

Diagnostic de la tularémie par amplification génique *in vitro* (PCR)

Diagnosis of tularemia by in vitro gene amplification (PCR)

Par Sandrine PERUCHON⁽¹⁾⁽²⁾, Sylvie HENAULT⁽¹⁾,
Christiane MENDY⁽¹⁾ et Josée VAISSAIRE⁽¹⁾
(note acceptée le 4 avril 2006)

Mots-clés : *Francisella tularensis*, PCR, lipoprotéine 17 kDa, ARNr 16S, rate, lièvre.

Key words: *Francisella tularensis*, PCR, lipoprotein 17kDa, ARNr 16 S, spleen, hare.

• INTRODUCTION

La tularémie, zoonose importante, sévit dans de nombreux pays dont la France (DUFRENE et VAISSAIRE, 1998), en atteignant majoritairement la petite faune sauvage dont les lièvres. *Francisella tularensis*, fin coccobacille à Gram négatif, est d'une part de culture difficile et d'autre part, fragile, sa survie étant faible dans les cadavres d'animaux, surtout à température positive (VAISSAIRE, AGIER et LE DOUJET, 1996). De ce fait, le diagnostic bactériologique de la maladie animale est aléatoire. Aussi, ce travail se propose t'il, à partir de 154 rates de lagomorphes, principalement de lièvres, de comparer les résultats de ce diagnostic à ceux obtenus par l'amplification génique (PCR) avec plusieurs types d'amorces. Pour valider cette méthode, des souches de *F. tularensis* et d'autres espèces bactériennes ont été utilisées.

• MATÉRIELS ET MÉTHODES

Souches bactériennes

Cinquante cinq souches de *F. tularensis*, isolées à partir de rates de lièvres par les laboratoires d'analyses vétérinaires départementaux (LVD ou LDA) de 1993 à 2001, et par notre laboratoire, ainsi que deux souches de collection

(CIP 242, CIP 243) de l'Institut Pasteur, ont été utilisées. Trente six souches de référence ou de collection d'autres espèces bactériennes (entérobactéries, pasteurella, staphylocoques...) ont également été testées.

Prélèvements

Cent cinquante quatre rates ont été prélevées par les LVD-LDA, de 1997 à 2001, chez 140 lièvres, 13 lapins de garenne et un lapin d'élevage. Pour certaines d'entre elles, l'examen bactériologique, pratiqué dans le laboratoire d'origine sur des prélèvements frais, avait permis l'isolement de la souche. Envoyées dans notre laboratoire, elles ont été stockées et conservées à -20°C, dès leur arrivée et après l'examen bactériologique, pendant une durée de quelques semaines à plus de trois ans.

Méthodes classiques

Les prélèvements ont été traités dans un laboratoire de sécurité microbiologique de type 3, sous poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II. Après réception, les rates sont broyées dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) et 2 à 3 gouttes sont déposées sur une gélose au sang frais (Columbia supplémenté à 5 % de sang de cheval (bioMérieux®) et une gélose chocolat (Sanofi Pasteur® 63934), puis incubées 24 à 48 h à 37°C en aérobiose.

(1) Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments LERPAZ (AFSSA/Lerpaz) : 23, Avenue du Général de Gaulle, 94703 Maisons-Alfort.

(2) Nouvelle adresse : Commissariat à l'Énergie Atomique, DSV/DRM/SNV, 18, route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses.

Les souches isolées de ces prélèvements et celles envoyées ont été confirmées. L'identification est basée sur l'aspect des cultures, les caractères cultureux, l'agglutination sur lame par un sérum spécifique (BD 240939) ; elle peut être réalisée sur galerie API (Bio Merieux). Le broyat de rate est conservée à -20°C .

Lysat - protocole d'extraction de l'ADN

Les suspensions bactériennes obtenues à partir des cultures sur gélose des 57 souches de *F. tularensis* sont lysées dans du PBS par chauffage au bain marie à 100°C pendant 15 min, afin d'obtenir l'ADN. En ce qui concerne les broyats de rate, l'ADN est extrait en utilisant la technique protéinase K/SDS/CTAB (Sodium Dodecyl Sulfate)/CTAB (CetylTriméthyl Ammonium Bromide) (WILSON, 1989) ou des trousseaux (kits) d'extraction tel le kit Nucleospin Blood® (Macherey-Nagel, Düren-Allemagne) ou celui High Pure PCR Template Préparation® (Roche molecular biochemicals, Mannheim-Allemagne).

