



THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

Université Paris-Est

Ecole doctorale ABIES

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Discipline : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Virginie HULIN

Le 05 Avril 2016

Circulation des *Chlamydiaceae* en filières avicoles, exposition des professionnels et étude de la survie de *Chlamydia psittaci*

Directrice de thèse : **M^{me} Karine LAROUCAU**, Directrice de recherche, UZB, ANSES

Jury

M^{me} Nadia HADDAD, Professeur, UMR Bipar, ENVA

M^{me} Cécile BÉBÉAR, Professeur, Université Bordeaux Segalen

M. Jacques GUILLOT, Professeur, EA Dynamyc, ENVA, UPEC

M^{me} Julie PUTERFLAM, Ingénieur, ITAVI

M. Karim SIDI BOUMEDINE, Chargé de projet, ANSES

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

ANSES – Laboratoire de Santé Animale

Unité Zoonoses Bactériennes

14, rue Pierre et Marie CURIE - 94701 Maisons-Alfort CEDEX

Résumé

La chlamydie aviaire, causée par la bactérie *Chlamydia psittaci*, représente un risque zoonotique important. L'infection chez l'animal est principalement asymptomatique, mais chez l'Homme elle peut entraîner des pneumopathies atypiques sévères et causer la mort dans les cas les plus graves. Les personnes infectées sont principalement celles exposées régulièrement à des oiseaux, particulièrement dans le cadre professionnel. En France, de nombreux cas humains sont liés à une exposition à des canards Mulard, espèce utilisée pour la production du foie gras. Afin d'évaluer la prévalence des *Chlamydiaceae* chez les volailles et de caractériser les souches circulantes, des suivis ont été réalisés à différents stades de l'élevage (couvoir, pré-gavage et gavage pour la filière canard, et abattoirs impliqués dans l'abattage de différentes espèces aviaires). Des prélèvements d'air et de poussières ainsi que des suivis sérologiques et biologiques de personnels volontaires ont été effectués en parallèle afin d'évaluer l'exposition des professionnels travaillant au contact des volailles. Des prélèvements environnementaux ainsi que des essais *in vitro* visant à étudier la survie de *C. psittaci* ont été réalisés afin de tenter de mieux caractériser les voies de contamination des oiseaux, ce qui pourrait, à terme, permettre de maîtriser le risque de contamination par *C. psittaci* chez l'animal et donc de réduire l'exposition des professionnels. Les résultats ont démontré une prévalence importante de *C. psittaci* chez le canard Mulard, au contraire des autres volailles qui hébergent très majoritairement *C. gallinacea*. L'exposition des professionnels aux *Chlamydia* est réelle, tout au long du processus d'élevage des volailles, mais plus particulièrement en élevages de canards Mulard et à l'abattoir, aussi il convient pour les professionnels de se protéger à chaque contact avec les animaux. L'hypothèse d'une contamination environnementale des animaux se fait de plus en plus claire, avec notamment la mise en évidence d'un lien existant entre les procédures de nettoyage et désinfection et l'excrétion des canards, la description de la survie de *C. psittaci* en dehors de tout hôte vivant, ou encore la mise en évidence d'une possible survie de *C. psittaci* au sein d'*A. castellanii*. La mise au point de moyens de lutte efficaces permettant de réduire voire de supprimer l'excrétion chez les volailles est également nécessaire, dans le but de diminuer l'exposition des professionnels.

Mots clés

Chlamydiaceae, *C. psittaci*, psittacose, chlamydie, canard Mulard, volailles, *C. gallinacea*, abattoir, couvoir, amibe, survie

Abstract

Circulation of *Chlamydiaceae* in poultry industries, worker exposure and study of the survival of *Chlamydia psittaci*.

Avian chlamydiosis is a factor of economic loss to the poultry industry as well as a risk for zoonotic transmission to human. *Chlamydia psittaci* is the primary avian chlamydial pathogen with zoonotic potential. Although being mainly asymptomatic in birds, it can cause a disease called "psittacosis" in humans, with severe atypical pneumonia that leads to death in the most severe cases. Persons affected are mainly those whose occupations put them at risk of exposure, and a number of recent reports in France have confirmed that most of the human cases seemed to be linked to poultry, especially mule ducks. Currently there is evidence suggesting that avian chlamydiosis in poultry involves a new chlamydial agent, namely *C. gallinacea*. In order to evaluate the presence of *Chlamydiaceae* in poultry and the exposure of workers, we conducted four studies in the poultry industries, in duck hatchery, breeding farms and slaughterhouse, as well as a study in two poultry slaughterhouses including samples from voluntary workers. Results showed an important asymptomatic carriage of *C. psittaci* by mule ducks and a real, invisible and unpredictable exposure of workers. The species *C. gallinacea* was really prevalent in poultry other than ducks and we still ignore its impact on human. Contamination of animals on farm seems to be mainly made via the environment. *In vitro* studies have been done to examine the survival of *C. psittaci* as a function of temperature in a non-nutritive medium and showed that viable bacteria were still detectable after two months. Finally, the possible interactions between *C. psittaci* and an amoeba, *Acanthamoeba castellanii*, were studied and seem to show that the bacteria was able to enter the amoeba but we still ignore if it can survive or not.

Key words

Chlamydiaceae, *C. psittaci*, psittacosis, chlamydiosis, mule duck, poultry, *C. gallinacea*, slaughterhouse, hatchery, amoeba, survival

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier les directeurs du couvoir et des abattoirs, ainsi que les éleveurs d'avoir accepté d'ouvrir leur portes dans le cadre des études menées dans cette thèse. Mes remerciements également au personnel de ces établissements d'avoir accepté de participer à l'étude humaine menée dans les abattoirs, et au CNR *Chlamydia* de Bordeaux d'avoir réalisé l'analyse de ces prélèvements.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet « Airchlam », mes remerciements vont donc également à l'ANSES pour avoir permis, par ce financement, que ces travaux soient possibles.

Je remercie Madame Cécile Bébéar et Monsieur Jacques Guillot pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Mes remerciements vont également à Madame Nadia Haddad pour avoir accepté de présider le jury, ainsi qu'à Madame Julie Puterflam et Monsieur Karim Sidi Boumedine pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse Pascal Arné, Benoit Durand, Virginie Mick, et Laurent Moulin pour leurs conseils précieux et le temps qu'ils m'ont accordé.

Je souhaite également remercier le directeur du Laboratoire de Santé Animale, Pascal Boireau, ainsi que Bruno Garin-Bastuji et Claire Ponsart, directeurs de l'Unité Zoonoses Bactériennes, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Et un merci particulier à Claire pour ses relectures attentives de ce manuscrit.

Cette thèse n'aurait évidemment pas pu avoir lieu sans l'encadrement, l'aide précieuse, la gentillesse et la bienveillance de ma directrice de thèse, Karine Laroucau. Je te remercie vraiment de m'avoir accueillie dans ton équipe, de m'avoir fait confiance pour ce projet et de m'avoir si souvent aidée à le mener à bien.

Aux membres de l'équipe Chlamydiose, Rachid Aaziz, pour ta gentillesse, tu m'as toujours aidée lorsque j'en avais besoin, merci beaucoup. Claire Bertin, tu m'as bien souvent rendue de grands services lorsque j'étais perdue dans les méandres des processus de commandes de l'ANSES, je te remercie beaucoup, et n'oublions pas les places de cinéma... Et enfin Fabien Vorimore, tu m'as appris la quasi-totalité des techniques dont j'ai eu besoin lors de cette thèse, je t'en remercie.

Je remercie également Pauline Bernard et Sabrina Oger, avec qui j'ai collaboré sur les études en élevages de canards et en abattoirs, respectivement.

A Vincent Delafont et Laurent Moulin des Eaux de Paris, merci beaucoup pour vos conseils et votre temps qui m'ont permis de mettre en place la culture d'amibes au laboratoire.

Je souhaite également remercier Ru-Ching Hsia d'avoir accepté d'effectuer les études de microscopie électronique de cette thèse, avec acharnement.

A Konrad Sachse et Victoria Siarkou qui m'ont énormément aidée pour la rédaction de mes articles.

Et je remercie également toutes les personnes qui sont intervenues dans les travaux de cette thèse, j'en oublie forcément...

Aux membres de l'UZB, merci pour votre accueil, les fous rires, les petits déjeuners en salle café et ce magnifique surnom qui m'aura suivi bien longtemps.

A Claire Bertin, Laura Boschioli, Sylvie Hénault, Claudine Karoui, Lorraine Michelet et Gabriela Vecchio, pour tous les repas partagés, pour votre gentillesse, votre soutien et votre aide.

Je remercie bien évidemment ma famille, à commencer par mes parents, ma mamoune et mon papou, car c'est grâce à vous si j'en suis arrivée là aujourd'hui. Je n'aurais jamais pu faire cela sans votre soutien, et sans l'éducation que vous nous avez donnée. Vous nous avez toujours soutenus dans nos choix, et avez toujours fait votre maximum pour nous. Mes frères, mes belles-sœurs, et mes neveux et nièces adorés, pour tout le bonheur que vous m'apportez au quotidien. Petit clin d'œil à Vincent, tu auras étudié le sexe des tortues, moi le cloaque des volailles... on reste dans le thème ! Je vous aime plus que tout.

Et enfin, à Gilles. Tu m'auras supportée, et rien que pour ça je me dois de te remercier. Tu as toujours été présent, tu as toujours essayé de me donner des conseils même lorsque je ne voulais pas écouter. Tu m'as félicitée pour mes réussites et consolée pour mes échecs. Je te remercie du fond du cœur.

Table des matières

Résumé	3
Mots clés.....	3
Abstract	5
Key words	5
Remerciements	7
Table des matières	9
Liste des abréviations	15
Liste des figures.....	17
Liste des tableaux.....	19
Avant-propos	21
Introduction	25
Etude bibliographique	29
1. Les <i>Chlamydiales</i>	31
1.1 Histoire des <i>Chlamydiaceae</i> et classification	34
1.2 Les différentes espèces composant la famille des <i>Chlamydiaceae</i>	39
1.3 Caractéristiques biologiques des <i>Chlamydiaceae</i>	47
1.3.1. Les différentes formes biologiques de <i>Chlamydiaceae</i> et leurs structures.	47
1.3.2. Le cycle de développement des <i>Chlamydiaceae</i>	49
1.3.3. La persistance des <i>Chlamydiaceae</i>	50
1.3.4. Caractéristiques génétiques des <i>Chlamydiaceae</i>	51
1.3.5. Mécanismes d'infection de l'hôte et facteurs de virulence.....	51
1.3.6. Les bactériophages des <i>Chlamydiaceae</i>	54
1.4 Les infections à <i>Chlamydia</i> chez les oiseaux	55
1.4.1. Les infections à <i>C. psittaci</i>	55
1.4.1.1. Pathogénie	55
1.4.1.2. Voies de transmission	59
1.4.1.3. Epidémiologie.....	61
1.4.1.4. Tableau clinique	61

1.4.1.5. Diagnostic	65
1.4.1.5.1. Prélèvements	65
1.4.1.5.2. Coloration directe	65
1.4.1.5.3. Culture et isolement	65
1.4.1.5.4. Méthodes de détection sérologiques.....	66
1.4.1.5.5. Méthodes de détection des acides nucléiques	69
1.4.1.5.6. Typage de <i>C. psittaci</i>	69
1.4.1.6. Survie et résistance de <i>C. psittaci</i>	71
1.4.1.7. Traitement.....	71
1.4.1.8. Prophylaxie.....	72
1.4.1.9. Règlementation.....	73
1.4.2. Les infections à <i>C. avium</i>	74
1.4.3. Les infections à <i>C. gallinacea</i>	74
1.5 Les infections à <i>C. psittaci</i> chez l'Homme	75
1.5.1. Voies de transmission.....	75
1.5.2. Epidémiologie.....	75
1.5.3. Tableau clinique	77
1.5.4. Diagnostic.....	77
1.5.4.1. Prélèvements.....	78
1.5.4.2. Méthodes de détection sérologiques	78
1.5.4.3. Analyse de risque et définitions de cas	78
1.5.4.4. Méthodes d'analyse de la contamination aérienne	79
1.5.5. Traitement.....	80
1.5.6. Règlementation et prévention	80
2. Description des filières avicoles en France	83
2.1 Les volailles de chair	83
2.2 Les volailles de ponte	85
2.3 Les palmipèdes à foie gras	87
2.3.1. Statistiques sur la production du foie gras en France.....	87
2.3.2. L'élevage du canard Mulard [267]	87
2.3.2.1. Elevage des reproducteurs.....	87

2.3.2.2. <i>Elevage des canards Mulard</i>	89
2.3.2.2.1. <i>Pré-gavage</i>	89
2.3.2.2.2. <i>Gavage</i>	89
2.3.2.2.3. <i>Abattage</i>	91
3. Les amibes libres de l'environnement et leurs interactions avec les micro-organismes	93
3.1 Généralités sur les amibes	93
3.2 Les <i>Acanthamoeba</i>	95
3.2.1. <i>Classification</i>	95
3.2.2. <i>Biologie</i>	95
3.2.3. <i>Ecologie</i>	98
3.2.4. <i>Culture</i>	98
3.2.5. <i>Pathogénicité</i>	99
3.3 Interactions des <i>Acanthamoeba</i> avec les micro-organismes	100
3.3.1. <i>Interactions avec les virus</i>	100
3.3.2. <i>Interactions avec les levures</i>	101
3.3.3. <i>Interactions avec les protozoaires</i>	101
3.3.4. <i>Interactions avec les bactéries</i>	101
3.3.5. <i>Interactions avec les Chlamydiales</i>	103
Objectifs	113
Matériel et méthodes	117
1. Prévalence des <i>Chlamydiaceae</i> en filières avicoles et exposition des professionnels	119
1.1 Suivis mensuels de lots en couvoir et en abattoir A (canards)	119
1.1.1. <i>En couvoir</i>	119
1.1.1.1. <i>Prélèvements effectués</i>	119
1.1.1.2. <i>Extraction d'ADN</i>	119
1.1.1.3. <i>Analyse par PCR en temps réel</i>	120
1.1.2. <i>En abattoir de canards (Abattoir A)</i>	121
1.1.2.1. <i>Prélèvements effectués</i>	121
1.1.2.2. <i>Extraction d'ADN et analyse par PCR en temps réel</i>	121
1.1.2.3. <i>Génotypage et séquençage</i>	121

1.2	Etude ponctuelle dans deux abattoirs de volailles A et B	123
1.2.1.	Prélèvements animaux.....	123
1.2.1.1.	Extraction d'ADN.....	123
1.2.1.2.	Analyse par PCR en temps réel	123
1.2.1.3.	Génotypage et séquençage	123
1.2.2.	Prélèvements humains	124
1.2.2.1.	Extraction d'ADN et détection par PCR en temps réel	124
1.2.2.2.	Sérologie.....	124
1.3	Suivi de sept lots de canards Mulard du couvoir à l'abattoir	127
1.3.1.	Prélèvements effectués	127
1.3.1.1.	Couvoir	127
1.3.1.2.	Elevages de pré-gavage	127
1.3.1.3.	Ateliers de gavage.....	128
1.3.1.4.	Abattoir A.....	129
1.3.2.	Extraction d'ADN.....	129
1.3.2.1.	Prélèvements d'eau et de sol	129
1.3.2.2.	Pédichiffonnettes et chiffonnettes	129
1.3.3.	Analyse par PCR en temps réel.....	129
1.3.4.	Génotypage de <i>C. psittaci</i>	130
1.3.5.	Détection et séquençage du bactériophage Chp1	130
1.3.5.1.	Par PCR en temps réel	130
1.3.5.2.	Par PCR conventionnelle et séquençage	130
1.3.6.	Détection des amibes	131
1.3.7.	Questionnaire soumis aux éleveurs	131
1.3.8.	Analyses statistiques des résultats.....	131
2.	Etude de la survie de <i>Chlamydia psittaci</i> par des modèles <i>in vitro</i>	132
2.1	Culture cellulaire	132
2.2	Infection des cellules par <i>C. psittaci</i>	132
2.3	Titrage par Immunofluorescence directe (IFD)	132
2.4	Etude de la survie de <i>C. psittaci</i> souche 06-859 maintenue à différentes conditions de température	133

2.4.1.	<i>Mise en place des échantillons</i>	133
2.4.2.	<i>Prélèvements</i>	133
2.4.3.	<i>Analyse statistique des résultats</i>	134
2.5	Etude des interactions entre <i>C. psittaci</i> et <i>A. castellanii</i>	135
2.5.1.	<i>Lyse mécanique de l'inoculum de C. psittaci</i>	135
2.5.2.	<i>Culture de A. castellanii</i>	135
2.5.3.	<i>Infection de A. castellanii par C. psittaci</i>	135
2.5.4.	Essai 1 - <i>Infection de A. castellanii par C. psittaci et analyse par PCR</i>	136
2.5.4.1.	<i>Prélèvements</i>	136
2.5.4.2.	<i>Extraction d'ADN</i>	136
2.5.4.3.	<i>PCR en temps réel</i>	136
2.5.5.	Essai 2 - <i>Infection de A. castellanii par C. psittaci et analyse par culture</i> .	137
2.5.6.	Essai 3 - <i>Infection de A. castellanii par C. psittaci et analyse par MET</i>	138
2.5.6.1.	<i>Fixation des co-cultures</i>	138
2.5.6.2.	<i>Analyse par MET</i>	138
	Résultats	139
1.	Prévalence des <i>Chlamydiaceae</i> en filières avicoles et exposition des professionnels	141
1.1	Filière canards Mulard : suivis ponctuels et mensuels pendant un an.....	141
1.1.1.	<i>En couvoir</i>	141
1.1.2.	<i>En abattoir A (canards exclusivement)</i>	143
1.2	Etudes ponctuelles dans deux abattoirs de volailles A et B.....	143
	Publication n°1 : Host preference and zoonotic potential of <i>Chlamydia psittaci</i> and <i>C. gallinacea</i> in poultry.	145
	Publication n°2 : Exposition des professionnels aux <i>Chlamydiaceae</i> : enquête dans deux abattoirs de volailles français.	157
1.3	Suivi de sept lots de canards Mulard du couvoir à l'abattoir	162
	Publication n°3 : Assessment of <i>Chlamydia psittaci</i> shedding and environmental contamination as potential sources of worker exposure throughout the mule duck breeding process.	164

2. Etude de la survie de <i>Chlamydia psittaci</i> par des modèles <i>in vitro</i>	181
2.1 Etude de la survie de <i>C. psittaci</i> souche 06-859 maintenue à différentes conditions de température	181
2.2 Etude des interactions entre <i>C. psittaci</i> et <i>A. castellanii</i>	183
2.2.1. Essai 1 - Infection de <i>A. castellanii</i> par <i>C. psittaci</i> et analyse par PCR.....	183
2.2.2. Essai 2 - Infection de <i>A. castellanii</i> par <i>C. psittaci</i> et analyse par culture.	185
2.2.3. Essai 3 - Infection de <i>A. castellanii</i> par <i>C. psittaci</i> et analyse par MET.....	187
Discussion	189
1. <i>C. psittaci</i> chez les canards vs <i>C. gallinacea</i> chez d'autres espèces de volailles...	191
2. Une exposition des professionnels à <i>C. psittaci</i> réelle tout au long de la filière canards Mulard : à un niveau moindre en couvoir par rapport à l'abattoir et plus fréquente en élevages.....	193
3. Des réponses sérologiques vis-à-vis de <i>C. psittaci</i> chez les professionnels en abattoir, particulièrement chez ceux travaillant au contact de canards	195
4. Caractérisation de l'excrétion de <i>C. psittaci</i> en élevages de canards Mulard : rôle de l'environnement, gestion des lots et des bâtiments/parcours, co-infections et utilisation des antibiotiques	198
5. Etude de la survie de <i>Chlamydia psittaci</i> dans l'environnement à l'aide de prélèvements et de modèles <i>in vitro</i>	201
Conclusion et perspectives	207
Références	215
Annexes	237
Annexe 1 : Protocoles d'extraction de l'ADN avec le kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)	239
Annexe 2 : Préparation du milieu PYG (Peptone Yeast Glucose)	244
Annexe 3 : Résultats du questionnaire soumis aux éleveurs de pré-gavage	245
Annexe 4 : Communications orales.....	250
Annexe 5 : Communications écrites (posters)	251

