanized 10 days post inoculation.

A. fumigatus strain (CBS 144.89)



Spore nebulization

Use of a medical nebulizer (Omron C29NE) on Leghorn chicks PA 12

Groups	Nb of chicks	Inoculum (CFU/mL)	Run time (min)	Nb of sacrified chicks after inoculation
1	7	10^6	20	1
2	7	10^7	20	1
3	16	10^8	20/30	4
4	18	10^9	30	6

Daily observations : clinical status and weight.
Surviving animals euthanized 7 days post inoculation.

Markers of infection

Clinical observations

Clinical signs and mortality at 3 days post inoculation in chicken and turkeys.
Normal growth

No mortality nor clinical signs
Normal growth

Macroscopic lesions and Mycology

Lesions (granuloma) were detected on the left thoracic caudal air sac and in the lungs.

The number of CFU in lungs decreased in time. After 10 days, the elimination of the fungal elements was almost achieved.

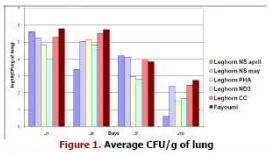


Figure 1. Average CFU/g of lung

Microscopic lesions

Histopathology on lung samples at different times after inoculation. This technique allowed us to follow day per day the process of the infection.

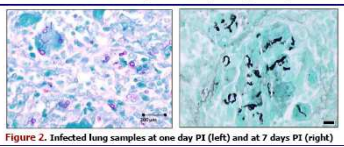


Figure 2. Infected lung samples at one day PI (left) and at 7 days PI (right)

Seric markers

⇒ ELISA
Measurement of galactomannan in serum by ELISA (antibody EBA-2, Platelia *Aspergillus*, BIO-RAD).

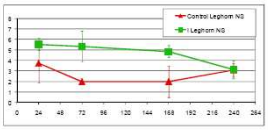


Figure 3. Example of ELISA results

⇒ Mass spectrometry
Sera analysed with a MALDI-TOF spectrometer (Autoflex, Brucker), and specter processed with the Clinprot Software.

Macroscopic lesions

Lesions (granuloma) were detected in air sacs in groups 3 and 4 (inoculum 10^8 and 10^9 CFU/mL)

Figure 4. Autopsy of a control chick (no lesion)

Figure 5. Autopsy of an inoculated chick. Lesions are detected in the left thoracic caudal air sac

Mycology

The number of viable conidia in trachea, air sacs and lungs was correlated to the inoculum size. After 7 days, the elimination of the fungal elements was almost achieved.

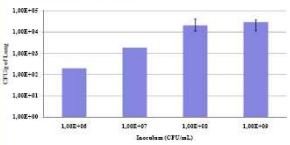


Figure 6. Number of viable conidia per gram of lung 5 minutes after inoculation

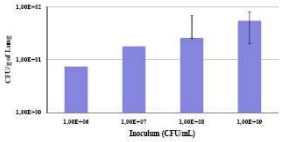


Figure 7. Number of viable conidia per gram of lung 7 days post inoculation.

Conclusions

	Advantages	Disadvantages
	Controlled administration of conidia	Localized infection
	Lesions and mortality observed	Artificial route of contamination
	Ease-of-use, no need of specific equipment.	Need of sedation
	Mimicks conditions of natural contamination	No mortality
	Better distribution in respiratory tract	Need of specific equipment (nebulizer)
	Inoculation made on conscious animals	Spores dispersion risk increase
	Repeated inoculation feasible	

Chickens are more resistant to experimental aspergillosis than the turkeys in the intra air sac model. The main perspective for the nebulization model is to improve the model in order to obtain some mortality and test different markers of infection. These two models could allow us to study the infection in birds more precisely and test various parameters and protocols: age of birds, selected lineages for different immune responses, immunodeficiency induction, coinfection and control treatment.

Development of an inhalational model of pulmonary aspergillosis in chickens

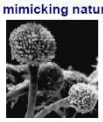
Thierry S[1], Tafani JP[2], Deville M[1], Chermette R[1], Guillot J[1], Arné P[1]

[1] UMR AFSSA, ENVA, UPVM BIPAR, Ecopham, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France
[2] APCIS, Maisons-Alfort, France

Introduction

Aspergillus fumigatus thrives on decaying vegetation and organic debris. It releases large amounts of conidia, which are dispersed by air. Once inhaled, conidia are eliminated by most individuals. Birds are considered to be much more susceptible than mammals. Respiratory aspergillosis remains a major cause of morbidity and mortality in turkey poults in large confinement houses, quails, marine birds that are brought into rehabilitation, captive raptors, and penguins being maintained in zoological parks.

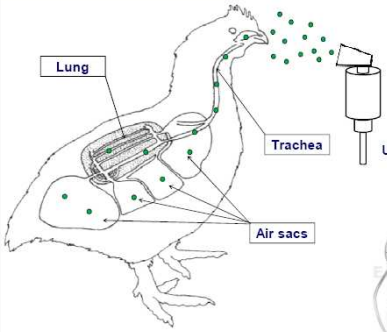
In vivo models allowing reproduction of aspergillosis in birds are very useful for studying host pathogen interactions and evaluating the effect of control measures. Models mimicking natural contamination may lead to a better understanding of infection in the farm environment.



