



Recherche pour la référence

Une nouvelle technique de typage moléculaire de la moisissure opportuniste *Aspergillus fumigatus*; application potentielle dans les couvoirs et les élevages avicoles

S. Thierry (1,2) (simon.thierry@anses.fr), D. Wang (1,3), P. Arné (4), M. Deville (4), B. De Bruin (4), A. Nieguitsila (4), C. Pourcel (5), K. Laroucau (2), R. Chermette (4), F. Botterel (6), J. Guillot (4)

(1) Anses, UMR BIPAR, Ecopham, Maisons-Alfort, France

(2) Anses, unité Zoonoses bactériennes, Maisons-Alfort, France

(3) Parasitology department, College of Animal Science and Technology, Université du Guangxi, Nanning, Chine

(4) ENVA, UMR BIPAR, Ecopham, Maisons-Alfort, France

(5) Institut de génétique et de microbiologie, Université Paris-Sud 11, Orsay, France

(6) UPEC, UMR BIPAR, Ecopham, Créteil, France

S. Thierry, D. Wang, P. Arné, M. Deville, B. De Bruin, A. Nieguitsila, C. Pourcel, K. Laroucau, R. Chermette, F. Botterel, J. Guillot (2012).

Une nouvelle technique de typage moléculaire de la moisissure opportuniste *Aspergillus fumigatus*; application potentielle dans les couvoirs et les élevages avicoles, EuroReference, N° 6, ER06-12R01. <http://www.anses.fr/euroreference/numero6/PN5001.htm>



La méthode de typage moléculaire MLVA (Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis) s'est révélée très utile pour le génotypage de nombreux micro-organismes et a permis d'apporter de nombreuses informations notamment dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques.

Dans cette étude, nous avons développé cette technique pour le champignon filamentueux *Aspergillus fumigatus*. La méthode a été testée sur un panel d'isolats d'origine aviaire prélevés dans des élevages français et chinois.

La méthode développée s'est révélée très discriminante, rapide et facile d'utilisation. De plus, elle a aussi démontré une capacité à regrouper les génotypes en fonction de l'origine géographique des isolats. De ce fait, cette méthode se révèle être un outil épidémiologique d'importance dans l'étude de la circulation de ce pathogène dans les élevages.

Aspergillus fumigatus est une moisissure ubiquiste qui se développe habituellement sur la matière végétale en décomposition et dans le sol. Cette moisissure produit une grande quantité de spores asexuées, ou conidies, qui sont ensuite dispersées dans l'air. Les populations humaines et animales sont constamment exposées à des conidies aspergillaires mais les défenses immunitaires de l'appareil respiratoire sont généralement suffisantes pour détruire les spores avant qu'elles ne germent. Chez les patients qui présentent un déficit majeur de l'immunité cellulaire, *A. fumigatus* peut être à l'origine d'une infection redoutable appelée aspergillose invasive. La neutropénie (ou des anomalies fonctionnelles intéressant les neutrophiles et les macrophages) demeure le facteur de risque principal. Les oiseaux, et plus particulièrement les oiseaux d'élevage comme la dinde, sont très sensibles à l'infection par *A. fumigatus*. Même si l'on ne connaît pas avec précision l'impact économique de l'aspergillose en élevage aviaire, ce type d'infection respiratoire est à l'origine de pertes de production par diminution de la croissance, de mortalités et de saisies à l'abattoir (Arné *et al.*, 2011). Pour mettre en place des mesures de lutte pertinentes en élevage ou en milieu hospitalier, il est de première importance de disposer d'outils permettant de comprendre la circulation de la moisissure *A. fumigatus* au sein des populations animales ou humaines et de leur environnement. La méthode MLVA, pour *Multiple Locus Variable number tandem repeat Analysis*, est basée sur la détection de petites séquences répétées en tandem sur le génome appelées VNTR (Figure 1) (Vergnaud *et al.*, 2000). Cette technique a déjà été développée pour de nombreuses bactéries et pour la levure

Candida glabrata (Laroucau *et al.*, 2008; Grenouillet *et al.*, 2007). La méthode s'est révélée très discriminante et a permis, dans certains cas, de regrouper les isolats en fonction de leur origine géographique.