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFNOR	Association Française de Normalisation
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AFSSET	Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
APMV	<i>Acanthamoeba polyphaga mimivirus</i>
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
Bipar	Biologie moléculaire et Immunologie Parasitaires
BGM	Buffalo Green Monkey
CA	Corps Aberrant
CDC	Center for Disease Control and prevention
CE	Corps Élémentaire
CI	Corps Intermédiaire
CLSM	Microscope Confocal à Balayage Laser
CNR	Centre National de Recherche
CPAF	Chlamydial Protease-like Activity Factor
Cq	Quantification Cycle
CR	Corps Réticulé
ECMO	Oxygénation par Membrane Extra-Corporelle
EFICATT	Exposition Fortuite à un agent Infectieux et Conduite à Tenir en milieu de Travail
EGA	Encéphalite Granulomateuse Amibienne
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ENVA	Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
EOPS	Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques
EPI	Equipement de Protection Individuelle
EST	Environnement Santé Travail
FC	Fixation du Complément
h pi	Heures Post-Infection
HSP	Heat Shock Protein
HVT	Herpes Virus of Turkeys
IFD	Immuno-Fluorescence Directe
IFU	Inclusion Forming Unit
IgA	Immunoglobuline de type A
IgG	Immunoglobuline de type G
IgM	Immunoglobuline de type M
INMA	Institut National de Médecine Agricole
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles
INVS	Institut de Veille Sanitaire
ITAVI	Institut Technique de l'Aviculture
kb	Kilobase

LGV	LymphoGranulomatose Vénérienne
LNR	Laboratoire National de Référence
Log	Logarithme
LPS	LipoPolySaccharide
LSAn	Laboratoire de Santé Animale
MAC	Membrane Attack Complex
Mb	Mégabase
MDO	Maladie à Déclaration Obligatoire
MDV	Marek's Disease Virus
MEM	Minimum Essential Medium
MET	Microscopie Electronique en Transmission
MIF	Micro Immuno-Fluorescence
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
MLVA	Multi-Locus VNTR Analysis
MOI	Multiplicity Of Infection
MOMP	Major Outer Membrane Protein
MRC	Maladie Réputée Contagieuse
MSA	Mutualité Sociale Agricole
OAC	Œuf A Couver
OBNE	Œuf Bêché Non Eclos
OIE	Office International des Epizooties
OPA	Organisation Professionnelle Agricole
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PG	PeptidoGlycane
pmp	Polymorphic membrane protein
PMSI	Programme Médicalisé des Systèmes d'Information
PNREST	Programme National de Recherche Environnement Santé Travail
PY	Peptone Yeast
PYG	Peptone Yeast Glucose
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Rotation per minute
rRNA	ARN ribosomal
SINC	Secreted Inner Nuclear membrane-associated Chlamydia protein
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
SPF	Specific Pathogen Free
SPG	Sucrose Phosphate Glutamate
SVF	Sérum de veau fœtal
T3SS	Type 3 Secretion System
TEC	Tonne Equivalent Carcasse
UMR	Unité Mixte de Recherche
UZB	Unité Zoonoses Bactériennes
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
ZP	Zone de Plasticité

Liste des figures

Figure 1 : Classification de l'ordre des <i>Chlamydiales</i>	30
Figure 2 : Arbre phylogénétique basé sur la comparaison du gène 16S rRNA des douze espèces de <i>Chlamydiaceae</i> actuellement décrites.	38
Figure 3 : Aspect microscopique d'une inclusion de <i>C. trachomatis</i> LGV 404 contenant des corps élémentaires (CE), des corps réticulés (CR) et des corps réticulés en division.	46
Figure 4 : Cycle de développement des <i>Chlamydia</i>	48
Figure 5 : Schéma des différentes voies de transmission de <i>C. psittaci</i> chez l'animal.	58
Figure 6 : Coloration par immunofluorescence directe (kit commercial IMAGEN Chlamydia, Thermo Scientific) d'un tapis de cellules BGM infectées par <i>C. psittaci</i>	64
Figure 7 : Répartition des différentes espèces de volailles pour la production de viande [262].	82
Figure 8 : Production des volailles de chair.	82
Figure 9 : Production des œufs de consommation et ovoproduits.	84
Figure 10 : Elevage du canard mulard pour la production du foie gras.	88
Figure 11 : Illustrations de l'élevage des canards Mulard.	88
Figure 12 : Schéma des étapes d'abattage des volailles : Les étapes grisées sont spécifiques des palmipèdes à foie gras.	90
Figure 13 : Phylogénie des eucaryotes.	92
Figure 14 : Trophozoïtes d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> cultivés en milieu liquide PYG.	94
Figure 15 : Schéma de la structure d'un trophozoïte d' <i>Acanthamoeba</i>	94
Figure 16 : Kyste d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> en culture en milieu liquide PYG.	96
Figure 17 : Schéma du processus d'élevage du canard Mulard, date et type des interventions auprès des animaux et prélèvements effectués.	126
Figure 18 : Evolution du titre bactérien moyen des séries S1 à S5 de <i>C. psittaci</i> exprimé en log ₁₀ avec les écart-types, en fonction du temps et de la température d'incubation.	180
Figure 19 : Evolution de la valeur de Cq obtenue par PCR en temps réel ciblant le gène 23S rRNA en fonction du temps et de la MOI considérée.	182
Figure 20 : Proportions de <i>C. psittaci</i> dans le surnageant (en rouge) et dans le grattage d'amibes (en vert) par rapport à l'inoculum de départ (en bleu) à J ₁ pour les quatre MOI testées.	184
Figure 21 : Evolution du titre bactérien dans le surnageant et le grattage au cours du temps pour chaque MOI.	184
Figure 22 : Clichés d' <i>A. castellanii</i> en microscopie électronique.	186
Figure 23 : Cliché de microscopie électronique des corps sphériques observés dans une vacuole d' <i>A. castellanii</i> infectée par <i>C. psittaci</i> à 24 h pi.	187
Figure 24 : Schématisation des résultats obtenus dans le cadre des différentes études.	204

Liste des tableaux

Tableau 1: Présentation des génotypes validés de <i>C. psittaci</i> et des espèces hôtes principales.	42
Tableau 2 : Présentation des génotypes proposés de <i>C. psittaci</i> et de l'origine des isolats. (d'après Sachse, <i>et al.</i> [78])	42
Tableau 3 : Sélection de résultats d'études de prévalence de <i>C. psittaci</i> chez les oiseaux.	60
Tableau 4 : Sélection de systèmes de PCR en temps réel existants et spécificité.	68
Tableau 5 : Micro-organismes pouvant interagir avec les <i>Acanthamoeba</i>	106
Tableau 6 : Résultats des PCR ciblant le gène 23S rRNA pour les prélèvements effectués durant un an en couvoir de canards.	140
Tableau 7 : Résultats des PCR ciblant le gène 23S rRNA pour les prélèvements effectués durant un an en abattoir de canards.	142

Avant-propos

L'ANSES ou Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été créée le 1^{er} juillet 2010 par la fusion de l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) et de l'AFSSET (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail). L'ANSES est un établissement public placé sous la tutelle de cinq ministères, à savoir le ministère de l'agriculture, le ministère de l'écologie, le ministère de la santé, le ministère du travail et le ministère de l'économie. L'agence assure des missions de veille, d'expertise et de recherche et référence dans des domaines variés passant par la santé humaine, la santé et le bien-être animal et la santé des végétaux. Elle est impliquée dans de nombreux plans nationaux et collaborations avec des agences européennes et regroupe de nombreux mandats nationaux et internationaux.

Onze laboratoires de référence et de recherche sont répartis en France avec 1 350 agents et l'écriture d'une moyenne de 250 publications scientifiques par an.

Le Laboratoire de Santé Animale (LSAn) de Maisons-Alfort s'attache à évaluer les risques dans les domaines de la santé et du bien-être des animaux, de la gestion des médicaments vétérinaires et des biocides, de la santé humaine et de l'analyse et la surveillance des agents pathogènes.

L'Unité des Zoonoses Bactériennes (UZB) est située au sein du LSAn et regroupe des activités de référence et de recherche autour de bactéries zoonotiques, c'est-à-dire transmissibles à l'Homme, que sont les *Brucella*, *Mycobacterium bovis*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia mallei* et *Chlamydia*.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont été financés par le biais du projet Environnement Santé Travail (EST) « AirChlam ». Ce projet accepté en 2011 s'inscrit dans le Programme National de Recherche EST (PNREST) financé par l'ANSES et porte sur l'évaluation des risques et des expositions à *C. psittaci*, agent de l'ornithose-psittacose, en milieu professionnel (secteur avicole). Il fait suite au projet « ChlamCan » financé par l'AFSSA en 2008-2009 et portant sur l'investigation de la filière canard vis-à-vis des infections à *C. psittaci*.

Introduction

La bactérie *Chlamydia psittaci* est responsable d'une zoonose, nommée chlamydie aviaire chez les oiseaux et psittacose chez l'Homme. L'infection à *C. psittaci* constitue principalement un problème de santé publique humaine. En effet, les oiseaux, hôtes principaux de la bactérie, ne présentent que rarement des symptômes, ce qui rend l'exposition à la bactérie invisible pour les personnes en contact.

La psittacose n'est pas une maladie à déclaration obligatoire en France, les données épidémiologiques disponibles sont donc très probablement sous-estimées. Le diagnostic de la psittacose reste difficile à établir en raison de symptômes peu spécifiques, des limites des tests de diagnostic actuellement disponibles (faible sensibilité, réactions croisées, prélèvements invasifs...) et de la disponibilité des prélèvements. En effet, il est nécessaire de disposer de sérums appariés pour mettre en évidence une éventuelle séroconversion, tandis que les prélèvements de choix pour la PCR (lavages broncho-alvéolaires, crachats) peuvent être invasifs, non réalisés ou trop tardivement et/ou impactés par la mise en place d'un traitement antibiotique.

Les cas de décès de psittacose sont désormais rares, mais un retard à la mise en place d'un traitement antibiotique adapté peut conduire à une issue fatale. En France, l'infection à *C. psittaci* concerne principalement les professionnels de la filière avicole, et tout particulièrement la filière canards Mulard, espèce la plus utilisée pour la production du foie gras. Les cas rapportés concernent plus particulièrement les personnels d'abattoirs et de couvoirs, des cas humains plus ou moins graves ayant notamment été rapportés en 2008-2009 dans deux abattoirs (l'un abattant uniquement des canards et le second traitant d'autres espèces de volailles) et dans un couvoir de canards dans l'Ouest de la France.

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence une prévalence importante de *C. psittaci* chez les canards Mulard [1, 2] et de poser des hypothèses sur les voies de contamination possibles pour ces oiseaux. Cependant, ces études se focalisaient principalement sur les animaux, or ceux-ci sont régulièrement manipulés par le personnel tout au long du processus d'élevage.

Dans le cadre de cette thèse, un suivi en filière canard Mulard plus focalisé sur l'exposition des professionnels a été réalisé, avec des prélèvements sur les animaux et des prélèvements d'air effectués à chaque intervention nécessitant la manipulation des animaux par l'Homme. Des prélèvements environnementaux ont également été réalisés afin d'évaluer la possible contamination des animaux via l'environnement, et des études *in vitro* complémentaires ont été effectuées pour tester les possibilités de survie de *C. psittaci*. Des suivis sur les animaux et le personnel volontaire ont également été effectués plus spécifiquement dans les deux abattoirs ayant eu à faire face à des cas fatals de psittacose.

Etude bibliographique

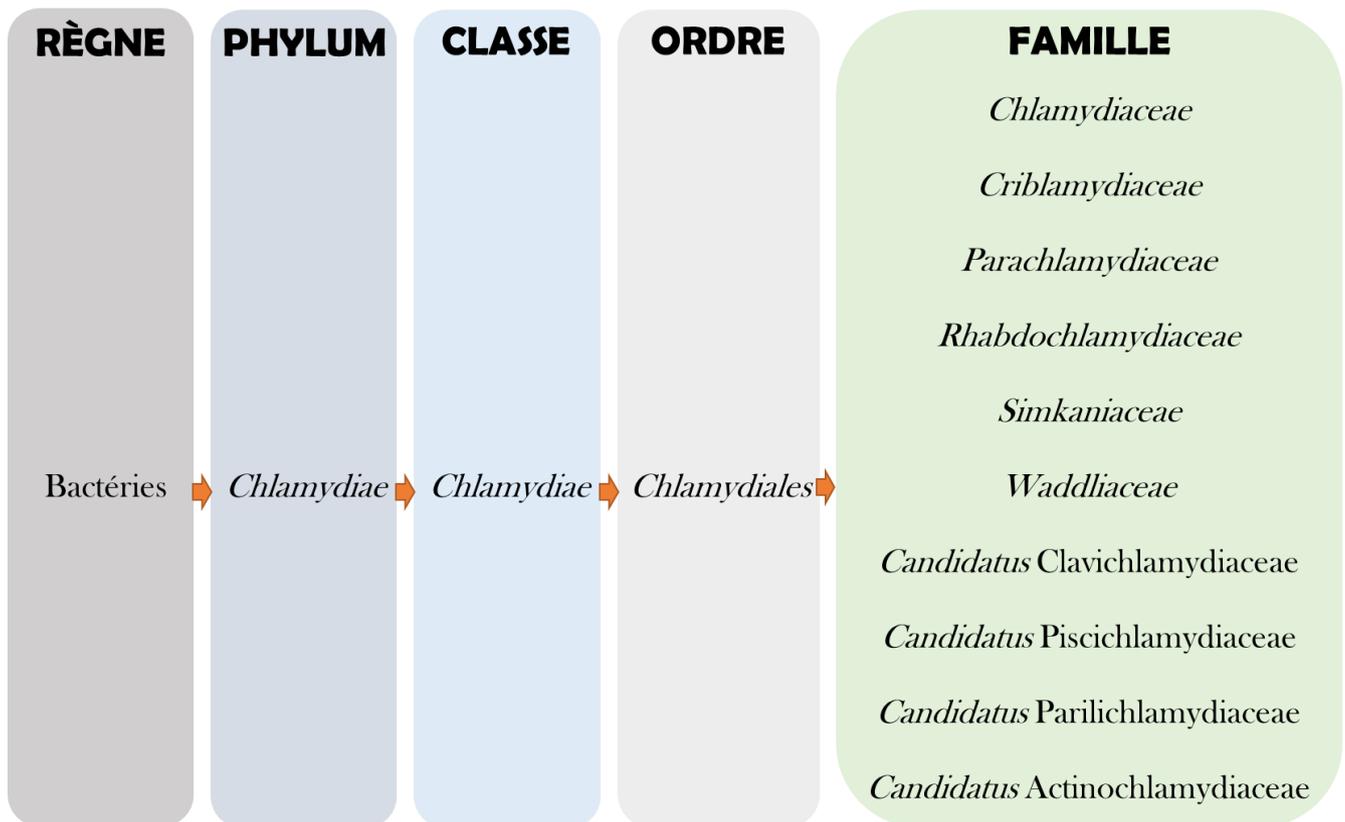


Figure 1 : Classification de l'ordre des *Chlamydiales*.
(d'après Pawlikowska-Warych and Deptula [3])

1. Les *Chlamydiales*

Les *Chlamydiales* constituent un ordre de bactéries au sein du phylum des *Chlamydiae* (**Figure 1**). Récemment, Gupta *et al.* ont proposé de séparer la classe des *Chlamydiae* en deux ordres : *Chlamydiales* et *Parachlamydiales* [4]. La classification actuellement en vigueur comprenant un ordre unique a été considérée dans ces travaux de thèse.

L'ordre des *Chlamydiales* comprend au total dix familles dont quatre *Candidatus* récemment détectés chez des poissons [3, 5, 6]. On distingue habituellement la famille des *Chlamydiaceae* regroupant des souches dites pathogènes, des autres familles de *Chlamydiales* nommées aussi *Chlamydia-like*, regroupant des souches principalement d'origine environnementale parfois associées à des tableaux cliniques chez l'animal et/ou l'Homme.

▪ *Chlamydiaceae*

Cette famille comprend un genre établi nommé *Chlamydia* (*C.*) qui regroupe onze espèces (voir 1.2.). Un second genre (*Candidatus Amphibiichlamydia*) composé de deux espèces a récemment été proposé. L'espèce *Candidatus A. salamandrae* a été détectée à ce jour chez des salamandres, alors que l'espèce *Candidatus A. ranarum* a été détectée chez des grenouilles-taureaux [7, 8].

▪ *Criblamydiaceae*

Les *Criblamydiaceae* sont composées de deux espèces récemment décrites, *Criblamydia sequanensis* qui a été isolée d'un échantillon d'eau provenant de la Seine [9] et *Estrella lausannensis* isolée d'un échantillon d'eau de surface brute dans une usine de traitement en Espagne. Ces souches ont été isolées grâce à la réalisation de techniques de co-culture avec des amibes (*Acanthamoeba*), protozoaires très ubiquistes de l'environnement (voir 3.) [10].

▪ *Parachlamydiaceae*

Ces bactéries sont présentes naturellement au sein des amibes libres, principalement les genres *Acanthamoeba* et *Hartmannella*. Cette famille contient cinq genres : *Parachlamydia*, *Neochlamydia*, *Protochlamydia*, *Mesochlamydia* et *Metachlamydia* [11].

Les *Parachlamydiaceae* sont suspectées d'être à l'origine d'avortements chez les bovins, de conjonctivites chez les ovins ou encore de pathologies diverses chez l'Homme, notamment des problèmes respiratoires, oculaires et d'avortement [12]. *Parachlamydia acanthamoeba* a été mise en évidence dans des placentas d'ovins et de bovins [13]. Lors d'une étude menée en Suisse sur des bovins, 46/343 tissus placentaires issus d'avortements se sont révélés positifs par PCR en temps réel spécifique des *Parachlamydiaceae*. Cependant, seuls neuf de ces échantillons ont présenté un Cq inférieur à 40, la charge bactérienne était donc faible et on ne peut exclure qu'une autre cause soit à l'origine de l'avortement [14]. De plus, le pouvoir abortif de ces bactéries n'a pas pu être reproduit expérimentalement à ce jour.

Les *Parachlamydiaceae* ont également été détectées dans le tractus génital d'animaux, et dans des frottis vaginaux de femmes. Une étude sérologique menée sur des femmes a montré qu'aucune réponse sérologique vis-à-vis des *Parachlamydiaceae* n'était détectée chez des patientes n'ayant pas eu d'avortement, alors que 7/269 femmes ayant avorté présentaient un taux d'IgG supérieur ou égal à 64 [15].