In previous investigations, experimental aspergillosis was obtained in various avian species notably in chickens and turkeys (3, 4). These studies were performed with very high concentrations of dry conidia. The problem is the lack of reproducibility of both production and administration of such inocula. In the present study, we tried to develop a novel model of inhalational infection in chickens with a solution containing different concentrations of conidia. We used a method similar to that already proposed for mice and guinea pigs (5).

Material & methods

Spore nebulization



Inoculum = 10^6,10^7,10^8,10^9 CFU/mL

Groups	Inoculation	Nb of chicks	Inoculum (CFU/mL)	Run time (min)	Nb of sacrified chicks after inoculation (5 min)
1	once	7	10^6	20	1
2	once	7	10^7	20	1
3	once	32	10^8	20/30	12
4	once	18	10^9	30	6
5	twice	8	10^8	20	1/3

Use of a medical nebulizer (Omron C29NE) on Leghorn chicks PA 12

In group 5, two inoculations at 2 days interval

Controlled inoculation and observation chambers

Daily observations : clinical status and weight.

Surviving animals euthanized 7 days post inoculation.

Spores cultivated on Malt plate at 37°C

Results & Discussion

Clinical observations

No mortality nor clinical signs were observed. Animals had normal growth. We measured individual daily average gain as well as water and feed consumption. We observed a small decrease in these parameters between day 2 and 3 post inoculation for animals inoculated with 10^8 CFU/mL or more. No differences were observed between groups inoculated once and the group inoculated twice.

Macroscopic lesions

Lesions (granuloma) were detected in air sacs in groups 3, 4 and 5 (inoculum 10^8 and 10^9 CFU/mL). Both lungs exhibited lesions.

No additional effect was observed after a double inoculation.

Figure 1. Autopsy of a control chick (no lesion)

Figure 2. Autopsy of an inoculated chick. Lesions are detected in the left thoracic caudal air sac

Mycology

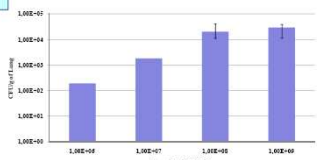


Figure 3. Number of viable conidia per gram of lung 5 minutes after inoculation

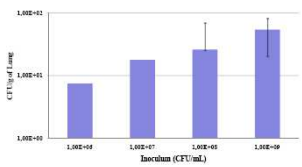


Figure 4. Number of viable conidia per gram of lung 7 days post inoculation.

The number of viable conidia in trachea, air sacs and lungs was correlated with the inoculum size. After 7 days, the elimination of the fungal elements was almost achieved. Similar counts were obtained in both lungs.

There was a saturation at 10^4 CFU/g of lung. After double inoculation, the number of viable conidia reached 3.10^4 CFU/g of lung.

In the present study, no birds died from aspergillosis. Nevertheless we obtained a good correlation between inoculum size and viable spores numeration in lungs. Deaths occurring in previous investigations were consecutive with very high concentrations of dry conidia. Such levels of exposition did not seem to be realistic in order to mimic natural conditions of contamination. Our method allowed us to aerosolize controlled and reproducible inoculum. Improvement of our technique should include prolonged nebulization to increase the number of spore inhaled and an evaluation of immunosuppression effects.

References

(1) Latgé JP et al., 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 12:310-50
(2) Morris MP, Fletcher OJ, 1988. Disease prevalence in Georgian turkeys flocks in 1986. Avian Dis. 32:404-6
(3) Faublée V, Boller M 1975. Rôle pathogène expérimental d'*Aspergillus fumigatus* chez le poulet. Rec Méd Vét 151 (8/9), 481-489.
(4) Richard JL et al., 1981. Response of turkey poults to aerosolized spores of *Aspergillus fumigatus* and aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. Avian Dis Vol. 25 N°1
(5) Sheppard DC et al., 2004. Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 48:1908-11

Genetic diversity of *Aspergillus fumigatus* isolates from domestic birds in China (Guangxi province) and France

WANG DY [1,2], THIERRY S [2], DEVILLE M [2], ARNE P [2], CHERMETTE R [2], LAROUCAU K [3], HUANG WY [1], GUILLOT J [2]

1 College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning, China
2 UMR AFSSA, ENVA, UPVM BIPAR, Ecopham, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France
3 Bacterial Zoonoses Unit, AFSSA-LERPAZ, Maisons-Alfort, France

Introduction

Respiratory aspergillosis remains a major cause of morbidity and mortality in turkey poults in large confinement houses, quails, marine birds, captive raptors and penguins. The use of molecular typing is a prerequisite for establishing epidemiological or phylogenetic links between *Aspergillus fumigatus* isolates. Various techniques have been reported so far such as RAPD, RFLP followed by Southern blot hybridization, AFLP and microsatellite polymorphism analysis. MLVA (multiple-locus variable-number tandem repeat analysis) is a new technique which has already been used for the typing of many different bacterial pathogens. The technique is based upon the variable copy numbers of tandem repeats (VNTR markers). We recently developed and validated this technique for rapid genotyping of *A. fumigatus*. In the present study, we compared many isolates collected from birds in France and China (Guangxi).