L'objectif de cette étude a été de développer une nouvelle méthode de typage moléculaire basée sur la détection de VNTR pour la moisissure *A. fumigatus*. Tous les VNTR présents sur le génome de la souche Af293 ont été analysés et un panel final de dix marqueurs a été retenu. Ce panel a ensuite été testé sur un grand nombre d'isolats provenant d'élevages avicoles de France et de Chine.

Matériels et Méthodes

Origine des isolats

Afin de tester et de sélectionner des marqueurs discriminants, un échantillon composé de 57 isolats d'*Aspergillus fumigatus* géographiquement et chronologiquement indépendants a été sélectionné. Il regroupe 53 isolats obtenus à partir de prélèvements d'organes ou d'écouvillons pharyngés effectués sur des animaux (des oiseaux principalement), trois isolats provenant de patients du CHU Henri-Mondor et la souche de référence CBS 144-89.

Par la suite un second groupe de 277 isolats a été testé avec la méthode. Ces isolats correspondent à cinq situations épidémiologiques différentes: deux élevages de canards à gaver situés dans le département de la Sarthe, un élevage de poulets ainsi qu'un élevage de canards situés dans la province du Guangxi en Chine, et enfin un couvoir de dindes situé dans le département du Maine-et-Loire en France.



Recherche pour la référence

Typage moléculaire

Le typage moléculaire des isolats a été effectué par amplification par PCR des marqueurs VNTR. Par la suite, la taille des séquences a été déterminée par électrophorèse conventionnelle. À partir de ces données, le nombre de répétitions présentes a été déterminé pour chaque VNTR.

Analyse bioinformatique

Les résultats obtenus ont été synthétisés sous la forme d'une suite numérique représentant le nombre de répétitions obtenu pour chaque VNTR et ce pour chaque isolat testé. Les profils MLVA ainsi générés ont été analysés à l'aide du logiciel Bionumerics®. Les profils ont été comparés par la méthode UPGMA puis exprimés sous la forme d'un algorithme graphique appelé *Minimum Spanning Tree* (MST).

Résultats

Sélection des marqueurs VNTR

Le logiciel Tandem Repeat Finder (Benson, 1999) a permis d'identifier 77 marqueurs potentiels répartis sur les huit chromosomes composant le génome d'*A. fumigatus*. Ces 77 marqueurs ont été testés sur le premier échantillon de 57 isolats indépendants; une sélection des VNTR a été effectuée sur la base de la taille des marqueurs permettant une bonne détection par électrophorèse conventionnelle, leur capacité à produire un résultat exploitable (amplification effective) ainsi que leur capacité à mettre en avant des profils différents selon les isolats testés (polymorphisme). Cette sélection a permis de retenir un panel final de dix marqueurs répartis sur quatre des huit chromosomes du champignon (1, 5, 6 et 8).

Analyse bioinformatique

Le panel de dix marqueurs VNTR a été testé sur 330 isolats. Cette analyse a permis d'identifier 255 profils MLVA différents.

Seuls 33 génotypes sont partagés par deux isolats ou plus. La comparaison des génotypes par UPGMA puis leur représentation par MST a permis d'identifier trois principaux groupes (Figure 2). Le premier groupe comprend 91 des 95 isolats aviaires (95 %) provenant des deux élevages de canards de la Sarthe en France. Le second groupe comprend 42 des 62 isolats aviaires (70 %) provenant des élevages de la province du Guangxi en Chine. Enfin, le dernier groupe comprend 90 des 120 isolats environnementaux (75 %) collectés dans le couvoir de dinde du Maine-et-Loire en France.