- *Rhabdochlamydiaceae*

Cette famille contient un genre unique et deux espèces, initialement identifiées chez des isopodes et des arthropodes. Depuis, quelques rapports ont fait état d'une pathogénicité potentielle de ces espèces chez les mammifères, et cette famille est, entre autres, suspectée d'être impliquée dans des cas de pneumonies chez l'Homme [6].

- *Simkaniaceae*

La première bactérie isolée de cette famille, *Simkania negevensis*, a été identifiée suite à la contamination d'une culture cellulaire. D'autres espèces composant cette famille ont depuis été isolées chez des insectes et des poissons [3, 6]. Les études sérologiques suggèrent une prévalence importante de ces bactéries chez l'Homme, notamment en lien avec des pneumonies communautaires ou des bronchopathies. Il a été montré que *Simkania* pouvait infecter et se multiplier dans les macrophages humains [16]. Des micro-organismes apparentés ont été détectés dans des sources d'eau froide [16].

- *Waddliaceae*

La famille des *Waddliaceae* est composée d'un genre unique et de deux espèces qui ont respectivement été isolées de bovins, chez lesquels elles pourraient causer des avortements ainsi que des maladies fœtales (*Waddlia chondrophila*) [17, 18], et de chauves-souris malaysiennes (*W. malaysiensis*) [19]. Récemment, une troisième espèce nommée *W. cocoyoc* a été proposée après la détection d'une bactérie phylogénétiquement proche des *Waddlia* chez des chauve-souris au Mexique [20].

Il a été démontré *in vitro* que l'espèce *W. chondrophila* était capable de survivre dans un grand nombre de cellules humaines, dont les macrophages et les cellules endométriales, supposant qu'elle pourrait être impliquée dans des pathologies humaines, notamment des avortements. Chez l'animal, *W. chondrophila* a été isolée à partir de placentas et de fœtus de bovins [13], et un avortement engendré par *W. chondrophila* a pu être reproduit expérimentalement chez les bovins où l'inoculation intramusculaire de deux fœtus a entraîné la mort de l'un d'eux dans un délai de deux semaines [21].

Une étude sérologique a été menée chez des femmes et a montré une prévalence de *W. chondrophila* d'environ 30 % chez des patientes ayant subi un avortement, contre seulement 7 % environ chez les femmes n'ayant pas avorté [15].

De l'ADN de *W. chondrophila* a également été détecté dans des échantillons respiratoires de patients atteints de pneumonies et de bronchiolites [6].

- *Candidatus* Clavichlamydiaceae

L'unique espèce de cette famille, *candidatus* Clavichlamydia salmonicola, a été détectée chez des saumons d'élevage en eau douce (*Salmo salar*) en Norvège et en Irlande et présentant, pour la plupart, des kystes au niveau des cellules épithéliales des branchies et de la peau [22, 23]. La prévalence par PCR en temps réel de cette espèce chez les saumons en eau douce s'échelonne de 80 à 100 %. Il a de plus été montré que, lorsque les animaux contaminés étaient transférés dans de l'eau de mer, la bactérie devenait non détectable au bout de quatre à six semaines [23].

- *Candidatus* Piscichlamydiaceae

L'espèce *candidatus* Piscichlamydia salmonis a initialement été détectée à partir de branchies prélevées sur des saumons d'élevage (*Salmo salar*) [24], mais a également été détectée chez des ombles chevaliers (*Salvelinus alpinus*) [25].

- *Candidatus* Parilichlamydiaceae

Ce *candidatus* a été détecté chez de nombreux poissons marins et est divisé en deux genres : *candidatus* Parilichlamydia et *candidatus* Similichlamydia. L'espèce *candidatus* Parilichlamydia carangidicola a été détectée chez la sériole chicard (*Seriola lalandi*) [26], l'espèce *candidatus* Similichlamydia latridicola chez le trompettiste rayé (*Latris lineata*) [27], l'espèce *candidatus* S. labri chez la vieille commune (*Labrus Bergylta*) [28] et l'espèce *candidatus* S. laticola chez le barramundi (*Lates calcarifer*) [29]. Dans tous les cas, cette bactérie cause les mêmes lésions que les autres *Chlamydiales* détectées chez des poissons, à savoir des kystes qui se forment dans les cellules épithéliales.

- *Candidatus* Actinochlamydiaceae

L'espèce *candidatus* Actinochlamydia clariae a été détectée chez le poisson-chat africain (*Clarias gariepinus*) [30].

Ces dernières années, de nombreuses bactéries dites atypiques, car distinctes des souches connues au moment de leur description, ont été identifiées grâce aux nouvelles approches d'analyses moléculaires et de séquençage [31]. Ces bactéries ont notamment été mises en évidence chez des oiseaux marins [32-34], des poissons chez lesquels des lésions ont pu être observées dans les cellules épithéliales [3], ou à partir de prélèvements environnementaux grâce à la technique de co-culture avec des amibes [10]. Ces découvertes pourraient, à terme, conduire à la description de nouvelles familles, genres et/ou espèces [35]. Cependant, en raison de leur parasitisme intracellulaire obligatoire, ces organismes restent difficiles à isoler et à caractériser.

1.1 Histoire des *Chlamydiaceae* et classification

Dans l'évolution, les ancêtres des *Chlamydiales* auraient été parmi les premiers à se séparer du tronc commun des bactéries, il y a environ 2 milliards d'années [36]. Les *Chlamydiales* dites pathogènes (*Chlamydiaceae*) se seraient ensuite séparées des *Chlamydiales* environnementales il y a environ 700 millions d'années. Chaque groupe aurait alors évolué en s'adaptant à son environnement : les *Chlamydiales* environnementales devenant plus résistantes pour s'adapter à des conditions environnementales variables, et les *Chlamydiales* pathogènes s'adaptant à la vie intracellulaire, vraisemblablement procaryote dans un premier temps, puis eucaryote. Les *Chlamydiales* environnementales conservent cependant des traits communs avec les *Chlamydiales* pathogènes, indiquant la possibilité pour ces premières de contaminer des cellules de mammifères. Les bactéries appartenant à la famille des *Chlamydiaceae*, aussi nommées *Chlamydia*, présentent un grand nombre de gènes communs avec les cyanobactéries et les plantes, laissant penser à un ancêtre commun [37, 38].

L'histoire des *Chlamydiaceae* est complexe du fait de la grande diversité d'espèces, d'hôtes et de pathologies induites existante.

Des documents archéologiques évoquent des cas de trachome, maladie due à *C. trachomatis*, dès l'Antiquité chez les Sumériens de la basse Mésopotamie ayant vécu entre 50 et 17 siècles avant Jésus Christ, en Egypte ancienne et également en Chine [39].

En 1879, Ritter est le premier à décrire une épidémie de pneumonies atypiques en Suisse chez des personnes exposées à des oiseaux tropicaux [40]. Cependant, le terme de psittacose ne sera utilisé pour la première fois qu'en 1893, après qu'un rapport soit édité faisant état de la transmission d'un agent infectieux du perroquet à l'Homme et causant un état grippal. Le nom psittacose sera choisi d'après le latin « *psittacus* » qui signifie perroquet, car l'origine de la maladie semble alors être essentiellement liée à une exposition à des Psittacidés (famille d'oiseaux comprenant notamment les perroquets et les perruches). Lors de cette épidémie, une bactérie appartenant au genre des Salmonelles a d'abord été isolée et considérée comme l'agent responsable de la maladie. Il sera démontré plus tard qu'il s'agissait en fait d'un agent opportuniste, *Salmonella typhimurium* [41].

En 1907, Halberstädter et von Prowazek observent pour la première fois des micro-organismes intracellulaires dans des inclusions au sein de cellules conjonctivales provenant d'un patient atteint de trachome. Classée parmi les protozoaires, cette famille de micro-organismes sera alors nommée *Chlamydozoaceae* selon le grec ancien « Chlamys » signifiant « manteau », dont les particules semblent être entourées. A ce moment, aucun lien n'est encore effectué avec l'agent responsable de la psittacose.

En 1930, suite à de nombreuses épidémies de psittacose en Europe et aux Etats-Unis, des souches sont finalement isolées à partir d'oiseaux malades mais également de patients [42]. Pour la première fois, un rapprochement est proposé entre l'agent responsable de la psittacose, aujourd'hui nommé *C. psittaci*, et celui responsable de la Lymphogranulomatose vénérienne (LGV) causée par *C. trachomatis* [41]. Ces micro-organismes, alors considérés comme des virus, ont été classés dans le groupe Psittacose-Lymphogranulome vénérien par Bedson en 1930 [40].

Tandis que les cas de psittacose étaient jusqu'alors liés à une exposition à des Psittacidés, des cas humains associés à un contact avec d'autres espèces aviaires ont par la suite été recensés, et les infections en lien avec les oiseaux autres que les Psittacidés ont été distinguées sous le nom d'ornithose. Des cas humains ont notamment été recensés suite à une exposition à des poulets en 1932, à des fulmars boréal en 1938 ou encore à des pigeons en 1940 [41]. Dans les années 1940, plusieurs cas humains en lien avec des canards Pékin seront également rapportés [43]. La distinction entre psittacose (maladie causée par une exposition aux Psittacidés) et ornithose (causée par une exposition à d'autres familles aviaires) s'est par la suite révélée inutile car, hormis du point de vue épidémiologique, ces deux pathologies étaient extrêmement similaires [44].

En 1934, Thygeson va, pour la première fois, attirer l'attention sur le fait que les agents du trachome et ceux du groupe psittacose-Lymphogranulomatose vénérienne se ressemblent et un rapprochement est à nouveau proposé en 1942 [45]. Il faudra attendre les années 60 pour que les agents des trois maladies (Trachome, psittacose, LGV) soient finalement regroupés par Meyer au sein du groupe Psittacose-Lymphogranulome vénérien-Trachome. Meyer proposera également le nom de *Bedsionae* pour ces micro-organismes, en rapport avec Sir Samuel Bedson, qui fût le premier à décrire le cycle de développement de ces agents en 1930.

En 1966, Moulder apporte la preuve que ces micro-organismes sont bien des bactéries et non des virus, car ils sont composés à la fois d'ARN et d'ADN et leur cycle de développement diffère de celui des virus [46]. Une nouvelle famille au sein du groupe des *Rickettsiaceae* est alors créée, les *Chlamydiaceae*, composée d'un genre unique *Chlamydia*.

En 1971, les *Chlamydiaceae* sont séparées du groupe des *Rickettsiaceae* et placées dans un ordre nommé *Chlamydiales* [47]. La famille est alors composée de deux espèces, *C. trachomatis* et *C. psittaci*, séparées selon des critères épidémiologiques (*C. trachomatis* regroupe les souches infectant l'Homme et *C. psittaci* celles infectant les animaux) et morphologiques, notamment au niveau des inclusions. De plus, *C. trachomatis* accumule le glycogène dans les inclusions ce qui n'est pas le cas de *C. psittaci*, et la plupart des souches de *C. trachomatis* sont sensibles au sulfadiazine, alors que les plupart des souches de

C. psittaci sont, au contraire, résistantes [48]. Durant les années qui suivirent, des souches ne s'apparentant à aucune de ces deux espèces seront isolées et étudiées.

A partir des années 1980, le développement des méthodes de classification reposant sur l'analyse de l'ADN va aider à préciser la classification au sein des *Chlamydiaceae* et deux nouvelles espèces vont venir agrandir la famille, à savoir *C. pneumoniae* [49] et *C. pecorum* [50].

Une grande modification dans la classification des *Chlamydiales* sera proposée en 1999 par Everett *et al.*, qui a proposé la création de cinq nouvelles espèces au sein de la famille des *Chlamydiaceae*, à savoir *C. abortus*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. muridarum* et *C. suis*, ainsi que la création de deux nouvelles familles au sein de l'ordre des *Chlamydiales* [5]. Le nombre total d'espèces au sein de la famille des *Chlamydiaceae* s'élevait alors à neuf, réparties en deux genres : *Chlamydia* et *Chlamydophila*. Cette classification, qui reposait sur l'analyse des séquences d'ADN ribosomiaux 16S et 23S, n'a pas suscité l'unanimité au sein de la communauté scientifique et a largement été critiquée [51]. En effet, celle-ci était basée uniquement sur de faibles différences de séquences au niveau de ces gènes et certaines espèces ne contenaient qu'un nombre réduit de souches. De plus, bien qu'il soit reconnu que l'analyse du gène 16S rRNA soit pertinente pour les études portant sur l'évolution, elle n'est pas forcément suffisante pour la spéciation [52]. Par ailleurs, dans cette proposition de classification, il a été arbitrairement défini que pour que deux espèces appartiennent au même genre, elles devaient présenter au moins 95 % d'homologie au niveau de ces gènes. Cependant, le maximum d'hétérogénéité existant entre les espèces *C. pneumoniae*, *C. psittaci* et *C. trachomatis* est compris entre 5 et 6 % (soit 94 % d'homologie). Les critères établis n'étaient donc pas satisfaits pour ces trois espèces. D'autre part, la répartition des espèces en deux genres distincts masquait la grande identité de ces organismes d'un point de vue biologique. Cette classification intégrant la création de deux genres au sein de la famille des *Chlamydiaceae* a été abandonnée, mais les neuf espèces pressenties ont été conservées et regroupées au sein d'un genre unique, *Chlamydia* [53].

Depuis, deux nouvelles espèces (*C. avium* et *C. gallinacea*) ainsi qu'une espèce *Candidatus* (*C. ibidis*) sont venus agrandir cette famille [54, 55].

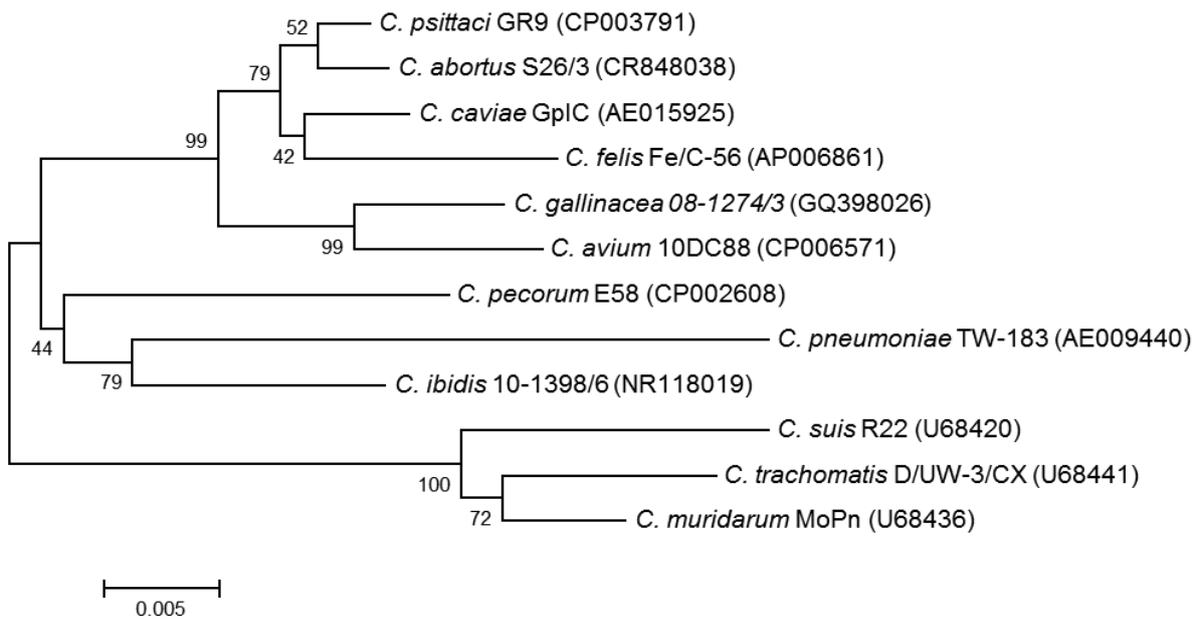


Figure 2 : Arbre phylogénétique basé sur la comparaison du gène 16S rRNA des douze espèces de *Chlamydiaceae* actuellement décrites.
(Logiciel MEGA 6, NJ method et bootstrap 500)

1.2 Les différentes espèces composant la famille des *Chlamydiaceae*

Les *Chlamydiaceae* sont de petites bactéries parasites intracellulaires obligatoires, à Gram négatif. Elles sont classées, selon l'arrêté du 18 juillet 1994 (modifié par les arrêtés des 17 avril 1998 et 30 juin 1998) fixant la liste des agents pathogènes, en classe 2 pour toutes les espèces de *Chlamydiaceae*, à l'exception de *C. psittaci* qui est de classe 3 pour les souches d'origine aviaire. Pour ces dernières, une manipulation en laboratoire confiné de type 3 est obligatoire. Un arbre phylogénétique basé sur la comparaison du gène 16S rRNA des douze espèces de *Chlamydiaceae* actuellement décrites est présenté en **Figure 2**.

- *C. trachomatis*

Cette espèce infecte principalement l'Homme, provoquant différentes infections selon le sérovar impliqué. Un sérovar représente un groupe de souches partageant les mêmes caractéristiques antigéniques. Un premier groupe de sérovarys est composé de souches de *C. trachomatis* responsables du trachome, maladie se traduisant par des infections oculaires et pouvant entraîner la cécité dans les cas les plus sévères [56]. Un second groupe rassemble les souches responsables d'infections uro-génitales, souvent asymptomatiques mais très contagieuses, qui peuvent entraîner des complications graves telle que la stérilité. Il s'agit de l'infection sexuelle la plus fréquente chez les adolescents dans le monde [57]. Une transmission verticale de ces souches de *C. trachomatis* est également possible lors de l'accouchement, provoquant alors des infections oculaires ou pulmonaires du nouveau-né [58]. Et enfin, le dernier groupe de sérovarys concerne les souches responsables de la Lymphogranulomatose vénérienne (LGV), une infection sexuellement transmissible.

- *C. pneumoniae*

C. pneumoniae est la seconde espèce dont l'hôte principal est l'Homme. La transmission de la bactérie se fait de personne-à-personne par voie aérienne et engendre des infections des voies respiratoires supérieures, souvent d'origine communautaire. L'infection est asymptomatique dans 60 à 80 % des cas [59], et on estime que plus de 50 % des individus sains sont porteurs d'anticorps spécifiques de *C. pneumoniae* [60].

Cette espèce a également été détectée chez des animaux, tels que des chevaux [61], des koalas [62] ou encore des oiseaux [63].

- *C. caviae*

C. caviae a principalement été isolée à partir de tissus conjonctivaux de cobayes. Un modèle d'infection expérimentale du tractus génital de cobayes par *C. caviae* est utilisé pour reproduire et étudier les infections à *C. trachomatis* chez l'Homme [5, 64].

Dans de rares cas, *C. caviae* pourrait être transmise à l'Homme et entraîner une pneumopathie atypique (Heijne *et al.*, données non publiées).

- *C. muridarum*

Cette espèce infecte principalement les rongeurs chez qui elle est responsable d'infections respiratoires. Les souches principales, MoPn et SFPD, ont été respectivement isolées chez des souris et des hamsters [5]. D'autres souches ont depuis été isolées (MoPn-Weiss, Nigg, Nigg2, Nigg3...).

- *C. felis*

Cette bactérie est responsable de la chlamydie féline, endémique chez le chat, et est l'agent le plus commun des conjonctivites chez cet animal. Elle peut également entraîner des rhinites, des boiteries et des problèmes de reproduction [65].