Choix des amorces

Plusieurs amorces ont été testées, puis choisies. Les unes amplifient le gène codant l'ARNr 16S (amorces F11, F5, FTS8, FTS12 de FORSMAN *et al.*, 1994 ; de DOLAN *et al.*, 1998). Les autres amplifient le gène codant la lipoprotéine membranaire de 17 kDa qui est conservé chez *F. tularensis* et *F. novicida* (amorces MS2, MA2 de HIGGINS *et al.*, 2000 ; amorces Tula4 et Tula 4' de SJOSTEDT *et al.*, 1997 ; de JOHANSSON *et al.*, 2000 ; amorces P1/P2, P3/P4 sélectionnées à l'AFSSA. Enfin, des amorces spécifiques d'Eubactéries ont été aussi utilisées (couple BS1/BS2) comme témoin positif.

Les amorces P1 5'TCAAATCGCAAAAGCTGG-TAAAA3' (nucléotides 359-381), P2 5'TGGTTGGTG-

CACATGGCTAAGT3' (nucléotides 1227-1206) (amplicon de 868 pb) et P3 5'ATCTTTATCAATCGCAGGTT-TAGC3' (nucléotides 580-603), P4 5'AGTTGCC-CAAGTTTTATCGTTCT3' (nucléotides 901-879) (amplicon de 321 pb) (AFSSA), ont été sélectionnées à l'aide du logiciel primer select DnaStar Lasergen Software-GATC® (Biorad laboratories, Segrate-Italie), et Primer 3 (site Infobiogen). Des solutions filles ont été préparées à une concentration finale de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Amplification génique

Un mélange (mix) est réalisé avec les 4 désoxynucléotides triphosphates, les amorces, la Taq polymérase Boehringer® (5 U/ml) et l'ADN extrait. La PCR consiste en une simple amplification de 35 cycles suivie de la double amplification de 15 cycles. L'ADN amplifié est contrôlé sur un gel d'agarose à 2 % de bromure d'éthidium (analyseur d'image BioRad®). Les thermocycleurs sont GeneAmp PCR system 9600® (Perkin Elmer corporation, Norwalk-USA), Thermal cycler PHC-3® (Techne, Cambridge-Angleterre) et Programmable Thermal Controller® (MJ Research PTC).

• RÉSULTATS ET DISCUSSION

- La spécificité de la PCR a été validée vis-à-vis de 36 souches bactériennes autres que *F. tularensis*. Une attention particulière a été portée aux germes de putréfaction qui prolifèrent dans les cadavres, tels que les entérobactéries, etc... et aux germes pathogènes pouvant être isolés dans ces espèces. Des souches génétiquement ou antigéniquement proches de *F. tularensis* (*F. philomiragia*, *Brucella suis* 2, *Yersinia*...) n'ont pas été amplifiées, contrairement à *F. novicida*. Cette dernière peut être cependant facilement différenciée de *F. tularensis* par des

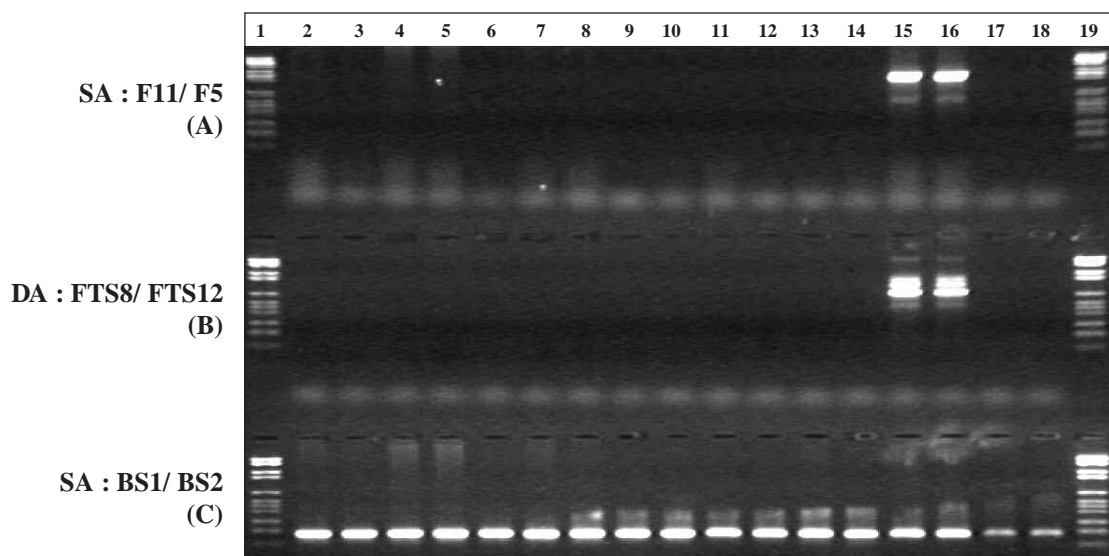


Figure 1 : Spécificité des amorces pour l'ARNr 16 S

A, amorces F11 et F5; B, amorces FTS8, FTS12; C, amorces BS1-BS2)