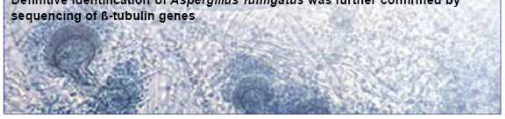
Isolates

146 isolates from France
- 51 isolates obtained from cases of avian aspergillosis
- 95 isolates collected from healthy ducks living in two farms

62 isolates from Guangxi Province, Mainland China
- 40 isolates collected from chicken broilers
- 8 isolates from layers
- 14 isolates from ducks

The reference strains CBS 144.89 and Af293 were also included

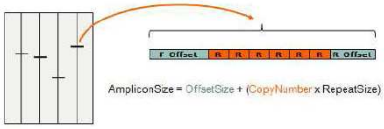
Fungal isolates were identified macroscopically and microscopically. Definitive identification of *Aspergillus fumigatus* was further confirmed by sequencing of ß-tubulin genes



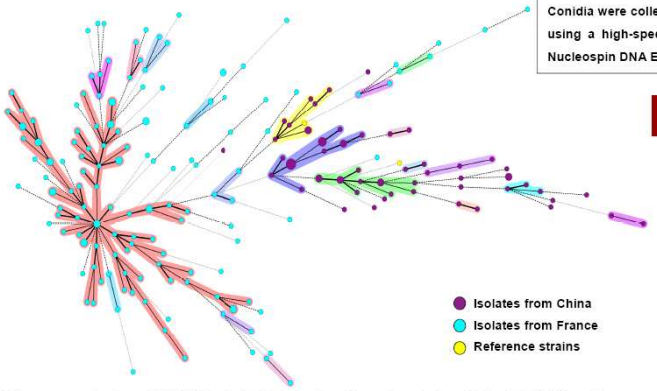
MLVA typing technique

VNTR markers typically exhibit a large range of copy numbers, even among highly related isolates. For a selected set of tandem repeats, comparison of the copy numbers between isolates can be used to obtain insight about the relationships at a micro-evolutionary level.

In a previous study, ten VNTR loci were selected and primers were designed outside the tandem repeat. Amplicon size was determined with Bionumerics software package version 4.6. The number of repeats in each allele was derived from the amplicon size. The size of flanking sequences was subtracted from the band size and the number was divided by the repeat size. The result of this calculation corresponded to the number of repeats. Data were further analyzed with Bionumerics software as a character dataset.



Conidia were collected from sporulated *A. fumigatus* cultures. Homogenisation was carried out using a high-speed mini-bead beater. Lysis and DNA extraction were performed using the Nucleospin DNA Extraction Kit.



Minimum spanning tree of 210 *A. fumigatus* isolates based on categorical analysis of 10 VNTR markers. Each circle represents a unique genotype. The size of each circle corresponds to the number of isolates (from 1 to 6) with the same genotype. Genotypes connected by a shaded background differ by a maximum of 2 of the 10 VNTRs. Thick connecting lines = one marker difference; regular connecting lines = two marker differences; thick interrupted lines = three differences; thin interrupted lines = four or more differences. The length of each branch is also proportional to the number of difference.

Categorical analysis

A total number of **186** different genotypes were obtained. Only **21** genotypes were shared by two isolates or more. For the clustering analysis of VNTR profiles, a graphing algorithm termed minimum spanning tree (MST) was used. The MST algorithm, similar to maximum-parsimony phylogenetic tree reconstruction methods, constructs a tree that connects all the genetic profiles in such a way that the summed genetic distance of all branches is minimized. It is particularly useful for analyzing genetic population structures with relatively high similarity. The priority rule for constructing the tree was set in order that the type that had the highest number of single-locus variants would be linked first. MST analysis showed **two main clusters**. The first one comprised most of the avian isolates collected in France. The second group comprised all isolates collected in Guangxi Province.

MLVA (multiple-locus variable-number tandem repeat analysis) is a promising method for rapid genotyping of *A. fumigatus*. In the present study, we demonstrated that this technique may be useful for the analysis of the population structure of isolates from avian farms in France or in China.

References

- Balajee et al. 2008. Utility of a microsatellite assay for identifying clonally related outbreak isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Microbiol Methods 73:252-6.
- Bart-Delabesse et al. 1998. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol 36:2413-8.
- de Valk et al. 2007. Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive-aspergillosis. J Clin Microbiol 45:1415-9.
- Denning et al. 1990. Restriction endonuclease analysis of total cellular DNA of *Aspergillus fumigatus* isolates of geographically and epidemiologically diverse origin. J Infect Dis 162:1151-8.
- Thierry et al. 2010. Use of a panel of ten VNTR (variable number tandem repeat) markers for high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates from humans and birds. Submitted