- *C. suis*

C. suis est principalement isolée chez des porcs qui hébergent le plus souvent la bactérie au niveau intestinal de façon asymptomatique. La bactérie peut également, dans certains cas, entraîner des maladies diverses parmi lesquelles des broncho-pneumonies, des arthrites, des péricardites et des problèmes de reproduction dont l'avortement [66]. Des souches de *C. suis* porteuses d'un gène de résistance à la tétracycline nommé *tetC* ont été isolées en Europe, notamment en Italie [67], en Belgique et à Chypre, ainsi qu'en Israël [68] et aux Etats-Unis [69].

- *C. abortus*

C. abortus est l'agent principalement responsable de la chlamydie abortive chez les ruminants. Les ovins sont les hôtes de choix, cependant la bactérie a également été détectée chez les caprins et les bovins. La chlamydie abortive entraîne principalement des avortements et des mortalités néonatales [70], cependant *C. abortus* peut également causer d'autres pathologies parmi lesquelles des conjonctivites, des arthrites ou des pneumonies. *C. abortus* a également pu être détectée chez d'autres espèces animales, tels que des chevaux [5], des porcs [66] ou encore des oiseaux [71]. Le potentiel zoonotique existe bien qu'il soit faible, et on recense quelques cas d'avortements chez des femmes éleveuses d'ovins [72, 73].

- *C. pecorum*

C. pecorum est une espèce principalement détectée chez les ruminants, particulièrement les bovins, et chez les porcs. Elle est communément détectée dans des fèces d'animaux sains ne présentant pas de signes cliniques et hébergeant la bactérie au niveau intestinal. Elle a de ce fait longtemps été considérée comme peu virulente. Cette espèce a cependant été associée dans certains cas à des avortements, des conjonctivites, des encéphalomyélites, des pneumonies ou encore des polyarthrites [74, 75]. *C. pecorum* a également été détectée chez des koalas, chez lesquels elle cause des troubles de la reproduction [76], ainsi que chez des oiseaux [77]. Cette espèce est très hétérogène, à la différence de *C. abortus*.

Génotype	Sous-génotype	Espèces hôte majoritaires
A	VS1 6BC 84/55	Psittacidés
B		Pigeons
C		Canards et oies
D	NJ1 9N	Dindes
E		Pigeons
F		Psittacidés et dinde (isolats uniques)
E/B	E30 06-859 KKCP	Canards
M56		Bovins
WC		Rats musqués et lièvres

Génotypes aviaires / Génotypes non aviaires

Tableau 1: Présentation des génotypes validés de *C. psittaci* et des espèces hôtes principales.

(d'après Sachse, *et al.* [78])

Génotypes proposés	Origine des isolats
1V	Corneille
6N	Corbeau
Mat116	Ara vert et perruche
R54	Labbe brun
YP84	Perruches
CPX0308	Cigogne orientale

Tableau 2 : Présentation des génotypes proposés de *C. psittaci* et de l'origine des isolats.

(d'après Sachse, *et al.* [78])

- *C. psittaci*

C. psittaci est l'espèce de *Chlamydiaceae* la plus répandue chez les oiseaux, et également celle présentant le pouvoir pathogène le plus élevé pour l'Homme parmi les *Chlamydia* d'intérêt vétérinaire. Cette bactérie, qui a été détectée chez plus de 460 espèces d'oiseaux parmi 30 ordres différents [79], est en effet responsable d'une zoonose. L'infection est nommée chlamydie aviaire chez l'animal et psittacose chez l'Homme. Il existe à ce jour neuf génotypes principaux de *C. psittaci* (sept génotypes aviaires et deux non-aviaires) présentant chacun une spécificité d'hôte et pouvant être subdivisés en sous-génotypes (**Tableau 1**). S'ajoutent six génotypes proposés établis sur la base du séquençage du gène *ompA* codant pour une protéine membranaire majeure [78] (**Tableau 2**).

Les souches de *C. psittaci* M56 et WC ont respectivement été détectées chez des bovins lors d'une épidémie d'entérite [5] et chez des rats musqués et des lièvres au Canada [80]. Il existe également des évidences de contamination par *C. psittaci* de juments victimes d'avortements [81, 82], ainsi que chez des porcs, des chiens [83], des reptiles [84] ou encore des rats de laboratoire [85]. *C. psittaci* a également été détectée dans des échantillons de semences et de lavages de prépuce de taureaux en Allemagne avec une prévalence plus importante que celle de *C. abortus* et *C. pecorum* [86].

- *C. avium*

Cette espèce, nouvellement décrite, a été isolée à ce jour principalement à partir de prélèvements collectés de pigeons mais aussi de Psittacidés. Bien qu'elle ait été isolée à partir de cas présentant des signes cliniques, la bactérie a principalement été détectée à partir de fèces d'oiseaux sains en apparence. Le portage intestinal asymptomatique semble très répandu chez les oiseaux, tandis que le potentiel zoonotique de cette nouvelle espèce reste inconnu pour le moment [54, 87].

- *C. gallinacea*

C. gallinacea est une nouvelle espèce qui a majoritairement été détectée à ce jour chez des poulets, pintades et dindes en Europe et en Asie [54, 88-92], le plus souvent chez des animaux ne présentant pas de signes cliniques. Des données récentes suggèrent une prévalence importante de cette espèce chez les volailles. La première souche de *C. gallinacea* a été isolée dans le cadre d'une investigation vétérinaire effectuée dans un abattoir français où des cas humains de pneumopathies atypiques avaient été signalés. Le potentiel zoonotique de cette espèce a été suspecté dans ce cas particulier, mais une exposition à *C. psittaci* ne peut cependant être totalement exclue du fait de l'abattage occasionnel de canards dans cette entreprise [88].

- *Candidatus C. ibidis*

Deux souches ont récemment été isolées d'ibis sacrés sauvages (*Threskiornis aethiopicus*) issus d'un groupe échappé d'un parc animalier en France. L'analyse du génome complet d'une de ces souches a permis d'établir la position particulière de celle-ci au sein de la famille des *Chlamydiaceae* [55]. Cependant, elle a été classée au rang de *Candidatus* car seuls deux isolats obtenus à partir d'oiseaux capturés sur un même site sont disponibles pour le moment.

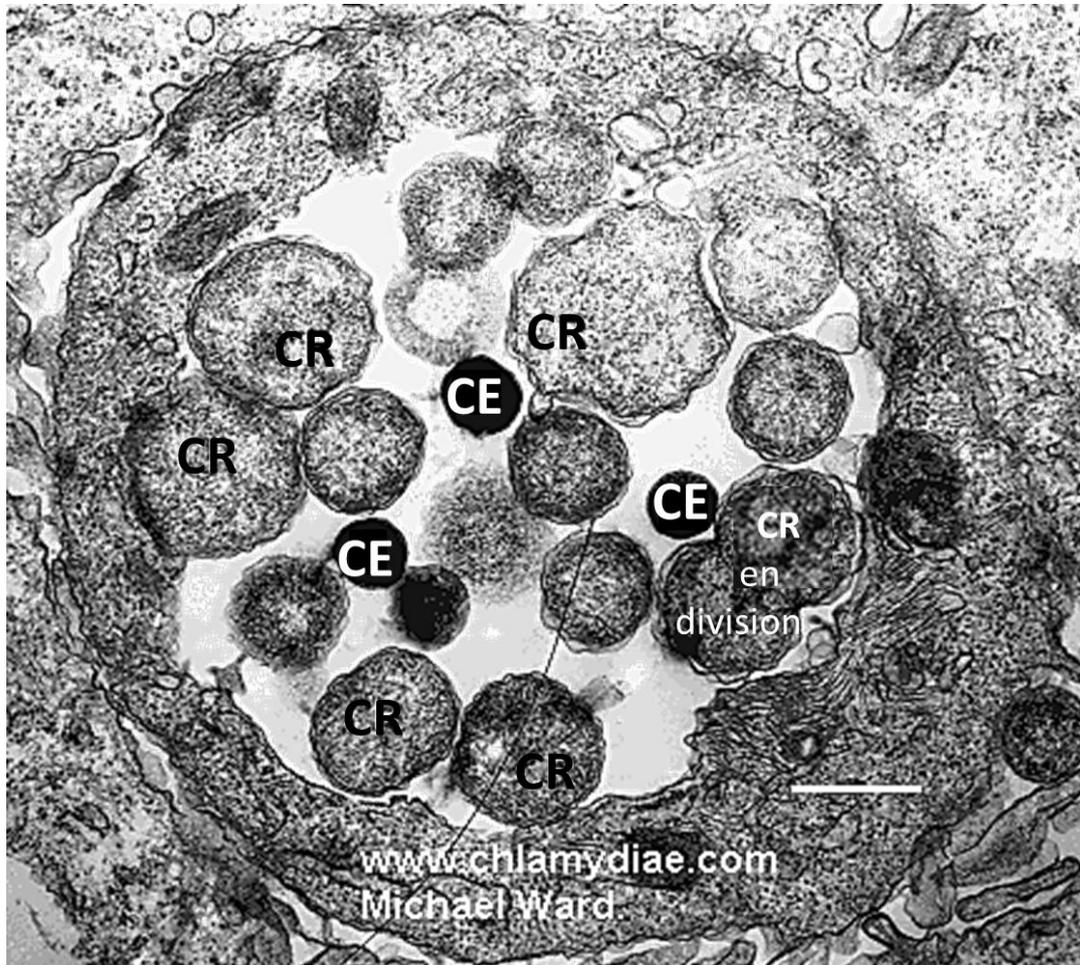


Figure 3 : Aspect microscopique d'une inclusion de *C. trachomatis* LGV 404 contenant des corps élémentaires (CE), des corps réticulés (CR) et des corps réticulés en division.

La barre représente 1 μ m.

Adapté de www.chlamydiae.com

1.3 Caractéristiques biologiques des *Chlamydiaceae*

1.3.1. *Les différentes formes biologiques de Chlamydiaceae et leurs structures*

Les *Chlamydiaceae* se présentent sous trois formes métaboliques distinctes : le corps élémentaire (CE), le corps intermédiaire (CI) et le corps réticulé (CR) (**Figure 3**).

- Le corps élémentaire (CE) : il s'agit de la forme infectieuse de la bactérie, extracellulaire et métaboliquement inactive. Le CE est immobile et sphérique, dense aux électrons, d'une taille moyenne de 0,3 μm de diamètre. Son noyau est homogène et distinctement séparé des éléments cytoplasmiques par une zone translucide [40]. La paroi est rigide et constituée d'une double membrane. La membrane extérieure est composée de phospholipides, de lipides, de lipopolysaccharides (LPS) et de protéines, dont la Major Outer Membrane Protein (MOMP) codée par le gène *ompA* et qui représente 60 % de la masse de la membrane. Les deux membranes sont reliées par des ponts disulfures créés entre les résidus de cystéine des protéines membranaires, notamment la MOMP. De par sa structure solide et sa faible perméabilité, l'enveloppe des CE est résistante à certaines agressions chimiques et mécaniques. Ils peuvent donc survivre jusqu'à plusieurs semaines à l'extérieur d'un hôte.

- Le corps réticulé (CR) : il s'agit de la forme intracellulaire et métaboliquement active. D'une plus grande taille que le CE (environ 1 μm de diamètre), il est moins condensé et plus riche en ARN. Les CR parasitent la machinerie cellulaire notamment en s'associant à l'appareil de Golgi et aux mitochondries, dans le cas de *C. psittaci* mais pas de *C. trachomatis* ou *C. pneumoniae* [93], afin de se fournir en Adénosine TriPhosphate (ATP) grâce à une ATP-translocase. Cependant, ils sont autonomes pour la production d'ADN, de protéines et de lipides. Ils se multiplient au sein de la cellule hôte par fission binaire [41].

- Le corps intermédiaire (CI) : d'une taille comprise entre 0,3 et 1 μm de diamètre, il s'agit de la forme intermédiaire des *Chlamydia*, lors de la transformation des CR en CE. Ils sont constitués d'un noyau central dense aux électrons et entouré de fibres nucléaires individuelles [40].

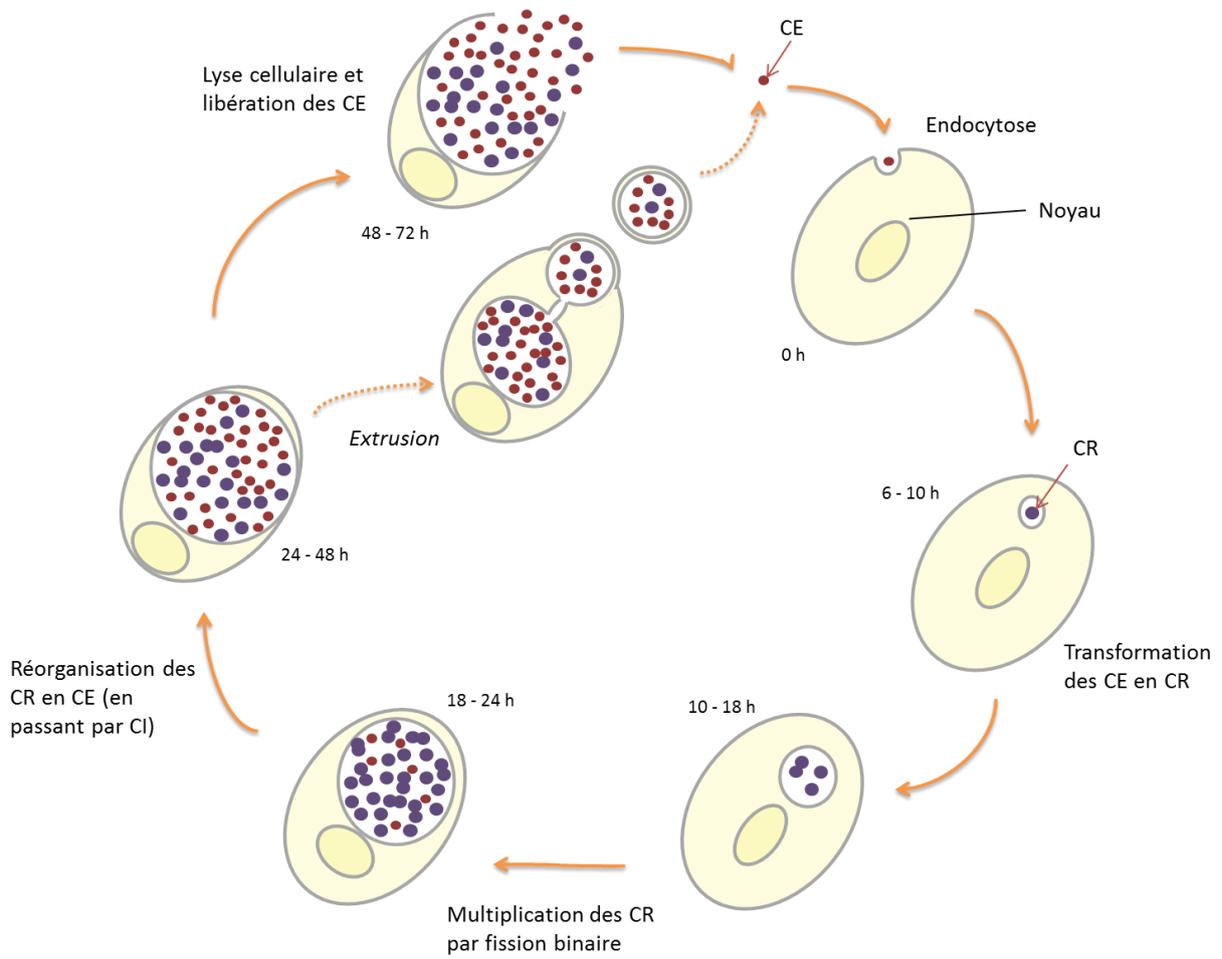


Figure 4 : Cycle de développement des *Chlamydia*.

Un débat existe depuis plusieurs décennies quant à la présence ou non de peptidoglycane (PG) chez les *Chlamydia*, un complexe composé de peptides et de polysaccharides formant un maillage qui entoure la membrane plasmidique de la majorité des bactéries. Le PG est nécessaire à la division cellulaire, permet de maintenir la forme de la bactérie et de réguler la pression osmotique, et constitue un ancrage stable pour les protéines membranaires et transmembranaires. Bien que des analyses génétiques ainsi que la sensibilité des *Chlamydia* à certains antibiotiques ciblant le PG (tels que les β -lactames) semblent démontrer la présence de ce dernier, toutes les tentatives pour le détecter ou l'isoler avaient jusqu'à présent échoué, créant ce qui fut appelé « l'anomalie *Chlamydia* ». Cependant, une part de plus en plus importante de la littérature semble s'accorder sur la présence d'une voie de biosynthèse complète du PG chez *Chlamydia*. De plus, une étude publiée en 2014 a permis de marquer le PG dans les corps intracellulaires en division de *C. trachomatis* grâce à des sondes peptidiques [94]. Cependant, même si les *Chlamydia* sont capables de synthétiser du PG, elles n'en restent pas moins uniques de par l'absence de la protéine cytosquelettique de type tubuline FtsZ, normalement nécessaire à la division des bactéries possédant un PG [95].

1.3.2. Le cycle de développement des *Chlamydiaceae*

Le cycle de développement des *Chlamydia* est biphasique et unique dans le règne bactérien, en dehors des autres espèces composant l'ordre des *Chlamydiales*. Il se déroule comme schématisé sur la **Figure 4**.

Le CE se fixe à la membrane de la cellule hôte et y pénètre par endocytose où il inhibe la fusion avec les lysosomes et autres organites endocytiques par des mécanismes encore méconnus. La chromatine se décondense et le CE se métamorphose en CR, métaboliquement actif et enfermé dans la vacuole provenant de l'endocytose nommée inclusion, dont la membrane possède une constitution différente de celle de la membrane cellulaire [96]. Après environ 10 h, les CR se multiplient par fission binaire et chaque CR peut en engendrer une centaine. La vacuole grandit à mesure que le nombre de CR augmente. Après 18 à 24 h, les CR devenus nombreux se détachent de la membrane issue de l'endocytose, ce qui semble déclencher leur transformation en CE, en passant par le stade de CI. En fin de cycle, on observe la formation de CE plus ou moins matures. La transformation des CR en CE se faisant de façon non synchronisée, on peut observer la présence simultanée des deux formes dans les inclusions. Les CE sont ensuite libérés dans le milieu extérieur par la lyse cellulaire intervenant en fin de cycle et se déroulant de façon rapide (environ 20 min en moyenne pour *C. trachomatis*). Un second mécanisme de sortie a été observé chez *C. trachomatis* et consiste à la libération d'une partie ou de la totalité des *Chlamydia* contenues dans une inclusion, à l'intérieur d'une vacuole à double membrane séparées par une faible quantité de cytoplasme. Ce mécanisme d'extrusion laisse la plupart du temps la cellule intacte, mais son déroulement est plus lent que la lyse cellulaire (environ 2 à 3 h pour *C. trachomatis*) [97]. Les CE libérés sont ensuite prêts à engendrer un nouveau cycle sur une nouvelle cellule hôte [40].