Puits 1 et 19 : marqueur de poids moléculaire (Marqueur VI, Roche diagnostic corporation, Mannheim-Allemagne) ; Puits 2 : *Yersinia enterocolitica* 8027 ; Puits 3 : *Pasteurella multocida* 103825 ; Puits 4 : *Salmonella* 103446 ; Puits 5 : *Yersinia* 8142 ; Puits 6 : *Aeromonas* 103697 ; Puits 7 : *Pasteurella* 7721 ; Puits 8 : *Proteus* 5860 ; Puits 9 : *Staphylococcus* 6538 ; Puits 10 : *Pseudomonas* 27853 ; Puits 11 : *Enterococcus* 29212 ; Puits 12 : *Bacillus* 6633 ; Puits 13 : *E.coli* 25922 ; Puits 14 : *Ephilomiragia* 8298T ; Puits 15 : *Enovicida* 5612, Puits 16 : *F.tularensis* 243 ; Puits 17 : Témoin négatif d'extraction ; Puits 18 : Témoin négatif de PCR.

tests biochimiques ou par l'application de techniques PCR sur souche (ERIC-PCR, REP-PCR, RAPD) (DE LA PUENTE REDONDO *et al.*, 2000).

La figure 1 illustre la spécificité de deux types d'amorces pour détecter le gène codant l'ARNr 16S (A, B). Des résultats identiques ont été obtenus avec les couples d'amorces spécifiques de la lipoprotéine de 17 kDa (non montré).

- Les 55 souches de *F. tularensis* préalablement isolées et les deux de collection (CIP) ont été toutes détectées en simple (SA) et en double (DA) amplification, aussi bien par les amorces de l'ARNr 16S que par celles de la lipoprotéine de 17 kDa dont les deux couples d'amorces sélectionnées à l'AFSSA, P1/P2 et P3/P4.

- Les 154 rates ont été examinées en utilisant les 2 couples d'amorces sélectionnés. Sur 41 rates positives après culture, 37 l'ont été par PCR. Les quatre prélèvements qui n'ont pas été identifiés en PCR, avaient été soumis à des durées de conservation à -20°C excessives, de plus de 2 ans, et à des chocs thermiques successifs (congélation-décongélation). Mais la PCR a permis de détecter 11 rates positives, dont le résultat en bactériologie avait été négatif (tableau 1).

Au total, 31,1 % des rates ont été révélées positives par la technique PCR contre 26,6 % par la méthode bactériologique.

Rates de lièvres ou de lapins de garenne		Bactériologie (LVD et AFSSA)		Nombre total de rates
		+	-	
PCR	+	37	11	48
	-	4	102	106
Total		41	113	154

Tableau 1 : Synthèse des résultats obtenues en PCR avec les amorces P1/P2 et P3/P4, à partir des prélèvements de rate.

Année	Bactériologie effectuée sur prélèvements frais en LVD et/ou à l'AFSSA positive	Extraction de l'ADN par kit		Extraction de l'ADN par SDS/PK/CTAB		Nb de rates
		Technique PCR positive	Technique PCR positive	Technique PCR positive	Technique PCR positive	
		SA	DA	SA	DA	
1998	10	2	6	4	8	10
1999	3	0	1	1	2	3
2000	8	2	6	4	8	9
2001	6	4	5	4	6	12

Tableau 2 : Comparaison des résultats obtenus par les méthodes de bactériologie et de biologie moléculaire en PCR, à partir des 34 rates de lièvres de même provenance. En PCR, les résultats sont présentés en fonction des techniques d'extraction de l'ADN et des modalités d'amplification, en simple (SA) ou double amplification (DA).

- Nous avons comparé les résultats obtenus, en fonction des techniques d'extraction de l'ADN et de la technique PCR utilisée avec nos couples d'amorces, en SA ou en DA. Nous avons utilisé 34 des 154 rates, choisies car positives et envoyées par le même LVD, dans des délais relativement similaires de 11 à 20 jours, entre la découverte des lièvres morts sur le terrain et la réception des prélèvements au laboratoire. Elles ont été conservées à -20°C au fur et à mesure de leur arrivée de 1998 à 2001. La technique d'extraction SDS/PK/CTAB a été plus performante que la technique d'extraction par les kits, et la double amplification (DA) plus performante que la simple (SA). En SA, la technique d'extraction par SDS/PK/CTAB a permis de détecter 13 rates positives pour *F. tularensis* contre 8 par la technique d'extraction par les kits, et la DA de détecter 24 rates positives (extraction SDS/PK/CTAB) contre 18 (extraction par les kits) (tableau 2).