Pouvoir discriminant

Le pouvoir discriminant de la méthode a été déterminé grâce au calcul de l'indice de diversité de Simpson (Hunter et Gaston, 1988). Cet indice peut varier de 0 à 1 (la valeur 1 signifiant que la méthode est capable de différencier tous les isolats testés). L'indice calculé à partir de l'échantillon testé par MLVA est égal à 0,9994, ce qui en fait une des méthodes les plus discriminantes décrites à l'heure actuelle sur la moisissure *A. fumigatus*.

Base de données

Afin de faciliter le transfert de la méthode à d'autres laboratoires, une base de données a été créée sur internet (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVANet/>). Cette base de données permet de comparer des profils VNTR à plus de 300 profils déjà référencés.

Discussion

Typier les isolats d'*A. fumigatus* devrait permettre d'améliorer la compréhension de la distribution et de la circulation de cet agent pathogène au sein de certains environnements, comme les élevages avicoles. Cette approche moléculaire peut aussi permettre une meilleure compréhension de la contamination et de l'infection des hôtes.

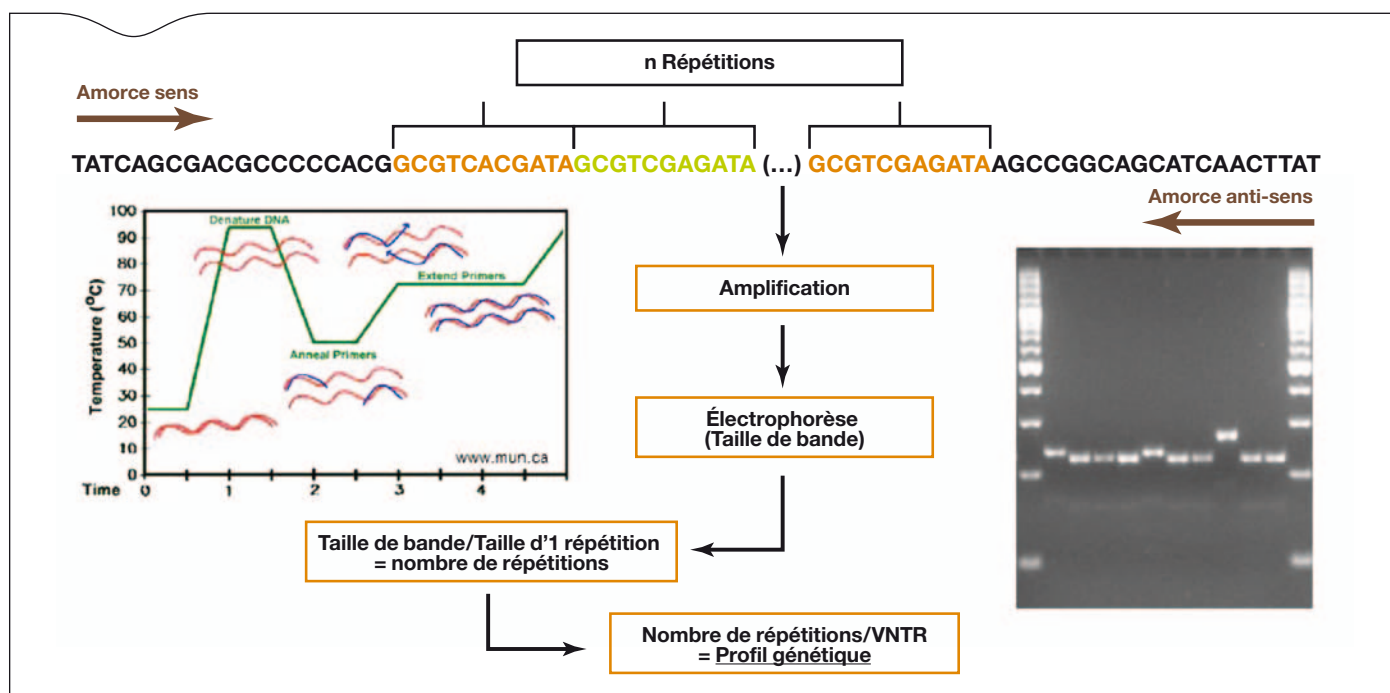


Figure 1. Principe de la technique MLVA (Multiple Locus VNTR Analysis)