1.3.3. La persistance des Chlamydiaceae

Il a été montré dans certains cas une persistance des CR à l'intérieur de la cellule hôte avec une interruption du cycle de développement, notamment avec les espèces *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* et *C. pecorum*. Ces CR ont subi des changements métaboliques et structurels, et sont alors nommés Corps Aberrants (CA) [98]. Les CA sont plus gros que des CR, non infectieux, mais toujours viables car il est en effet possible de détecter de l'ARN ainsi que de l'ADN à partir de ces échantillons [99]. Ces CA ont notamment été mis en évidence dans le cas d'un traitement antibiotique prolongé sur un modèle *in vivo* d'infection à *C. pneumoniae* [100] et chez *C. trachomatis* avec des antibiotiques de la classe des β -lactames à des doses physiologiques. Les β -lactames ne sont pas utilisés dans le cas d'une infection à *Chlamydia*, mais sont très souvent prescrits pour le traitement de nombreuses autres pathologies bactériennes et pourraient, par ce biais, entraîner une forme persistante d'une infection sous-jacente à *Chlamydia* [101]. Une action similaire de la pénicilline a été démontrée dans le cas des souches Cal-10 (génotype E) et DC15 (génotype A) de *C. psittaci* en culture cellulaire. Dans chaque modèle, la formation de CA était réversible lorsque le traitement antibiotique était interrompu [102, 103]. Les CA présentent une résistance aux antibiotiques supérieure à celle des CR, et pourraient donc représenter une forme de résistance aux stress environnementaux.

Il a été montré *in vitro* que la présence d'interféron- γ pouvait, selon les doses, soit inhiber la viabilité de *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* et *C. psittaci*, soit entraîner la formation de CA [99, 103, 104]. De même, des CA ont été observés *in vitro* dans le cas d'un choc thermique, d'une privation en nutriments (acides aminées, fer) [103, 105, 106], d'une co-infection [107-109], d'une infection avec un phage [110], ou encore d'une infection chronique [111, 112].

Il est soupçonné que ces formes de persistance existent également *in vivo*. Lors d'infection à *C. trachomatis* chez l'Homme par exemple, il est souvent très difficile d'isoler les organismes, alors que la présence d'ADN ou d'antigènes peut être détectée. Des CA de *C. trachomatis* ont déjà été observés à partir de prélèvements endocervicaux [113] ainsi que d'éjaculats et de sécrétions prostatiques de patients atteints de prostatite chronique due à *Chlamydia*. Des corps similaires chez *C. pneumoniae* ont également été observés dans des échantillons de valves aortiques de patients atteints de sténose dégénérative. Cependant, ces observations de CA ne suffisent pas à prouver la possibilité d'une persistance *in vivo*, car leur viabilité dans ces conditions reste incertaine [114].

1.3.4. Caractéristiques génétiques des *Chlamydiaceae*

Le génome des *Chlamydiaceae* se compose d'un brin d'ADN circulaire d'environ 1 Mb et codant pour plus d'un millier de protéines [115]. A ce jour, des plasmides ont été détectés chez quasiment toutes les espèces de *Chlamydiaceae* (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. caviae*, *C. suis*, *C. felis*, *C. muridarum* et *C. pecorum*). Leur réplication est strictement liée à celle de la bactérie, et ils ne sont pas conjugatifs, c'est-à-dire qu'une bactérie ne peut pas le transférer par conjugaison à une autre. Ils ne codent pas, pour la majorité, pour des gènes de résistance et n'ont pas de capacité d'intégration [116]. Ces petites molécules d'ADN (environ 7,5 kb) ont été utilisées afin de constituer des outils de détection de *C. trachomatis*, espèce pour laquelle 7 à 10 copies de plasmides sont présentes par *Chlamydia*. Cependant, un nouveau variant de *C. trachomatis* déléte d'une portion d'ADN plasmidique incluant la zone ciblée par cet outil a échappé à la détection et a notamment été responsable d'une épidémie en Suède en 2006 [117]. L'ubiquité de ces plasmides au sein des *Chlamydia* suggère des fonctions importantes, cependant celles-ci restent pour le moment inconnues.

1.3.5. Mécanismes d'infection de l'hôte et facteurs de virulence

Les mécanismes moléculaires permettant aux *Chlamydia* de s'attacher, pénétrer puis se maintenir dans leurs cellules hôtes sont encore très peu connus, bien que de nombreuses études soient réalisées afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'adaptation de la bactérie à l'environnement intracellulaire. De nombreuses hypothèses ont été émises, impliquant des mécanismes parfois totalement différents. Cependant, étant donné la grande diversité de cellules (cellules épithéliales, fibroblastes, cellules dendritiques, macrophages...) et d'hôtes pouvant être infectés par *Chlamydia*, il est très vraisemblable que ces bactéries aient acquis durant leur évolution divers mécanismes activés en fonction de l'espèce et de la souche de *Chlamydia* impliquée, ainsi que de la cellule et de l'hôte cibles [118]. Les processus d'attachement de la bactérie à la surface et d'entrée dans la cellule semblent être bien différents et impliquent des mécanismes et des molécules distinctes [119, 120]. Il semblerait que la bactérie s'attache à la cellule hôte tout d'abord suite à un rapprochement médié par des interactions électrostatiques, puis peut-être par reconnaissance de récepteurs spécifiques présents sur la membrane cellulaire [118]. Plusieurs molécules ont été proposées comme adhésines potentielles, à savoir la MOMP, HSP70, OmcB, des glucosaminoglycanes ou encore la clathrine [121]. Il a également été suggéré que les *Chlamydia* se fixaient préférentiellement au niveau de microvillosités, migraient à leur base pour être ensuite internalisées [122].

Il semble que les *Chlamydia* se concentrent à la surface cellulaire sur des zones particulières nommées « radeaux lipidiques ». Ces domaines sont riches en cholestérol et en glycosphingolipides et pourraient être impliqués dans les mécanismes d'entrée dans la cellule hôte par agrégation de ces domaines et polymérisation de l'actine cellulaire [121].

Les *Chlamydia* possèdent un système de sécrétion de type III (T3SS) sous forme de « seringue » qui permet le transport de protéines effectrices de la bactérie au cytosol de la cellule hôte [123]. Ces T3SS sont observables sur environ la moitié de la surface de la bactérie avec une répartition non uniforme, à raison de 20 à 40 projections arrangées de façon hexagonale. Le T3SS, ainsi que les protéines effectrices associées, semblent être impliqués dans la virulence de la bactérie. Les protéines effectrices Inc ont initialement été détectées chez *C. psittaci*. Bien qu'elles présentent des séquences différentes, elles partagent en commun la présence d'un domaine bilobé hydrophobe de 50 à 80 acides aminés. Ce domaine leur assure un ancrage dans la membrane de l'inclusion, et leur extension cytoplasmique assure les interactions avec les protéines de l'hôte. Il a été montré que les protéines IncA des *Chlamydiaceae* présentaient des domaines SNARE-like, qui sont des récepteurs à des protéines SNARE de l'hôte, essentielles dans les mécanismes de fusion membranaire [124]. De plus, la protéine IncA de *C. psittaci* interagit notamment avec la protéine cellulaire G3BP1, ce qui entraîne une production moindre de protéine C-myc, facteur important de croissance cellulaire et des mécanismes d'apoptose [124]. De même, la protéine effectrice IncB interagit durant les premières heures de la formation de l'inclusion avec les dynéines, complexes protéiques associés à des microtubules, via la protéine cellulaire Snapin, apportant un indice sur l'induction de modifications du cytosquelette par *C. psittaci* afin d'amener la cellule à supporter la croissance de la bactérie [125, 126]. Les protéines Inc ont donc certainement un rôle central dans les interactions hôte-pathogène.

Il a également été démontré récemment que la protéine SINC (Secreted Inner Nuclear membrane-associated *Chlamydia* protein) excrétée par *C. psittaci* a pour cible l'enveloppe nucléaire à la fois de la cellule hôte, mais aussi des cellules saines voisines, et pourrait contribuer à la virulence sévère de *C. psittaci* [127]. Le T3SS pourrait également jouer un rôle important dans l'inhibition de la fusion des vacuoles avec les lysosomes et autres organites endocytiques [128].

La zone de plasticité (ZP) des *Chlamydia* est connue pour héberger des gènes induisant des facteurs de virulence tels que le domaine MAC/perforine, des gènes codant pour des cytotoxines ou la phospholipase D, et de nombreux autres gènes probablement impliqués dans les interactions entre la cellule hôte et l'agent pathogène. Cette zone possédant un fort indice de réorganisation génique est située à proximité de l'origine et de la terminaison de la réplication et présente une taille et une organisation très différente selon l'espèce de *Chlamydia* considérée [123, 125].

Les *pmp* (Polymorphic Membrane Protein), une grande famille de protéines probablement unique aux *Chlamydiae*, semblent constituer des facteurs majeurs de virulence, intervenant aussi bien dans l'adhésion des CE à la cellule hôte, que dans le transport moléculaire et dans les fonctions associées à la membrane cellulaire. Ces protéines sont caractérisées par un haut niveau de mutations et sont réparties en 6 sous-familles (A, B/C, D, E/F, G/I et H), la sous-famille G/I étant la plus vaste. Ces protéines sont au nombre de 21 chez *C. psittaci*, dont 14 appartenant à la sous-famille G/I, certaines étant spécifiques à *C. psittaci*. Les *pmp* possèdent toutes la même structure constituée, entre autres, d'un nombre de répétitions variable des tétrapéptides GGA(I,L,V) et FxxN [123]. Ces protéines pourraient être liées au grand spectre d'hôte de *C. psittaci* et/ou à son évolution pour s'adapter à l'environnement de l'hôte [125]. Des différences génétiques entre les gènes *pmp* des différentes souches de *C. psittaci* pourraient expliquer en partie la variabilité de tropisme et de virulence des génotypes [129].

D'autres protéines sont suspectées de représenter des facteurs de virulence, telles que les protéines de choc thermique ou HSP (Heat Shock Protein), ou la protéase CPAF (Chlamydial Protease-like Activity Factor).

1.3.6. Les bactériophages des *Chlamydiaceae*

Les bactériophages sont des virus n'infectant que les bactéries. Les bactériophages des *Chlamydiaceae* appartiennent au genre *Chlamydia*, au sein de la famille des *Microviridae*. Le premier phage de *Chlamydia* identifié et nommé Chp1 a été observé dans des CR de *C. psittaci* en 1982, isolés dans le cadre d'une épidémie de psittacose en lien avec une exposition à des canards en Angleterre [130].

Cinq autres phages ont depuis été décrits, à savoir Chp2 (isolé de *C. abortus* et d'une souche de *C. psittaci* infectant les ovins), Chp3 (*C. pecorum*), ϕ CPG1 (*C. caviae*), ϕ CPAR39 (*C. pneumoniae*) et Chp4 (*C. abortus*) [131]. Le phage Chp1 a été très peu étudié depuis sa découverte, mais des études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées sur d'autres phages de *Chlamydia*, notamment Chp2, Chp3, ϕ CPG1 et ϕ CPAR39. Ces études ont permis de mettre en évidence que ces phages étaient majoritairement lytiques [132], à l'exception de ϕ CPAR39 lorsqu'il infecte *C. pneumoniae* [133, 134].

Des travaux effectués sur le bactériophage ϕ CPG1 ont montré qu'il présentait une structure et un génome assez proche de ceux de Chp1, particulièrement concernant la protéine structurale majeure VP1. De plus, des séquences très similaires à celles du phage ϕ CPG1 infectant *C. caviae* ont été retrouvées dans le génome de *C. pneumoniae*, laissant penser que des membres d'un même groupe de phages pourraient infecter des espèces de *Chlamydia* différentes, mais également que des séquences génomiques du phage auraient la capacité de s'insérer dans le génome des *Chlamydiaceae* [135]. Une étude *in vitro* a permis de montrer que la présence du phage ϕ CPG1 pouvait entraîner une forme persistante de *C. caviae* avec la formation de CR anormaux (CA) [110]. Afin d'infecter les formes métaboliquement actives des *Chlamydia* (ce qui leur est nécessaire pour leur développement), les bactériophages auraient la capacité de se lier aux formes extracellulaires (les CE) et ainsi de pénétrer dans la cellule hôte pour y infecter les CR métaboliquement actifs. Cela entraînerait la formation de CA qui seraient le siège de la multiplication du virus, puis seraient lysés. Le virus se propagerait alors aux autres *Chlamydia*. Bien que les CR infectés deviennent métaboliquement moins actifs, la lyse de la cellule hôte entraînerait la dispersion dans l'organisme du contenu cellulaire, ce qui pourrait entraîner une réponse inflammatoire accrue et expliquer la survenue de symptômes plus importants en présence du bactériophage à l'échelle de l'hôte. Cependant, l'infection des CR par le phage pourrait également être à l'origine d'un « équilibre » expliquant les infections chroniques ou latentes [110]. Une seconde étude réalisée sur cobaye a d'ailleurs permis de mettre en évidence que le phage ϕ CPG1 se multipliait *in vivo* et diminuait la réponse inflammatoire entraînée par une infection à *Chlamydia* chez l'animal [132].

Le phage Chp2 retarde les cycles de développement de *C. abortus* en bloquant la division des CR et en empêchant la transformation des CR en CE [136], et le phage ϕ CPAR39 entraîne également la formation de CA de *C. pneumoniae* [133].

1.4 Les infections à *Chlamydia* chez les oiseaux

Les oiseaux peuvent être infectés principalement par trois espèces de *Chlamydia*, à savoir *C. psittaci*, longtemps considérée comme la seule espèce à tropisme aviaire, et les deux espèces récemment décrites *C. avium* et *C. gallinacea*. La présence d'autres espèces de *Chlamydia* telles que *C. pecorum* [77], *C. pneumoniae* [63] et *C. abortus* [71] a cependant été observée de façon anecdotique chez des oiseaux.

1.4.1. *Les infections à C. psittaci*

L'infection causée par *C. psittaci* a longtemps été nommée psittacose car les Psittacidés étaient les principaux vecteurs de l'infection. Des cas survenus en lien avec d'autres familles d'oiseaux ont ensuite conduit à l'utilisation du mot ornithose pour les infections impliquant des oiseaux autres que les Psittacidés. Les travaux menés par la suite ont abouti à la conclusion que ces différentes pathologies étaient dues à un même micro-organisme. Désormais, le nom usuel de la maladie animale est plutôt chlamydie aviaire [44].

1.4.1.1. *Pathogénie*

C. psittaci peut être à la fois détectée chez des animaux sains et des animaux présentant des symptômes, cependant les infections asymptomatiques représentent la majorité des cas. Les animaux porteurs excrètent la bactérie de façon intermittente dans les fèces et les sécrétions respiratoires.

La période d'incubation de *C. psittaci* chez l'animal peut varier de trois jours à plusieurs semaines [137]. Le portage de la bactérie est principalement intestinal [138] et les organes les plus touchés lorsque l'infection se développe sont ceux du système respiratoire, bien que l'ensemble des organes tels que la rate, le foie ou les poumons puissent être contaminés en cas de dissémination.

Le développement de l'infection peut être induit par un stress, incluant une mauvaise nutrition, une densité d'animaux trop élevée, une manipulation des animaux ou une co-infection. Dans ce dernier cas, les symptômes et l'excrétion de *C. psittaci* seraient le plus souvent exacerbés. En effet, des études ont évoqué cette hypothèse à plusieurs reprises, comme chez la dinde dans le cas d'une co-infection avec *Escherichia coli* [139] ou avec un pneumovirus [140], mais également chez des perroquets avec un adénovirus [141, 142], chez des perruches avec un reovirus [143], chez des canaris en présence d'un parasite [144] et enfin chez des volailles co-infectées par le virus de la variole aviaire [145], par un pneumovirus ou encore par *Ornithobacterium rhinotracheale* [146]. Mais il pourrait également arriver que la présence d'une co-infection masque la présence de *C. psittaci*, notamment car cette première serait plus facile à mettre en évidence [147].

Peu d'infections expérimentales à *C. psittaci* ont actuellement été menées, celles existantes ayant principalement été réalisées sur des dindes [140, 148], des Psittacidés [149] et des poulets [150, 151]. D'une manière générale, toutes les infections expérimentales ont montré une augmentation de l'excrétion et/ou de la contamination des organes par *C. psittaci* au cours du temps jusqu'à un plateau, puis une diminution.

Deux études ont été menées respectivement sur des poussins SPF [152] et des œufs de poules SPF [153] lors desquelles les animaux ont été infectés par voie respiratoire pour les poussins et par injection pour les œufs, soit avec *C. psittaci* soit avec *C. abortus*. Ces deux études ont menées à des conclusions similaires, à savoir que 1/ l'infection à *C. psittaci* est généralement plus sévère qu'une infection à *C. abortus*, 2/ *C. psittaci* se dissémine plus et plus rapidement dans les organes internes, 3/ la transcription de certains gènes tels que *groEL*, *incA* ou *cpaf* est plus importante dans le cas d'une infection à *C. psittaci* et 4/ *C. psittaci* échappe plus efficacement aux réponses immunes de l'hôte que *C. abortus*.

Récemment, une infection expérimentale a été menée sur des canetons Mulard. Trois groupes de canetons ont été infectés oralement avec des doses variables d'un inoculum de *C. psittaci* (génotype E/B). Dans chacun de ces lots, 7/41 animaux ont été inoculés uniquement avec du PBS et laissés en contact du reste du groupe. Un groupe totalement inoculé par du PBS a servi de témoin. Cette infection expérimentale a montré 1/ que la contamination par voie orale entraînait une infection systémique avec la détection de *C. psittaci* dans l'ensemble des organes, particulièrement le cæcum, le foie, et la rate mais sans symptômes ni lésions, 2/ que la colonisation des organes atteignait un plateau au bout de quelques jours dépendamment de la dose infectieuses puis diminuait et 3/ que les animaux témoin laissés au contact des animaux infectés présentaient un niveau d'infection équivalent lors de leur euthanasie à 10 jours post-infection [154].

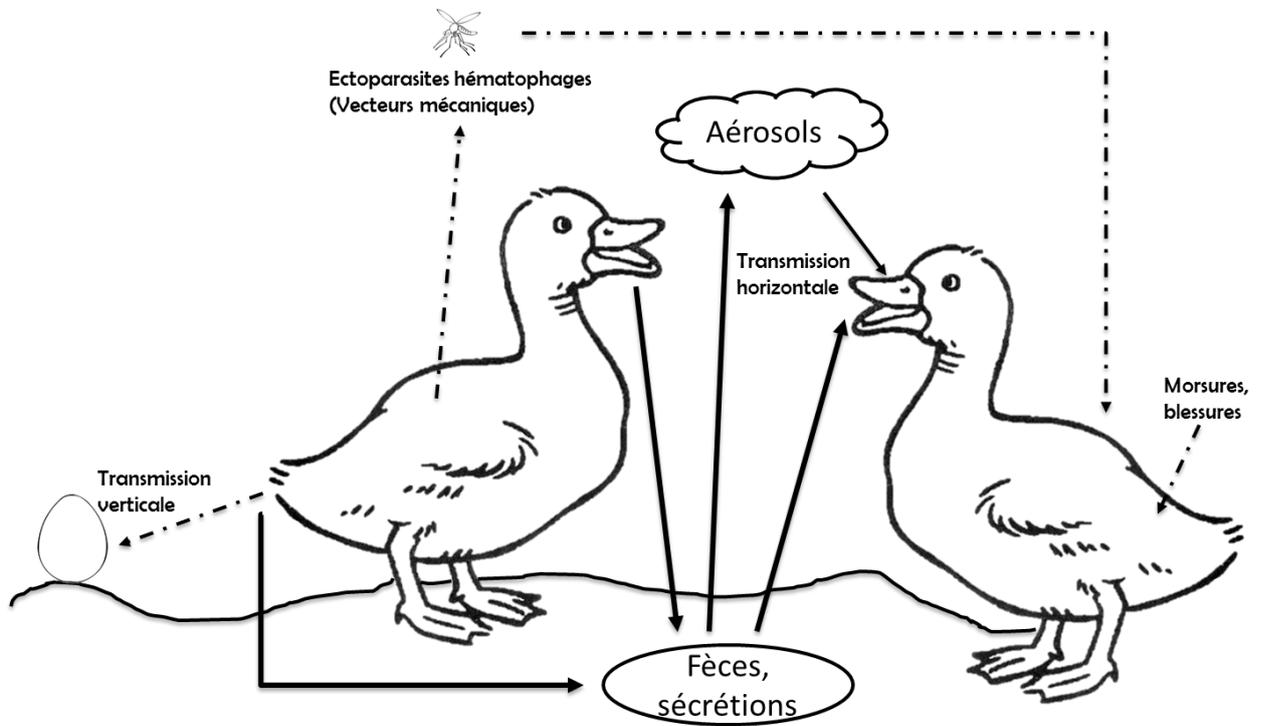


Figure 5 : Schéma des différentes voies de transmission de *C. psittaci* chez l'animal.

