

ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DE SOUCHES D'*ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* ISOLEES D'ELEVAGES AVICOLES

Leroy-Sétrin Sabine, Flaujac Géraldine, Thenaisy Karine, Chaslus-Dancla Elisabeth

INRA, centre de Tours-Nouzilly, Station de Pathologie Aviaire et Parasitologie, 37380 Nouzilly

Résumé

Depuis 1993, l'isolement d'*Ornithobacterium rhinotracheale* lors de pathologie respiratoire est en progression dans l'Ouest de la France, principalement en élevage de dinde. La caractérisation phénotypique des souches d'*O. rhinotracheale* n'est pas suffisante pour mettre en évidence une diversité entre ces souches. Vingt trois souches ont été caractérisées par deux méthodes génotypiques : la ribotypie et l'analyse du polymorphisme des fragments d'ADN amplifiés par PCR à partir d'amorces oligonucléotidiques aléatoires (RAPD). Ces 2 méthodes ont mis en évidence des différences au sein de ces souches. L'analyse des résultats a permis d'établir un dendrogramme, représentatif des relations génétiques entre les souches d'*O. rhinotracheale* isolées de différentes espèces aviaires, montrant la présence de plusieurs clones bactériens. La majorité des souches isolées de dinde et de poulet étaient génétiquement très proches. Les souches isolées de faisan, de perdrix ou de pintade étaient différentes et distinctes de l'ensemble des autres souches. Nous pouvons conclure à la présence de plusieurs clones dans les élevages de volailles, et émettre l'hypothèse d'une diffusion dans certains d'entre eux.

Introduction

Les premières souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale* ont été isolées en France à partir de 1993. Depuis cette date, leur isolement est en progression, principalement dans l'Ouest et dans la filière dinde. Un premier bilan (Dudouyt *et al.*, 1995) présentait, lors des premières journées de la Recherche Avicole, les propriétés culturelles et biochimiques, et les données cliniques et épidémiologiques de ces bactéries.

A partir de ce bilan, un échantillon de 23 souches a été constitué. Elles provenaient d'animaux de différentes espèces aviaires élevés sur des sites géographiques indépendants.

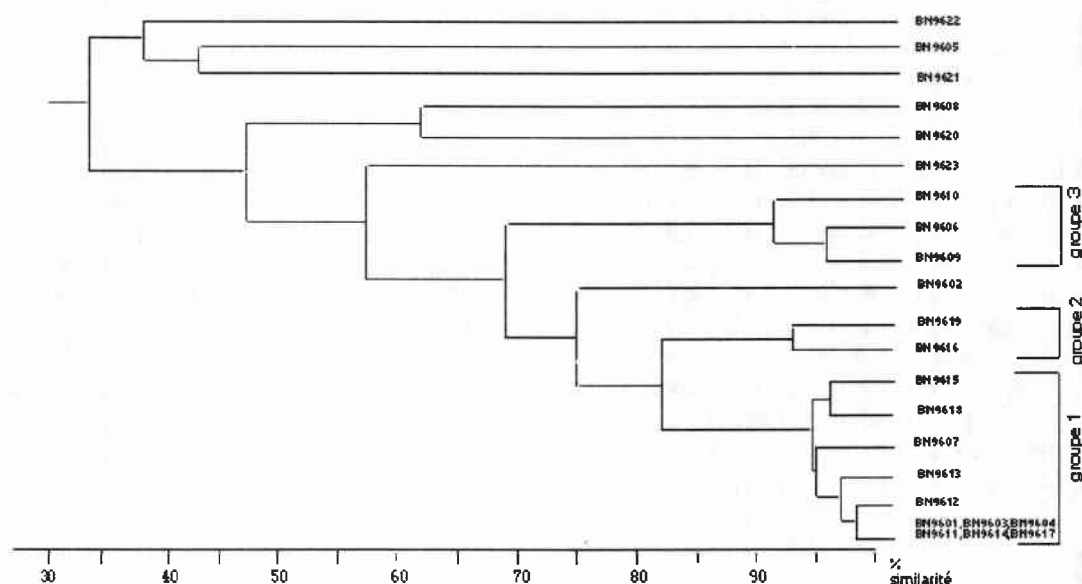
Nous avons réalisé la caractérisation génétique de ces souches afin de mettre en évidence le degré de parenté génétique entre les souches et une éventuelle diffusion de clones bactériens dans ces élevages. Deux méthodes complémentaires ont été utilisées pour réaliser le typage moléculaire de ces souches : la ribotypie, méthode de référence, qui est basée sur l'étude du polymorphisme de gènes correspondant à des séquences hautement conservées du génome codant pour les ARN ribosomiaux (Grimont et Grimont, 1986) et la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) qui est basée sur le polymorphisme de fragments d'ADN amplifiés par PCR à partir d'amorces oligonucléotidiques choisies de manière aléatoire et pouvant s'hybrider n'importe où sur le génome (Welsh et McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

Matériel et Méthodes

L'étude a porté sur un échantillon de 23 souches d'*O. rhinotracheale* isolées, collectées et identifiées par le laboratoire Bio Chêne Vert (Châteaubourg). Ces souches ont été choisies parmi une collection de 180 souches, en fonction de leur origine géographique et animale, pour être représentatives de la diversité des souches collectées en France par ce laboratoire. Elles ont été isolées, entre 1994 et 1995, de différentes espèces aviaires: dinde (15 souches), poulet (4), faisan (2), pintade (1), perdrix (1). Toutes proviennent de prélèvements pathologiques, la plupart ont été isolées au niveau des poumons ou de la trachée.