Recherche pour la référence

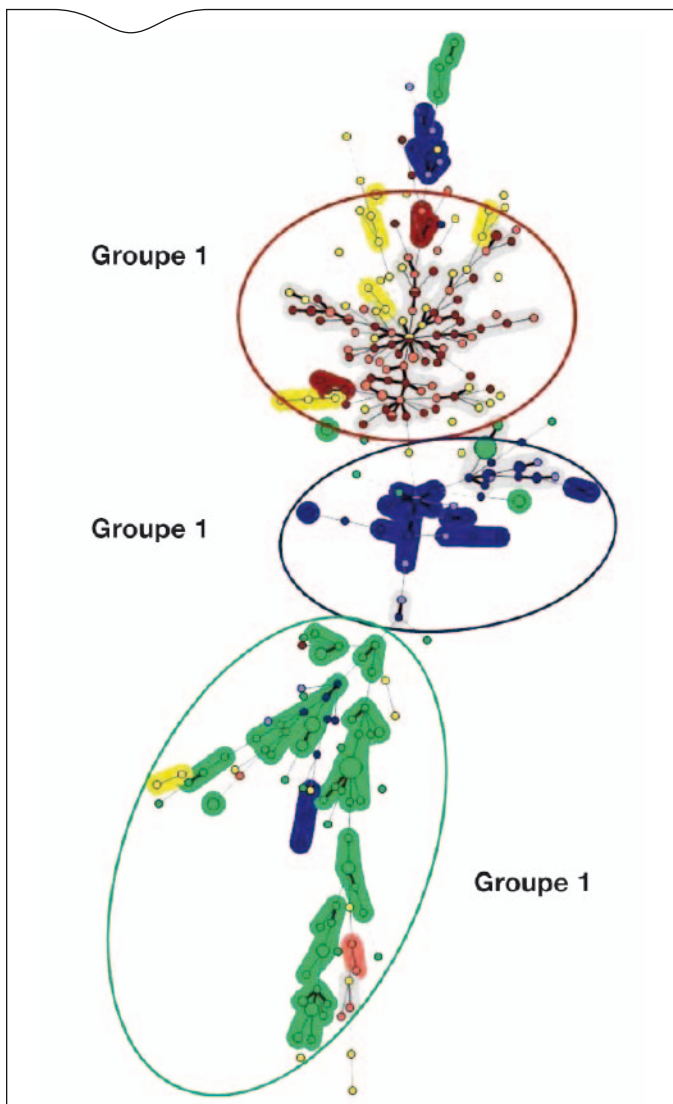


Figure 2. Nuage de points (Minimum spanning tree) représentant 330 isolats testés à l'aide de 10 marqueurs VNTR. Chaque cercle représente un génotype unique. Le diamètre du cercle est proportionnel au nombre d'isolats partageant ce génotype. Les génotypes sont reliés par une droite représentant le nombre de différences entre eux. Une ligne pleine et épaisse signifie une différence entre les génotypes, alors qu'une ligne pleine et fine en signifie deux, une ligne en pointillé épais représente trois différences et enfin une ligne en pointillé fin représente quatre différences ou plus. Les génotypes sont aussi reliés par un fond coloré représentant les groupes d'isolats séparés par deux différences ou moins. La longueur des branches est aussi proportionnelle au nombre de différences. Chaque situation épidémiologique est représentée par une couleur spécifique : le rouge pour les isolats collectés dans le premier élevage de canard de la Sarthe en France en 2007 et 2008, rose pour les isolats collectés dans le second élevage de canard de la Sarthe en 2007 et 2008, bleu foncé pour les isolats collectés dans l'élevage de poulets de la province du Guangxi en Chine en 2008, bleu clair pour les isolats collectés dans l'élevage de canards de la province du Guangxi en Chine en 2008, vert pour les isolats environnementaux collectés en 2009 dans le couvoir de dindes de Maine-et-Loire et enfin jaune pour le groupe d'isolats indépendants composé de 57 isolats d'*Aspergillus fumigatus* géographiquement et chronologiquement indépendants dont 53 isolats aviaires, trois isolats humains et la souche de référence CBS 144-89.