1.4.1.2. Voies de transmission

La transmission entre les animaux se fait majoritairement de façon horizontale par le biais d'aérosols contaminés et par voie orale (**Figure 5**). Théoriquement, certaines espèces de *Chlamydia* et *C. psittaci* ciblent le tractus gastro-intestinal chez tous leurs hôtes, incluant les mammifères et les oiseaux, et sont ensuite transmises via la voie orale-fécale [138, 154, 155]. Une étude menée en 2010 dans des élevages de canards a conduit à l'hypothèse d'une contamination de ces oiseaux via l'environnement, par ingestion de matériel contaminé par les lots précédents ayant partagés les mêmes parcours. Il a en effet été montré que *C. psittaci* pouvait rester viable jusqu'à plusieurs mois dans les fèces excrétées dans l'environnement (voir 1.4.1.6.) et l'excrétion chez les canards suivis n'a été mise en évidence que pour les lots qui avaient accès à un parcours herbeux extérieur. Le seul lot qui s'est révélé négatif sur l'ensemble du suivi était un lot mis en place dans un bâtiment neuf avec accès à un parcours inutilisé jusqu'alors [156].

Il a été montré qu'un passage de la bactérie des voies respiratoires aux plumes était possible durant la toilette [79]. La transmission au sein du nid l'est également, de par la régurgitation pour certaines espèces ou par souillure du nid par les fientes. Les morsures et plaies peuvent également être une voie d'entrée pour la bactérie [40]. On estime que certaines espèces d'oiseaux sauvages pourraient constituer des réservoirs naturels en étant porteurs de la bactérie et excréteurs, sans présenter de symptômes [34]. Ils pourraient ainsi contribuer à la contamination des parcours ouverts dans le cas d'élevages de volailles domestiques, par exemple. Une transmission est possible par le biais d'ectoparasites hématophages (tels que les arachnides, les poux et les mites), mais ils semblent plutôt constituer un vecteur mécanique qu'un réel réservoir [44].

La transmission verticale a été démontrée chez la dinde [157], le poulet [158, 159], le canard [160], la mouette et les Psittacidés [44]. Cependant, il semble que la majorité des embryons infectés ne survivent pas [44]. Les petits infectés et survivants pourraient être porteurs à bas bruit et constituer des réservoirs. Une excrétion précoce chez ces jeunes pourrait contribuer à contaminer l'environnement et favoriser la transmission intra-lot [156].

Espèces d'oiseaux	Pays	Types de prélèvements	Méthode de détection	Prévalence	Référence
Pigeons	11 pays d'Europe	Selon étude	Sérologies (Selon étude)	19,4 % - 95,6 %	[161]
			PCR	3,4 % - 50 %	
Pigeons	Pays-Bas	Fèces	PCR	7,9 %	[162]
Pigeons	Suisse	Ec cloacaux et pharyngés	PCR	8,4 %	[163]
Pigeons	Chine	Sérums	ELISA	10 %	[164]
		Ec pharyngés	Immunofluorescence	26,7 %	
Pigeons	Thaïlande	Ec cloacaux et trachéaux	PCR	10,8 %	[165]
Pigeons	Japon	Fèces	PCR	22,9 %	[77]
Pigeons	Pologne	Ec cloacaux et pharyngés	PCR	6,6 %	[166]
Pigeons symptomatiques	Iran	Sang	PCR	17,8 %	
		Muscle	PCR	5,6 %	[167]
		Foie	PCR	15,6 %	
Pigeons	Iran	Ec pharyngés	PCR	0,7 %	[168]
Pigeons, Canaris, Phasianidés, Psittacidés	Albanie	Sang	Immunofluorescence indirecte et PCR pour les positifs douteux	9,2 %	[169]
Psittacidés	Costa-Rica	Ec cloacaux et pharyngés	PCR	3,4 %	[170]
Psittacidés	Costa-Rica	Sérums	ELISA	12,4 %	[171]
Psittacidés	Pologne	Ec trachéaux	PCR	10,3 %	[172]
Psittacidés	Slovénie	Ec cloacaux	Immuno-dosage	15,2 %	[173]
Psittacidés	Brésil	Ec cloacaux et trachéaux	PCR		
		Sérums	FC	24,7 %	[174]
Psittacidés	Brésil	Sérums	FC		
		Ec cloacaux	PCR	65,4 %	[175]
Psittacidés	Brésil	Ec cloacaux	Immunofluorescence directe	31,7 %	[176]
		Sérums	ELISA	82,5 %	
Psittacidés	Chine	Sérums	Hémagglutination indirecte	35,4 %	[177]
Divers (principalement Psittaciformes et Ciconiiformes)	Japon	Ec cloacaux, fèces, organes ou sang	PCR	5,6 %	[178]
Oiseaux migrateurs (principalement Anseriformes et Laridae)	Suède	Fèces, Ec cloacaux	PCR	1,2 %	[179]
Oiseaux captifs (principalement Psittaciformes)	Slovénie	Ec cloacaux et pharyngés	PCR	2,4 %	[180]
Oiseaux de Zoos (131 espèces)	Japon	Ec cloacaux	PCR	7,2 %	[84]
Rapaces	Suède	Ec cloacaux	PCR	1,3 %	[181]
Oiseaux marins (principalement Charadriiformes et Suliformes)	France	Ec cloacaux	PCR	11,8 %	[34]
Oies	Chine	Sérums	Hémagglutination indirecte	25,6 %	[182]
Canards Mulard	France	Ec cloacaux et conjonctivaux	PCR	58 %	[2]
Canards Mulard	France	Ec cloacaux et conjonctivaux	PCR	58 %	[183]
Canards Pékin et de Barbarie (reproducteurs)	France	Ec conjonctivaux	PCR	15 %	[160]

Tableau 3 : Sélection de résultats d'études de prévalence de *C. psittaci* chez les oiseaux.

1.4.1.3. *Epidémiologie*

Il a été montré que plus de 460 espèces d'oiseaux appartenant à 30 ordres différents étaient sensibles à une infection à *C. psittaci*. L'ordre des Psittaciformes est l'ordre le plus touché avec environ 45 % d'espèces sensibles [79]. La bactérie a pu être détectée chez des oiseaux divers présentant ou non des symptômes à travers le monde. Différentes études de prévalence ont été réalisées sur différentes espèces d'oiseaux, conduisant à des résultats variables. Une sélection de résultats obtenus est présentée dans le **Tableau 3**. Les études ont été principalement menées sur les pigeons, pour lesquels la prévalence varie de 0,7 % à 95,6 %, et sur les Psittacidés pour lesquels les prévalences varient de 3,4 % à 82,5 %.

La chlamydie aviaire est importante de par les problèmes de santé publique humaine qu'elle entraîne, mais aussi, dans une moindre mesure, par les pertes économiques importantes qu'elle peut engendrer dans les filières avicoles (saisies de carcasses en abattoir, chute de ponte, mortalités et frais vétérinaires). Les données disponibles proviennent essentiellement d'études de terrain et/ou d'investigations menées suite à des signalements de cas humains. Bien que la majorité des animaux ne présentent pas de symptômes, on observe parfois l'apparition de cas cliniques, notamment chez des dindes qui semblent les plus touchées en Europe et particulièrement en Allemagne et en Belgique où l'infection semble endémique avec une morbidité pouvant aller jusqu'à 80 % [184, 185]. Une étude menée en France et en Belgique sur des dindes a permis de détecter des infections à *C. psittaci* dans l'ensemble des trois fermes suivies en cinétique, en association avec des problèmes respiratoires chez les animaux suivis [146]. En Belgique l'infection des poulets par *C. psittaci* semble également assez répandue [186].

En France, l'infection des dindes est sporadique [139], et les poulets semblent beaucoup plus infectés par *C. gallinacea* que par *C. psittaci*, bien que des cas de portage aient été décrits [187]. Le canard Mulard semble être l'espèce la plus concernée, des études démontrant une prévalence importante, la bactérie ayant été détectée chez plus de la moitié des animaux testés [1, 2, 183].

1.4.1.4. *Tableau clinique*

La majorité des oiseaux infectés ne présentent pas de signes cliniques et hébergent donc la bactérie de façon asymptomatique. Cette notion de portage a tout d'abord été évoquée dans les années 30, lorsque des scientifiques se sont rendus compte que la prévalence de l'agent de la psittacose (alors considéré comme un virus) était importante chez les oiseaux de compagnie, mais qu'ils ne présentaient pour autant pas tous des symptômes. Ainsi, des hôtes exposés au même micro-organisme réagissaient de façons totalement différentes [188].

Cependant, dans le cas d'une extériorisation, différents symptômes peuvent être observés avec une intensité variable en fonction de la souche impliquée, de la charge bactérienne, de l'éventuelle présence d'une co-infection ainsi que de la sensibilité de l'hôte et des facteurs de stress auxquels l'oiseau a été exposé [184].

En général dans les cas cliniques, la chlamydie aviaire est décrite comme provoquant des symptômes «pneumo-entériques » avec signes respiratoires, déchargement nasal purulent, diarrhée, polyurie et léthargie [41]. De la fièvre, de l'anorexie et un état de choc entraînant la mort peuvent également être observés [40]. Les fientes peuvent être jaune-verdâtres, traduisant une haute concentration en pigments biliaires.

Des lésions macroscopiques et histopathologiques peuvent être observées, cependant celles-ci ne sont pas spécifiques. Le plus souvent, une augmentation de la taille de la rate et du foie est observée, avec une inflammation et éventuellement la présence d'ecchymoses hémorragiques et de nécroses ponctuelles à la surface de ces organes. Une infection des alvéoles pulmonaires ainsi qu'une congestion pulmonaire peuvent également être observées [41].

De manière générale chez les Psittacidés, il existe trois formes d'infection [156] :

- La forme suraigüe traduite par une atteinte rapide de l'état général de l'animal entraînant la mort dans les heures qui suivent,
- La forme aigüe classique avec des symptômes généraux, digestifs et respiratoires. Il arrive que l'animal meure en 8 à 10 jours mais la guérison est possible,
- La forme subaigüe ou chronique avec une prédominance de symptômes respiratoires et oculaires et un état général faible. L'animal peut succomber dans les 3 à 4 semaines, mais peut également vivre en étant porteur de la bactérie (infection chronique).

On observe généralement un tableau clinique complet chez les perroquets et les macaos, parfois accompagné de troubles du système nerveux central. Les cacatoès présentent souvent des conjonctivites et des kerato-conjonctivites ainsi que des urates jaunes. En plus de tous ces symptômes, les perruches peuvent présenter des sinusites. L'incidence de la maladie sur les canaris et les pinsons semble faible, même s'ils peuvent occasionnellement présenter des problèmes respiratoires ainsi que des conjonctivites [41, 144].

Chez le canard, l'infection est très majoritairement asymptomatique et souvent découverte suite à la survenue de cas humains. Cependant, il est arrivé par le passé que des canards infectés par *C. psittaci* présentent des tremblements d'intensités variées, une démarche instable, des décharges nasales séreuses à purulentes, une dépression et un abattement, ainsi que des conjonctivites [189].

Le pigeon est principalement porteur sain de la bactérie, cependant une extériorisation est possible lors d'une co-infection notamment. Les symptômes sont principalement respiratoires, parfois accompagnés d'une baisse de performance de vol. Les pigeons peuvent également présenter des infections chroniques se traduisant par des boiteries, torticolis, opisthotonos (contracture généralisée), convulsions et tremblements [41].

Les poulets semblent relativement résistants à *C. psittaci* et la majorité des infections sont asymptomatiques. Les infections aiguës, qui se traduisent par des signes cliniques associés à de la mortalité, n'apparaissent généralement que chez les jeunes individus. Les symptômes observés sont conjonctivites, halètements intermittents, perte de poids et faible augmentation du taux de mortalité [41].

Enfin, chez les dindes, il est possible d'observer des pneumonies, des aérosacculites ou encore des péricardites [190], ainsi qu'un ébouriffement des plumes, de la dépression, de l'anorexie, de la cachexie, et une diarrhée légère accompagnée de fèces jaunes [41]. Les glandes nasales latérales sont rapidement infectées et peuvent le rester pendant 60 jours [40].

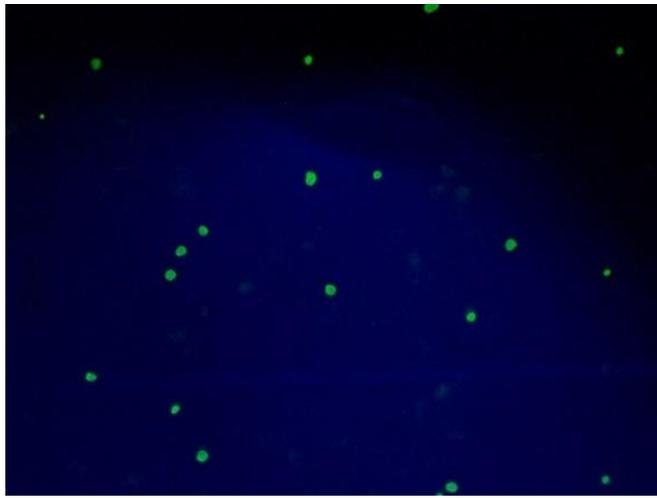


Figure 6 : Coloration par immunofluorescence directe (kit commercial IMAGEN Chlamydia, Thermo Scientific) d'un tapis de cellules BGM infectées par *C. psittaci*. Les inclusions sont colorées en vert. Observation au grossissement x 200.

1.4.1.5. Diagnostic

Le diagnostic d'une infection à *C. psittaci* chez un oiseau se fait par le biais de la détection et/ou de l'isolement de l'organisme, ou par analyse sérologique.

1.4.1.5.1. Prélèvements

Chez les animaux vivants, les écouvillons sont les prélèvements de choix, avec la réalisation le plus souvent d'un écouvillon cloacal ou pharyngé, mais aussi trachéal, des choanes ou conjonctival. Un prélèvement sanguin peut également être effectué, ainsi que des prélèvements de fèces, des grattages conjonctivaux ou des exsudats péritonéaux. Il est important de conserver les prélèvements dans de bonnes conditions afin de préserver la viabilité des bactéries. Il a été montré qu'un milieu sucrose/phosphate/glutamate (SPG) initialement développé pour les Rickettsies était adapté au transport des échantillons pour la conservation des *Chlamydia* avant analyse.

Chez les animaux morts, une autopsie est pratiquée et les tissus de choix sont le foie, les poumons, la rate ou encore les intestins.

1.4.1.5.2. Coloration directe

Il est possible d'utiliser des colorations afin d'observer, par un examen direct, les inclusions ou les différentes formes biologiques de *C. psittaci*. Cependant, ces techniques sont assez peu sensibles et sont aujourd'hui très peu utilisées. Les colorations les plus couramment utilisées sont la coloration de Giemsa, de Gimenez, de Stamp et de Macchiavello.

1.4.1.5.3. Culture et isolement

Les *Chlamydiaceae* sont des bactéries parasites intracellulaires obligatoires. La culture sur œuf embryonné et la culture cellulaire sont les deux principales techniques utilisées.

La culture sur œuf consiste à injecter l'inoculum dans le sac vitellin d'un œuf embryonné de 6 à 7 jours et exempt d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS). Le développement de la bactérie entraîne le plus souvent la mort de l'embryon dans les 3 à 10 jours. La membrane vitelline contenant les *Chlamydia* est alors collectée et analysée [191]. Si la mort de l'embryon n'a pas lieu, jusqu'à deux passages peuvent être réalisés avant de déclarer un échantillon comme étant négatif.

Une autre méthode consiste à cultiver les *Chlamydiaceae* sur un tapis cellulaire. Pour cela, plusieurs lignées cellulaires peuvent être utilisées, par exemple la lignée Buffalo Green Monkey (BGM) ou la lignée de McCoy [184]. Les cellules sont cultivées en monocouche et l'inoculation des *Chlamydia* est favorisée par une centrifugation lente. Les inclusions de *Chlamydia* peuvent ensuite être colorées par immunofluorescence directe faisant apparaître les inclusions en vert grâce à l'application d'un antisérum conjugué à de la fluorescéine sur le tapis cellulaire infecté (**Figure 6**). Avant de mettre en culture ces prélèvements, aussi bien sur œufs que sur cellules, il est nécessaire de les traiter avec des antibiotiques n'affectant pas les *Chlamydiaceae* tels que la streptomycine, la vancomycine et la kanamycine [192].

Ces techniques coûteuses demandent du temps, de l'expertise et nécessitent la manipulation en structure confinée de type 3 pour l'espèce *C. psittaci*. De plus, l'isolement des souches nécessite une bonne conservation des échantillons durant le transport et jusqu'à leur traitement. Ces techniques sont le plus souvent réalisées uniquement dans les laboratoires de référence.

Les travaux actuels s'attachent à développer un milieu de culture axénique pour les *Chlamydiaceae* afin de faciliter leur étude biologique en s'affranchissant des « interférences » cellulaires [193, 194].

1.4.1.5.4. Méthodes de détection sérologiques

Les tests sérologiques peuvent reposer sur la détection d'anticorps ou d'antigènes.

Les méthodes de détection sérologiques reposant sur la détection des anticorps permettent de rechercher la présence d'Immunoglobulines de type G (IgG) et/ou d'Immunoglobulines de type M (IgM), la présence des premiers démontrant qu'un contact avec l'agent infectieux s'est déjà produit et la présence des seconds traduisant un contact récent et donc probablement une infection en cours. Certains tests reposant sur la recherche des immunoglobulines indifféremment du type, il n'est pas toujours possible de savoir s'il s'agit d'une infection récente ou ancienne. Des résultats faussement négatifs peuvent être observés si les tests sont effectués avant l'apparition de la séroconversion, et un traitement antibiotique peut réduire voire masquer complètement la réponse immune. Peu de tests commerciaux sont disponibles, la plupart des méthodes ayant été développées par des laboratoires de recherche. Les tests existants présentent une sensibilité et une spécificité peu satisfaisantes, car il existe des réactions croisées dans la détection des antigènes des différentes espèces de *Chlamydiaceae*.

La Fixation du Complément (FC) est la seule méthodologie pour laquelle il existe une norme AFNOR (NF U47-007). Ce test repose sur la détection des anticorps anti-*C. psittaci* dans un sérum issu d'un oiseau. Le complément, composé d'un ensemble de protéines, est ajouté au sérum à tester en présence d'un antigène. Si des anticorps spécifiques sont présents dans le sérum, ils se fixent à l'antigène et captent le complément ajouté. La seconde étape consiste à ajouter au milieu un système hémolytique composé d'anticorps et d'hématies qui va interagir avec le complément si celui-ci est resté libre dans le milieu et alors entraîner une lyse visible des hématies (sérum négatif), ou bien celles-ci vont rester intactes si le complément a été capté par le complexe antigène/anticorps, n'entraînant aucune lyse (sérum positif).