Afin de déterminer les ribotypes des souches, l'ADN bactérien total a été préparé selon la technique de Wilson (1987) puis digéré avec 4 enzymes de restriction : *DraI*, *HindII*, *HindIII* et *PvuII*. Les fragments d'ADN obtenus ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% et transférés sur membrane de nylon. Ces ADN ont été hybridés avec une sonde ribosomale marquée, obtenue par transcription de l'ARN 16+23S d'*E. coli* en présence de digoxigénine-11-dUTP. Les profils de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomiaux (ribotypes) ont été révélés par autoradiographie, puis analysés par la méthode UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages algorithm), les distances génétiques étant calculées selon l'indice de Jaccard. Cette analyse permet de déterminer la parenté entre les souches étudiées.

FIGURE 1 : Dendrogramme montrant les résultats de l'analyse par UPGMA des ribotypes et RAPDtypes des souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale* isolées de différentes espèces aviaires



Pour la technique de RAPD, l'ADN bactérien a été préparé à partir d'extrait de culture porté à ébullition et purifié par centrifugation. Quarante décanucléotides ont été arbitrairement choisis afin de servir d'amorce à la réaction d'amplification par PCR. Parmi celles-ci, 8 amorces ont été retenues pour étudier les relations génétiques entre les souches. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 3% et les profils obtenus (RAPDtypes) ont été analysés comme décrit pour les ribotypes.

Résultats et discussion

Parmi les 23 souches d'*O. rhinotracheale* étudiées, 8 ribotypes différents ont été déterminés après digestion par 4 enzymes de restriction. Les profils obtenus après digestion par *HindIII* et *PvuII* se sont révélés être les plus discriminants. Sept des 23 souches appartenaient au ribotype 1. Les ribotypes 1 et 2 étaient proches. Les ribotypes 3, 4 et 5 étaient également proches mais parfaitement distincts des précédents. Les ribotypes 6, 7 et 8 étaient très différents et étaient chacun représentés par seulement une souche.

Dix sept RAPDtypes ont été mis en évidence. Les profils de 1 à 6 étaient proches. Les profils 9, 10 et 11, distincts des précédents, étaient également proches. Les autres profils étaient représentés par une seule souche et étaient très différents.

Les résultats de ces deux méthodes étaient concordants, la RAPD s'étant révélée la méthode la plus discriminante pour les souches d'*O. rhinotracheale*. L'analyse par la méthode UPGMA des résultats obtenus par ribotypie et RAPD a permis d'établir un dendrogramme représentatif des parentés génétiques entre les souches d'*O. rhinotracheale* (FIGURE 1). Onze des 23 souches sont génétiquement proches et forment un groupe homogène (groupe 1). Ce groupe comprend 9 des 15 souches isolées de dinde et 2 de poulet. Les 2 autres souches isolées de poulet sont génétiquement proches (groupe 2) et montrent plus de 80% de similarité avec le groupe 1. Un autre ensemble distinct, le groupe 3, regroupe trois souches de dinde. Les autres souches isolées de dinde, de faisan, de pintade et de perdix sont différentes et génétiquement éloignées.

Pour suivre la diffusion de souches, il est important de disposer de marqueurs moléculaires efficaces. Cette étude sur les souches d'*O. rhinotracheale* montre l'apport de la RAPD sur cette espèce bactérienne. Nous avons déjà montré l'intérêt de cette méthode rapide pour la caractérisation des *E. coli*, *Salmonella Enteritidis*, et *Pasteurella* isolés de différentes espèces animales (Leroy-Sétrin *et al*, 1995; Millemann *et al*, 1996; Chaslus-Dancla *et al*, 1996).

Cette étude a permis de montrer que la présence d'*O.rhinotracheale* relève d'événements épidémiologiques différents même si la présence de souches génétiquement proches dans la filière de production de dinde et de poulet peut suggérer la diffusion de clones.

Références

- Chaslus-Dancla E., Lesage-Descauses M.C., Leroy-Sétrin S., Martel J.L., Coudert P., Lafont J.P., 1996. Vet. Microbiol. 52: 91-102
- Dudouyt J., Léorat J., Empel P. van, Gardin Y., Doré C., 1995. 1ères journées de la recherche avicole, Angers
- Grimont F., Grimont P.D.A., 1986. Ann. Inst. Pasteur Microbiol.. 137B:165-175
- Leroy-Sétrin S., Lesage M.C., Chaslus-Dancla E., Lafont J.P., 1995. Epidemiol. Infect. 114:113-121.
- Millemann Y., Lesage-Descauses M.C., Lafont J.P., Chaslus-Dancla E., 1996. FEMS Immun. 14: 129-134
- Welsh J. and McClelland M., 1990. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535
- Wilson K., 1987. in: Current Protocols in molecular biology, Ausubel F.M. *et al*, vol 1, pp 2.4.1