De multiples méthodes de typage moléculaire ont été proposées pour l'agent pathogène opportuniste *A. fumigatus*. L'analyse du polymorphisme des microsatellites demeure la méthode la plus utilisée dans le cadre d'études épidémiologiques en milieu hospitalier. 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 épidémiologique (Balajee *et al.*, 2007). Cette méthode se base sur la détection d'une séquence répétée en tandem sur le gène d'une protéine de surface cellulaire. Cependant, contrairement à la MLVA, la séquence exacte de chaque répétition est systématiquement déterminée. Un numéro d'allèles est attribué à chaque séquence unique de répétitions et le génotype est alors défini par une suite d'allèles de composition et de nombre différents.

La technique MLVA, testée ici sur 330 isolats d'*A. fumigatus*, s'est révélée très discriminante, rapide et facile à mettre en œuvre. Cette méthode a aussi démontré une stabilité et une reproductibilité excellentes (Thierry *et al.*, 2010). Une standardisation et une « automatisation » de la méthode pourraient être envisagées dans le futur en développant un système multiplex en électrophorèse capillaire ainsi qu'en mettant au point un marqueur de taille interne pour chaque VNTR. Ceci permettrait une meilleure échangeabilité de la méthode entre les laboratoires en améliorant encore la reproductibilité et la facilité d'exécution. L'avantage principal de la technique MLVA demeure sa facilité d'utilisation. La migration des produits de PCR se fait sur un gel d'agarose et les résultats obtenus peuvent être facilement comparés à ceux correspondant à d'autres isolats examinés dans d'autres laboratoires.

Références bibliographiques

- Arné P, Thierry S, Wang D, Deville M, Le Loc'h G, Desoutter A, Féménia F, Nieguitsila A, Huang W, Chermette R, Guillot J. 2011. *Aspergillus fumigatus* in poultry. International Journal of Microbiology. 2011;2011:746356. Epub 2011 Jun 14.
- Balajee SA, HA de Valk, BA Lasker, JF Meis, and CH Klaassen. 2008. Utility of a microsatellite assay for identifying clonally related outbreak isolates of *Aspergillus fumigatus*. Journal of Microbiological Methods 73:252-256.
- Balajee, SA, ST Tay, BA Lasker, SF Hurst, and AP Rooney. 2007. Characterization of a novel gene for strain typing reveals substructuring of *Aspergillus fumigatus* across North America. Eukaryot Cell 6:1392-1399.
- Benson G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Research, 27(2):573-580.
- de Valk HA, CH Klaassen, and JF Meis. 2008. Molecular typing of *Aspergillus* species. Mycoses 51:463-476.
- Grenouillet F, Millon L, Bart JM, Roussel S, Biot I, Didier E, Ong AS, Piarroux R. 2007. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for rapid typing of *Candida glabrata*. Journal of Clinical Microbiology, 45(11):3781-3784.
- Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. Journal of Clinical Microbiology, 26(11):2465-2466.
- 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. 2008. High resolution typing of *Chlamydomonas psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). Infection, Genetics and Evolution, 8(2):171-181.
- 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. 2010. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing of *Aspergillus fumigatus*. BMC Microbiology 10:315.
- Vergnaud G, Denoëud F. 2000. Minisatellites: mutability and genome architecture. Genome Research, 10(7):899-907.