Des méthodes d'Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) initialement développées pour la détection de *C. trachomatis* chez l'Homme ont été transposées pour le diagnostic de la chlamydie aviaire. Un antigène est fixé sur un support et mis en présence de l'échantillon. Si le complexe anticorps-antigène se forme, une fluorescence due à un anticorps secondaire est alors détectée. Ces tests étaient assez peu spécifiques et généraient souvent des résultats faussement positifs, bien que les kits aient été améliorés ces dernières années et que des tests internes plus élaborés aient été développés dans certains laboratoires de recherche. Chez un animal présentant des signes cliniques, un résultat fortement positif en ELISA permet cependant d'orienter le diagnostic, alors que pour un oiseau ne présentant pas de symptômes, un résultat positif en ELISA indique seulement la nécessité de répéter l'analyse [192].

Un ELISA utilisant des antigènes spécifiques de la protéine Pgp3, codée par le gène plasmidique ORF 3 commun à la plupart des espèces de *Chlamydiaceae*, a été développé et s'est montré plus spécifique que la FC ainsi que d'autres tests ELISA. Cette protéine hautement antigénique pourrait représenter une cible de choix dans l'élaboration de tests diagnostic, à la fois pour l'animal mais aussi pour l'Homme [195]. D'autre part, Rahman *et al.* ont mis au point un set de peptides permettant, par le biais d'une analyse de type ELISA, de tester des sera vis-à-vis de neuf espèces de *Chlamydiaceae* (*C. gallinacea* et *C. avium*, récemment décrites, n'ont pas été incluses). Ce système est très sensible et spécifique de l'espèce, voire du type pour *C. suis*, *C. pecorum*, *C. trachomatis* et *C. psittaci* [196].

L'immunofluorescence indirecte peut être utilisée à la fois pour la détection d'anticorps et d'antigènes. Dans les deux cas, la technique implique la formation d'un complexe antigène-anticorps marqué par un second anticorps couplé à un fluorochrome. Une seconde technique de détection des antigènes utilisée pour le diagnostic de la chlamydie aviaire est l'immunofluorescence directe (IFD), basée sur la détection directe de l'antigène recherché grâce à un anticorps couplé à un fluorochrome.

D'autres outils ont également été développés dans le cadre de la recherche, tel que le test d'immunodiffusion sur gel d'agar, la technique d'agglutination au latex ou encore la technique d'agglutination des CE, mais sont très rarement utilisés ou uniquement dans les laboratoires de recherche les ayant développés (diffusion restreinte).

Spécificité	Gène ciblé	Nom des amorces et sondes	Références
<i>Chlamydiales</i>	16S rRNA	panCh16F2/panCh16R2/panCh16S	[197]
	23S rRNA	TQF/TQR/probe	[198]
<i>Chlamydiaceae</i>	23S rRNA	CHL23SUP/CHL23DN/CHL23LCR	[199]
	23S rRNA	Ch23S-F/Ch23S-R/Ch23S-p	[200]
<i>C. psittaci</i>	incA	F1-incA-Cpsi/R1-incA-Cpsi/Cpsi-incA-NM	[201]
	ompA	CppsOMP1-F/CppsOMP1-R/CppsOMP1-S	[202]
	ompA	CPsittF/CPsittR/CPsitt Probe	[203]

Tableau 4 : Sélection de systèmes de PCR en temps réel existants et spécificité.
(adapté de Sachse, *et al.* [204])

1.4.1.5.5. Méthodes de détection des acides nucléiques

Les techniques de PCR ont petit à petit remplacé les méthodes d'isolement car elles présentent l'avantage d'être plus rapides et de s'affranchir en partie du risque biologique, les échantillons étant inactivés avant d'être testés [137]. De plus, la grande stabilité de l'ADN rend possible l'analyse de prélèvements mal conservés. La PCR conventionnelle consiste à amplifier une séquence ciblée grâce à des amorces, puis à visualiser cette amplification après migration sur gel d'agarose. Cette technique peut égaler la sensibilité de l'isolement par culture. La PCR en temps-réel repose quant à elle sur l'amplification d'une séquence d'ADN donnée grâce à des amorces spécifiques et mesurée tout au long de la réaction, grâce à une sonde couplée à un fluorochrome ou à un agent intercalant. Cette technique permet d'obtenir de façon rapide une courbe de cinétique d'amplification et de déterminer la quantité d'ADN initialement présente grâce à l'utilisation d'une gamme d'ADN de concentration connue. Elle est devenue la méthode de diagnostic de choix ces dernières années pour sa rapidité et sa sensibilité supérieure à celle de la PCR conventionnelle.

Il existe à ce jour différents systèmes d'amplification pour la détection par PCR des *Chlamydiaceae* et plus spécifiquement des souches aviaires. Des kits commerciaux ont principalement été développés dans le cadre de la détection de *C. trachomatis*, les systèmes disponibles pour *C. psittaci* et les autres souches aviaires ont été développés par des laboratoires de recherche et sont disponibles dans les publications ou textes de référence. De ce fait, la comparaison des spécificités et des limites de détections de ces différents systèmes n'est pas disponible. Une sélection de systèmes de PCR en temps réel couramment utilisés pour la détection de *C. psittaci* est présentée dans le **Tableau 4**.

1.4.1.5.6. Typage de *C. psittaci*

Les méthodes de typage des souches de *C. psittaci* ont évolué ces 20 dernières années. Le typage des souches de *C. psittaci* était initialement réalisé par immunofluorescence à l'aide d'anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement des épitopes de la MOMP (sérotypage). Cette technique avait permis de mettre à jour six sérovars aviaires (A à F) et deux sérovars non aviaires (M56 et WC) [205, 206]. Suite au développement des techniques de biologie moléculaire, la PCR RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) a permis, par le biais d'une PCR conventionnelle en amplifiant le gène *ompA* puis en le digérant avec deux enzymes de restriction séparément (*AluI* et *MboII*), de générer des profils de restriction corrélés avec les résultats de sérotypage [207]. Un séquençage partiel ou total du gène *ompA* est ensuite venu compléter les connaissances et un nouveau génotype a été proposé (E/B) [208].

Une puce à ADN (ou micro-array) reposant sur l'hybridation entre une séquence du gène *ompA* et une sonde marquée a été mise au point. Cette technique a initialement été développée pour le typage de l'ensemble des espèces composant la famille des *Chlamydiaceae* [200] et a ensuite été plus précisément développée pour le typage de *C. psittaci*. A l'aide de cette puce permettant de tester simultanément un grand nombre

d'échantillons, six potentiels nouveaux génotypes ont été proposés (1V, 6N, Mat116, R54, YP84, CPX0308) ainsi que des sous-génotypes pour les génotypes A, D et E/B [78] (voir **Tableau 1**).

Les techniques de MLVA (Multi-Locus VNTR Analysis) puis de MLST (Multi-Locus Sequence Typing) ciblant d'autres régions que le gène *ompA* ont ensuite été développées. La technique MLVA repose sur l'analyse des VNTR (Variable Number of tandem repeats) ou minisatellites. Les VNTR sont des séquences composées d'une petite suite de nucléotides (moins de 100 pb) répétée en tandem un nombre variable de fois. L'étude des VNTR permet de mieux différencier les souches bactériennes entre elles.

La technique MLST repose quant à elle sur l'analyse de séquences d'ADN codant pour des gènes de ménage, c'est-à-dire des gènes qui sont toujours exprimés, sans mécanismes de régulation. Dans le cas de *Chlamydia*, sept gènes de ménage sont utilisés, à savoir *enoA*, *fumC*, *gatA*, *gidA*, *hemN*, *hflX* et *oppA*. Cette méthode avait initialement été proposée pour le typage de *C. trachomatis* [209]. Les méthodes MLVA et MLST sont complémentaires et ont permis de mettre en évidence une association entre les génotypes de *C. psittaci* et les espèces hôtes [210].

La diminution des coûts de séquençage tend à remplacer les méthodes précédemment listées, et permet dorénavant d'avoir accès à l'ensemble du génome des souches [211]. A ce jour, 28 génomes complets de souches de *C. psittaci* sont disponibles [125].

Les différentes souches de *C. psittaci* présentent des virulences variées selon l'espèce hôte, l'individu infecté et les facteurs de stress [212]. La virulence des souches varie entre les génotypes, mais semble également pouvoir différer entre les souches d'un même génotype [148]. D'une manière générale, les souches les plus virulentes semblent être :

- Celles appartenant au génotype A (infectant particulièrement les Psittacidés et les dindes) [148, 213, 214],
- Celles appartenant au génotype D, particulièrement présentes chez les dindes [150, 215], bien qu'une étude ait montré que deux souches de ce même génotype présentaient des virulences tout à fait opposées [148],
- Celles appartenant au génotype C, principalement hébergées par les canards, avec une virulence pouvant être tantôt très forte ou tantôt très faible [212].

Au contraire, les souches appartenant aux génotypes B et E semblent engendrer des infections moins prononcées [215]. Cependant, quelle que soit leur virulence, toutes les souches semblent se répandre de la même façon au sein d'un lot [213].

1.4.1.6. *Survie et résistance de C. psittaci*

C. psittaci est sensible à beaucoup de désinfectants [212]. Il est par exemple possible d'utiliser de l'ammonium quaternaire dilué au 1/1000^e, du Lysol® 1 %, ou encore une solution fraîche diluée au 1/32^e d'eau de Javel. Cependant, la plupart des désinfectants sont irritants pour les voies respiratoires, il est donc nécessaire de les utiliser dans des zones ventilées et il est recommandé de ne pas les mélanger [137]. *C. psittaci* est relativement sensible à la chaleur, notamment à une chaleur humide à 121°C pendant au moins 15 min, ou à une chaleur sèche de 160-170°C durant au minimum 1 h [212]. Cette bactérie est cependant résistante aux basses températures et à la dessiccation. En effet, une étude réalisée en 2006 a montré que *C. psittaci* pouvait survivre 15 jours sur une surface sèche [216].

Il a été évoqué que l'infectiosité de *C. psittaci* pouvait persister jusqu'à deux mois dans la nourriture de canaris, jusqu'à huit mois dans la litière de volaille et jusqu'à deux à trois semaines sur les surfaces dures et dans la paille [217]. La température pourrait avoir un effet sur l'infectiosité de *C. psittaci*, comme cela a été étudié pour *C. trachomatis*. En effet, *C. trachomatis* a été cultivée sur œufs puis a été conservée à +4°C et -70°C. L'infectiosité de *C. trachomatis* a chuté de plus de 80 % au-delà de 48 h à +4°C puis a continué à diminuer. A -70°C, une chute initiale a également été observée, mais le taux s'est ensuite stabilisé dans le temps [218]. De plus, il a été montré qu'une activité métabolique des CE de *C. trachomatis* à l'extérieur d'une cellule hôte était possible pendant un temps significatif à 37°C, si le milieu comportait les nutriments nécessaires [219].

1.4.1.7. *Traitement*

De manière générale, en cas de signes cliniques, les animaux peuvent être traités à l'aide d'antibiotiques appartenant à la famille des tétracyclines, principalement la doxycycline qui est mieux absorbée et qui est éliminée plus lentement par l'organisme que les autres antibiotiques de cette famille [137]. Le traitement doit être long en raison de la durée du cycle de multiplication de la bactérie et une concentration d'antibiotique dans le sang supérieure à 1 µg/mL durant toute sa durée semble être optimale pour un traitement efficace [41]. Les antibiotiques peuvent être administrés dans l'eau de boisson, dans la nourriture, par voie orale ou encore par voie intraveineuse. Il est important de considérer que les oiseaux malades ne s'abreuvent et ne s'alimentent pas forcément correctement, la voie orale ou intraveineuse devant donc être privilégiée durant les premiers jours du traitement [137]. Il a été observé qu'un traitement antibiotique n'éradiquerait pas systématiquement l'infection et engendrerait parfois un effet bactériostatique. L'animal présenterait alors un portage chronique de la bactérie et/ou l'infection serait masquée, ce qui entrainerait une excrétion retardée dans le temps [220].

1.4.1.8. Prophylaxie

Les principales mesures préventives à respecter afin d'éviter la dissémination de *C. psittaci* sont le contrôle des oiseaux lors des importations et leur mise en quarantaine, à savoir 45 jours dans le pays d'origine suivis de 30 jours dans le pays destinataire. Il est judicieux de ne pas mélanger les lots d'animaux ainsi que les espèces aviaires.

En élevage, le respect de règles simples d'hygiène peut suffire à limiter la transmission de la maladie : respect des vides sanitaires, nettoyage des bâtiments et du matériel d'élevage, isolement des animaux à traiter, etc.

Il n'est pas souhaitable d'utiliser les antibiotiques en prophylaxie, car cela pourrait engendrer l'apparition de souches résistantes de *C. psittaci* comme cela a été observé chez des souches porcines de *C. suis* ayant acquis un gène de résistance à la tétracycline. L'utilisation préventive des antibiotiques pourrait également entraîner l'émergence de souches résistantes d'autres bactéries présentes dans l'organisme [137].

Il n'existe pas, à ce jour, de vaccin commercialisé contre la chlamydie aviaire. Des études expérimentales ont été menées sur un vaccin utilisant un ADN plasmidique exprimant la protéine MOMP qui a induit une réponse immunitaire chez la dinde [221], ainsi que chez la perruche [149]. Plus récemment, des études ont montré que l'antigène spécifique du gène *pmpD* pourrait représenter un bon candidat pour l'élaboration d'un vaccin, aussi bien chez *C. trachomatis* [222] que chez *C. psittaci* [223]. Le gène *pmpD* est le moins variable de la famille des *pmp*, aussi bien au niveau des séquences nucléotidiques que protéiques, et possède un fragment N-terminal accessible en surface. De plus, tout comme pour la MOMP, les anticorps spécifiques de l'antigène *pmpD* sont neutralisants. En effet, ces anticorps entraînent une neutralisation de l'infectivité de *C. trachomatis in vitro* en empêchant l'attachement des CE à leurs cellules cible [222]. Récemment, une équipe a mis au point un vaccin recombinant HVT (HerpesVirus of Turkeys) exprimant le gène *pmpD*-N codant pour la partie N-terminale du gène *pmpD*. L'utilisation de ce vaccin génétiquement modifié sur des poulets EOPS infectés avec la souche CB7 de *C. psittaci* a montré une diminution de l'excrétion pharyngée et des lésions macroscopiques chez ces animaux. De plus, le vaccin HVT recombiné reste efficace contre sa cible initiale, le virus de la maladie de Marek (MDV) [223]. Ces travaux représentent une avancée importante dans la recherche d'un vaccin contre *C. psittaci*, et également un espoir pour les autres espèces de *Chlamydia*.

1.4.1.9. *Règlementation*

La chlamydie aviaire était précédemment classée dans la liste B de l'OIE en tant que maladie transmissible considérée comme importante du point de vue socio-économique et/ou sanitaire au niveau national et dont les effets sur le commerce international des animaux et des produits d'origine animale ne sont pas négligeables. Elle était également par le passé reconnue comme Maladie Réputée Contagieuse (MRC) selon le décret du 13 juillet 1937, mais fut supprimée lors de l'abrogation de celui-ci. Elle a depuis été ajoutée en 2006 à la liste des Maladies à Déclaration Obligatoire (MDO) pour toutes les espèces aviaires. Elle a été classée comme danger sanitaire de deuxième catégorie pour les espèces animales, catégorie qui regroupe les dangers sanitaires d'intérêt collectif réglementés ou devant faire l'objet d'un signalement à l'OIE ou à la Commission Européenne, selon l'arrêté du 29 juillet 2013.

1.4.2. Les infections à *C. avium*

L'espèce *C. avium* a, jusqu'à ce jour, été principalement détectée chez des pigeons, ainsi que chez des Psittacidés. En France, une étude menée sur des pigeons urbains a mis en évidence la présence de *C. avium* dans 2/125 échantillons positifs vis-à-vis des *Chlamydiaceae* par PCR [87]. Une étude similaire menée en Allemagne a permis de détecter des *Chlamydia* atypiques dans 19,5 % des échantillons positifs, et *C. avium* a pu être précisément identifiée dans quatre de ces échantillons [224]. En Allemagne également, 4/27 (14,8 %) lots de pigeons testés lors d'une troisième étude se sont révélés positifs à cette nouvelle espèce [54]. Enfin en Thaïlande, des prélèvements effectués sur des pigeons sauvages ont permis de mettre en évidence la présence de *C. avium* chez l'un d'entre eux [165].

La prévalence chez les Psittacidés n'a pu être établie car seuls quelques cas ont été rapportés à ce jour. Le portage de la bactérie semble être principalement asymptomatique, mais son pouvoir pathogène ne peut être écarté, notamment dans le cas d'une co-infection avec *C. psittaci*. En Allemagne, des cas cliniques liés à *C. avium* chez des Psittacidés ont été observés, avec une mortalité associée [54]. La bactérie a été détectée dans les fèces ou dans les tissus d'oiseaux malades. La détection de cette espèce est très récente, les données disponibles sont donc très réduites en termes de données épidémiologiques, d'impact sur les élevages ou encore de diversité.

La détection par PCR en temps réel de *C. avium* est réalisée en première intention avec un système ciblant le gène 23S rRNA tels que décrits en **Tableau 2**, puis l'identification est réalisée grâce à un système spécifique de cette espèce [225].

1.4.3. Les infections à *C. gallinacea*

Jusqu'à présent, *C. gallinacea* a principalement été détectée à partir de fèces issus de poulets, mais également de dindes, de pintades et plus rarement de canards et de pigeons [226]. Cette bactérie semble très prévalente chez les volailles en Europe et en Asie, où la présence de cette espèce s'avère être même parfois supérieure à celle de *C. psittaci* [90, 226]. Le pouvoir pathogène de cette nouvelle *Chlamydiaceae* reste inconnu car la majorité des animaux hébergeant cette bactérie ne présente aucun signe clinique. Cependant, il est possible que cette espèce participe à l'apparition de symptômes notamment en association avec *C. psittaci* [54]. Comme pour *C. avium*, les données disponibles sur cette espèce récemment décrite sont peu nombreuses. Des systèmes de détection par PCR en temps réel spécifiques de *C. gallinacea* ciblant les gènes *enoA* et 16S rRNA ont été publiés et sont utilisés, pour identification, après une première étape de détection à l'aide d'une PCR ciblant le gène 23S rRNA [90, 187].

1.5 Les infections à *C. psittaci* chez l'Homme

1.5.1. *Voies de transmission*

La transmission de l'animal à l'Homme se fait principalement par l'inhalation d'aérosols contaminés provenant de fientes, de sécrétions respiratoires ou de salive, y compris via les plumes et les tissus d'oiseaux infectés. Même une brève exposition à l'agent pathogène peut suffire à provoquer une infection. La contamination par contact bouche-bec est également possible bien que rare [137], de même que la morsure par un animal contaminé [40]. La possibilité d'une contamination par voie percutanée a été évoquée [227]. Cependant, le contact direct avec un animal contaminé n'est pas la seule voie de contamination. En effet, les activités en plein air ou encore de jardinage peuvent également être à risque, notamment lors de la tonte du gazon sans bac de récupération qui aérosolise des bactéries présentes dans l'environnement, comme cela a été rapporté en Australie [228, 229].