Sur les 13 rates envoyées au laboratoire en 1998 et 1999 (10 et 3), reconnues positives par les techniques bactériologiques, seules dix ont été retrouvées positives par la technique de PCR (en DA et après extraction de l'ADN par SDS/PK/CTAB). Par contre, pour toutes les rates envoyées en 2000 et 2001, la technique de PCR, dans les mêmes conditions, confirme les résultats positifs de la bactériologie (respectivement 8/8 et 6/6). Il est vraisemblable que les temps et conditions de conservation pourraient être responsables de la différence de résultats (tableau 2).

Aussi, pour tester l'efficacité de la PCR en fonction de la durée et des conditions de conservation des prélèvements sur le terrain (de la mort de l'animal au traitement des prélèvements en LVD), nous avons traité trois broyats de rate de souris inoculées par des isolats de *F. tularensis*. Leur culture n'était plus positive 3 jours après la mort des souris et après conservation des broyats à température ambiante et après 4 jours à +4°C. En revanche, la PCR a donné des résultats positifs au-delà de 6 jours de conservation, que ce soit à +4°C ou à température ambiante. L'essai a été continué environ quinze jours de façon favorable, pour se mettre dans les délais et les conditions du terrain, mais n'a pas été poursuivi au-delà.

• CONCLUSION

Ce travail, effectué en 2001, a permis de valider l'intérêt de la PCR par rapport à la méthode bactériologique classique, sur des prélèvements de qualité et de conservation variable, en testant plusieurs types d'amorces publiées ou nouvelles (AFSSA). En effet, la technique PCR permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons en peu de temps et les résultats obtenus sont fiables étant donné qu'elle est spécifique et sensible. Plus les envois sont rapides et les prélèvements frais ou correctement stockés, plus une extraction de l'ADN par kit et une simple amplification peuvent être

employées. Néanmoins, pour des délais de stockage supérieurs à plusieurs semaines à -20°C et pour des prélèvements tardifs, la double amplification associée à la technique d'extraction SDS/PK/CTAB apparaît être une technique de choix.

En conclusion, l'épidémiologie par la technique d'amplification génique (PCR) est possible, elle sera très utile au diagnostic de la tularémie chez les lagomorphes mais aussi dans les autres espèces animales sensibles, porteuses ou vectrices à surveiller. Enfin elle sera très précieuse dans la détection de la maladie humaine.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient très vivement les directeurs des laboratoires vétérinaires départementaux qui ont transmis des prélèvements ou des souches pour ce travail et particulièrement le Laboratoire départemental d'analyses d'Indre et Loire.

Nos remerciements vont aussi à Corinne Sailleau et à Claudine Le Doujet pour leurs conseils, à M. Boulière et à Madame Y. Benito.

BIBLIOGRAPHIE

- DE LA PUENTE-REDONDO VA, GARCIA DEL BLANCO N, GUTIERREZ-MARTIN CB, GARCIA-PENA FJ, RORIGUEZ FERRI EF (2000) Comparaison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1016-1022.
- DOLAN SA, DOMMARAJU CB, DE GUZMAN GB (1998) Detection of *Francisella tularensis* in clinical specimens by use of polymerase chain reaction. *Clin. Infect. Dis.*, **26**, 764-765.
- DUFRENE M, VAISSAIRE J (1998) Epidémiologie de la tularémie dans le monde. Essai de synthèse bibliographique. *Bull. Acad. Vet. de France*, **71**, 67-78.
- FORSMAN M, SANDSTROM G, SJOSTEDT A (1994) Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 38-46.
- HIGGINS JA, HUBALEK Z, HALOUZKA J, ELKINS KL, SJOSTEDT A, SHIPLEY M, IBRAHIM MS (2000) Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **62**, 310-318.
- JOHANSSON A, BERGLUND L, ERIKSSON U, GORANSSON I, WOLLIN R, FORSMAN M, TARNVICK A, SJOSTEDT A (2000) Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 22-26.
- SJOSTEDT A, ERIKSSON U, BERGLUND L, TARNVIK A (1997) Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1045-1048.
- VAISSAIRE J, AGIER C, LE DOUJET C (1996) Etude de la survie de *Francisella tularensis* dans les organes de souris mortes. *Bull. Acad. Vet. de France*, **69**, 315-322.
- WILSON K (1989) Preparation of genomic DNA from bacteria. In: AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN JG, SMITH JA, STRUHL K editors. *Current protocols in molecular biology*, 3rd edition., volume 1 : New-York, Chichester, Brisbane, Toronto and Singapore, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.