La transmission inter-humaine a été suspectée à plusieurs reprises lors de cas groupés, par exemple dans un cadre familial au Japon [230] où la transmission entre deux sœurs a été soupçonnée, la première ayant été en contact avec des perroquets et étant déjà atteinte de fibromyalgie. En Ecosse [231], trois membres d'une même famille ainsi qu'un membre du personnel médical ont été infectés au contact d'un patient, et aux Etats-Unis l'infection par *C. psittaci* d'une patiente a été confirmée suite à l'exhumation de son père mort quelques jours plus tôt [232]. En Suède également, une forte suspicion de contamination inter-humaine a récemment été évoquée suite à une exposition à des fientes issues d'oiseaux sauvages. Les investigations épidémiologiques et sérologiques menées ont suggéré qu'un patient sévèrement malade ait pu être à l'origine de l'infection détectée chez dix autres personnes [233, 234].

1.5.2. *Epidémiologie*

Bien que les souches de *C. psittaci* présentent des virulences différentes *in vitro* et *in vivo*, tous les géotypes peuvent potentiellement infecter l'Homme. La prévalence de la psittacose chez l'Homme est difficile à estimer du fait d'un recensement souvent très incomplet des cas, la maladie n'étant pas à déclaration obligatoire dans tous les pays (dont la France), mais aussi en raison d'un diagnostic difficile à établir (symptômes non spécifiques, tests sérologiques disponibles peu satisfaisants, prélèvements non effectués ou trop tardivement) ou d'infections asymptomatiques ou discrètes, ces dernières ne nécessitant pas forcément de suivi médical.

Les premières observations de la transmission d'un agent pathogène de Psittacidés à l'Homme datent de la fin du 19^{ème} siècle. En effet, en 1879, une épidémie a été rapportée suite à une exposition à des oiseaux tropicaux en Suisse. En 1893, la transmission à l'Homme d'un agent infectieux provenant du perroquet a été rapportée à Paris [41].

Dans les années 1929-1930, de nombreuses épidémies de psittacose ont été recensées en Europe et aux Etats-Unis, majoritairement en lien avec des Psittacidés mais pas seulement [235]. Entre 1930 et 1938, 174 cas de psittacose ont été rapportés des îles Féroé. Le taux de mortalité était alors de 20 %, atteignant même les 80 % lorsqu'il s'agissait de femmes enceintes. Ces cas ont été attribués à la capture de jeunes fulmars et à leur préparation pour la consommation, ces jeunes fulmars s'étant eux-mêmes probablement contaminés auprès de perroquets [40]. En 1939, une mère et sa fille habitant New-York pourraient avoir développé une psittacose suite au contact avec un pigeon sauvage infecté qu'elles avaient recueilli [161]. Ce n'est que dans les années 1950 que l'importance des volailles dans la transmission de *C. psittaci* est devenue évidente suite à un nombre important de cas humains en lien avec une exposition à des volailles infectées [41, 235, 236].

Des cas de psittacose sont recensés partout dans le monde : aux Etats-Unis entre 1985 et 1995, 1 132 cas ont été recensés par le Center for Disease Control and Prevention (CDC). Entre 1988 et 2003, ce nombre s'élevait à 935 [137]. Mais il apparaît que ces chiffres sont probablement sous-estimés et que l'incidence de la psittacose pourrait être plus importante. En Asie, des cas ont notamment été rapportés à Hong-Kong en lien avec une exposition à des perroquets, mais également en lien avec des poulets et des oies achetés sur des marchés d'animaux vivants [142, 237], à Taiwan suite à une exposition à des cacatoès [238], au Vietnam [239] et au Japon [230] avec des perroquets également. Un cas de co-infection chez un patient a été observé en Asie [237]. Ce patient, infecté par *C. psittaci* via un perroquet, présentait également une infection au virus de l'influenza A. En Océanie, d'importantes épidémies communautaires ont été recensées en Australie, dans la province de Blue Mountains [229, 240] et également à Victoria chez des personnes travaillant au contact de volailles [241, 242]. Enfin, les recensement de cas en Europe sont également nombreux, avec par exemple des cas rapportés au Royaume-Uni suite à un cours pratique pour vétérinaires en 1980 ou suite à un contact avec des canards en abattoir en 1985 [220, 243], en Hongrie chez des personnes travaillant en abattoirs de volailles en 2005 [244], en Slovaquie avec le décès de la propriétaire d'une boutique d'oiseaux [245], en Allemagne dans un élevage mixte (canard, oies et poulets) en 2005 ainsi que dans un élevage de canards en 2007 [246, 247], aux Pays-Bas suite à une foire avicole en 2007 [248], dans une clinique vétérinaire après un cours pratique avec des perroquets [249] et chez trois patients en choc septique et nécessitant une intubation [250], en France également lors d'une exposition-vente d'oiseaux exotiques en 2008 [251] ou en lien avec des volailles [187, 252-255], en Belgique avec trois cas humains liés à des pigeons et dont le diagnostic fut difficile à établir en 2010 [256] et chez un couple et leur fille ayant récemment acquis un tourterreau en 2013 [257], en Ecosse dont la source est inconnue en 2011 [231], et enfin en Suède avec plusieurs cas recensés en 2013 pour lesquels la source exacte de contamination reste également floue [233, 234].

En France, des cas sont régulièrement rapportés, souvent en rapport avec une exposition avec des Psittacidés, des pigeons ou encore des canards [252-255, 258], mais parfois aussi

suite à une exposition à d'autres volailles. En effet, suite à l'hospitalisation de plusieurs personnes ayant manipulé des poulet infectés, des investigations ont été menées et ont soulevé l'hypothèse d'une contamination de ces poulets par *C. psittaci* suite à leur passage sur des parcours précédemment occupés par des canards [187].

Entre 2005 et 2013, le Centre National de Référence (CNR) pour les infections à *Chlamydia*, qui assure une surveillance passive, a recensé 177 cas de psittacose sur notre territoire (92 cas certains, 56 probables et 29 possibles). Entre 2002 et 2008, le Programme Médicalisé des Systèmes d'Information (PMSI) a recensé 207 cas hospitalisés avec un diagnostic principal lié ou associé à une psittacose [259].

1.5.3. *Tableau clinique*

La période d'incubation chez l'Homme varie en général de 5 à 14 jours, mais des périodes plus longues ont été rapportées [137].

Les symptômes généraux peuvent aller d'un simple état grippal incluant fièvre, frissons, maux de tête, anorexie, mal de gorge et photophobie pour les cas les plus légers, à une pneumonie atypique se traduisant par une toux non productive et des difficultés et/ou douleurs respiratoires pour les cas les plus sévères. Des diarrhées, nausées et vomissements peuvent également intervenir en début d'infection. Moins couramment, on peut observer des endocardites, des myocardites et/ou des complications rénales. Des cas d'encéphalites, de méningites et de myélites ont également déjà été décrits [41], ainsi que des lymphomes oculaires [137]. A la radiographie, les poumons présentent une infiltration. L'atteinte pulmonaire peut être sous-estimée à l'auscultation [137]. Le taux de mortalité est aujourd'hui très faible si le diagnostic et le traitement sont effectués suffisamment tôt, mais avant l'utilisation de l'antibiothérapie celui-ci avoisinait les 15-20 % [137]. Des cas fatals sont cependant encore à déplorer, souvent chez des personnes atteintes par d'autres pathologies qui peuvent affaiblir le patient et ses défenses immunitaires (par exemple un cancer ou une myélofibrose) et constituer une cause aggravante (comme le diabète ou l'asthme) [228, 233, 234, 239, 240, 244, 255, 260].

1.5.4. *Diagnostic*

Le diagnostic de la psittacose chez l'homme repose principalement sur des analyses sérologiques en association avec un tableau clinique. Les méthodes de coloration directe, de culture et d'isolement de la bactérie, et de détection des acides nucléiques présentées en 1.4.1.4. peuvent également être utilisées. Le diagnostic est difficile, surtout si le contact du patient avec un oiseau n'est pas ou pas assez clairement signalé suite à l'établissement de l'anamnèse. La réalisation d'une radiographie pulmonaire permet souvent de déceler une opacification diffuse du parenchyme pulmonaire qui abonde dans le sens d'une infection à *C. psittaci* en la présence d'autres symptômes évocateurs.

1.5.4.1. *Prélèvements*

Les prélèvements classiquement utilisés pour le diagnostic de la psittacose sont des sérums appariés afin de mettre en évidence une séroconversion. La bactérie peut également être isolée ou détectée à partir d'expectorations, de lavages broncho-alvéolaires, de liquides pleuraux et de sang coagulé durant la phase aiguë de l'infection et avant la mise en place d'un traitement antibiotique. Cependant, ces prélèvements sont invasifs et donc rarement réalisés, au profit d'une sérologie.

1.5.4.2. *Méthodes de détection sérologiques*

Auparavant, la méthode de choix pour le diagnostic de la psittacose était la FC. Aujourd'hui, la technique de Micro ImmunoFluorescence (MIF), plus sensible que la FC, est principalement utilisée. Des kits commerciaux permettent de détecter et différencier les anticorps dirigés contre trois espèces de *Chlamydia* (*C. psittaci*, *C. pneumoniae* et *C. trachomatis*) produites sur membranes vitellines ou culture cellulaire. Les kits sont composés de spots correspondants à des cultures de chacune de ces trois espèces, ainsi que d'un spot correspondant à une culture non infectée, permettant de comparer les intensités de réaction et de s'affranchir au maximum des réactions croisées entre les espèces de *Chlamydiaceae*. Il est également possible d'utiliser des systèmes ELISA, ou le test commercialisé RecomLine, un test immunoenzymatique sur membrane à base d'antigènes recombinants (MOMP, OMP2, TARP, CPAF, HSP60 et YwbM) pour la détection des IgG et des IgA spécifiques de *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* et *C. psittaci*.

1.5.4.3. *Analyse de risque et définitions de cas*

Une analyse de risque consiste à identifier les dangers (dans ce cas une contamination de l'Homme par *C. psittaci*), évaluer les risques associés (c'est-à-dire la probabilité que ce danger se produise) et déterminer les moyens appropriés pour éliminer et/ou maîtriser ces risques.

Les définitions des différents cas de psittacose (confirmé, probable) sont décrites par le CDC [137].

Un patient est considéré comme un cas confirmé si le tableau clinique est compatible avec l'infection et si le cas a été confirmé en laboratoire par une des méthodes suivantes :

- Isolement de *C. psittaci* à partir de prélèvements respiratoires ou du sang ;
- Mise en évidence d'une augmentation du titre d'IgG anti-*C. psittaci* avec un facteur supérieur ou égal à 4 entre les sérums appariés espacés de 2 à 4 semaines par les techniques de FC ou de MIF.

Un patient est considéré comme un cas probable si le tableau clinique est compatible avec la psittacose et si l'un au moins des résultats de laboratoire suivants est présent :

- Un titre en IgM supérieur ou égal à 32 dans au moins un sérum effectué après l'apparition des symptômes ;
- La détection d'ADN de *C. psittaci* à partir d'un prélèvement respiratoire par PCR.

L'INRS donne cependant une définition un peu différente dans son guide EFICATT (Exposition Fortuite à un agent Infectieux et Conduite à Tenir en milieu de Travail) (visible sur le site de l'INRS : <http://www.inrs.fr/eficatt/eficatt.nsf/%28allDocParRef%29/FCCHLAMYDOPHILA?OpenDocument>)

Un patient est considéré comme un cas confirmé si l'une au moins des conditions suivantes est respectée :

- Recherche directe de *C. psittaci* positive par PCR ou par isolement ;
- Observation d'une séroconversion ou d'une augmentation du titre d'IgG avec un facteur supérieur ou égal à 4 entre les sérums appariés.

Un patient est considéré comme un cas probable si l'un au moins des résultats de laboratoire suivants est présent :

- Détection d'IgM ;
- Détection d'un titre d'IgG supérieur ou égale à 128.

Ces définitions de cas peuvent être adaptées en fonction des situations, mais on considère en général, tout comme le préconise l'INRS, qu'une détection de *C. psittaci* par PCR en temps réel en présence de symptômes évocateurs confirme la présence de la bactérie et donc d'une infection active en cours.

1.5.4.4. Méthodes d'analyse de la contamination aérienne

Dans la majorité des cas, l'Homme se contamine via l'inhalation d'aérosols contaminés. Il est donc important d'avoir des méthodes permettant d'évaluer la contamination aérienne à *C. psittaci*. Pour cela, deux types de prélèvements principaux sont utilisés, à savoir les prélèvements d'air, ou les prélèvements de poussières. De manière générale pour les bactéries, les prélèvements d'air sont mis en culture sur des géloses. Cette méthode ne s'applique cependant pas à *C. psittaci* qui est une bactérie parasite intracellulaire obligatoire. Il est donc nécessaire dans ce cas de récupérer les bactéries pour ensuite les mettre en culture sur œufs embryonnés ou cellules, ou bien détecter l'ADN de la bactérie par PCR. Van Droogenbroeck *et al.*, ont évalué différents milieux pour les prélèvements d'air dans le but d'évaluer la contamination à *C. psittaci*. Il s'est avéré que la méthode la plus efficace était une impaction sur un milieu semi-liquide [261].

Les prélèvements de poussières sont notamment utilisés dans les filières avicoles pour la détection d'agents pathogènes tels que des Salmonelles et s'effectuent grâce à des chiffonnettes ou pédichiffonnettes qui sont utilisées respectivement pour récupérer la poussière sur les murs et surfaces ou sur le sol. Les poussières sont ensuite remises en suspension et mises en culture ou utilisées pour une détection par PCR.

1.5.5. *Traitement*

Les cas légers à moyens peuvent être traités avec de la doxycycline par voie orale (100 mg toutes les 12 h) ou par tétracycline hypochloride (500 mg toutes les 6 h) avec une durée minimale de traitement de 10 jours [137]. Pour les cas plus sévères, le traitement est effectué avec de la doxycycline par voie intraveineuse (4,4 mg/kg/jour en deux injections sans dépasser 100 mg par dose) pendant 10 à 14 jours après la baisse de la fièvre. Les patients ne pouvant pas être traités par tétracycline (enfants de moins de 8 ans, femmes enceintes et personnes présentant une allergie à cet antibiotique) peuvent recevoir des macrolides. Le traitement préventif aux antibiotiques n'est généralement pas utilisé mais peut être envisagé dans certains cas [137]. Dans les cas les plus sévères, il peut arriver que la mise en place d'un système d'oxygénation par membrane extracorporelle (ECMO) soit nécessaire [237, 253].

1.5.6. *Règlementation et prévention*

Les souches aviaires de *C. psittaci* sont considérées comme des agents biologiques de groupe 3 selon la directive européenne 2000/54/CE concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail. Cela signifie que ces agents biologiques peuvent provoquer une maladie grave chez l'Homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs, qu'ils peuvent également représenter un risque de propagation dans les collectivités mais qu'il existe généralement des prophylaxies ou des traitements efficaces.

La psittacose n'est pas une maladie à déclaration obligatoire en France, elle est cependant inscrite sur la liste des maladies professionnelles indemnifiables depuis 1988. Seules les infections cliniques avec sérologie de confirmation sont prises en compte, le nombre de cas par an évalué par ce biais est donc probablement sous-estimé. De 2005 à 2014, 24 cas ont été recensés par la MSA (Mutualité sociale agricole) chez les salariés non agricoles. Le nombre de cas recensés par ce biais chez les salariés agricoles est de 46 depuis 2000, dont 10 cas en 2003 (communication personnelle de Gaëtan Deffontaines, Médecin du travail à la caisse centrale de la MSA). Il n'y a pas de système de surveillance actif pour la psittacose, le CNR des infections à *Chlamydia* situé à Bordeaux effectuant une surveillance passive et non exhaustive des infections à *C. psittaci*.

Afin de limiter les risques d'infection, il est important de sensibiliser les personnes étant en contact régulier avec des oiseaux ou leurs sécrétions, dans le cadre professionnel (via l'entreprise) ou privé (via le vétérinaire), particulièrement les personnes immuno-déficientes. Une plaquette d'information a notamment été éditée par la MSA dans ce but (Visible sur le site de l'INMA : http://www.inma.fr/files/file/zoonoses/ornithose_fichezoo.pdf).

La mise en place de protections collectives et le port d'Equipements de Protection Individuelle (EPI), notamment de masques ventilés ou à filtration (pas de masque chirurgical, inutile dans ce cas de figure), de gants, de blouses et de charlottes sont fortement recommandés. Les animaux au contact du public doivent être surveillés et régulièrement testés. Les personnes amenées à manipuler ces bactéries ou des animaux infectés en laboratoire doivent respecter l'obligation de manipuler en système confiné de type 3 avec le port d'EPI réglementaires.

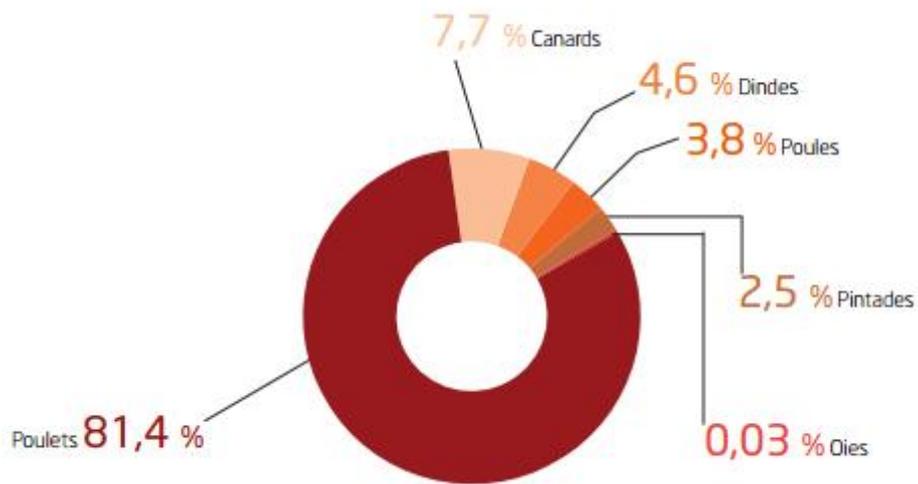


Figure 7 : Répartition des différentes espèces de volailles pour la production de viande [262].

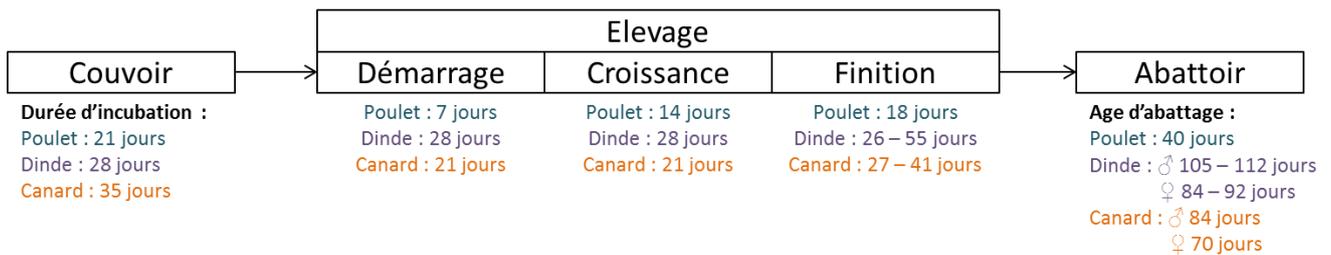


Figure 8 : Production des volailles de chair.
(d'après Guérin [263], Thierry [264])

2. Description des filières avicoles en France

Les filières avicoles en France sont séparées en trois grandes catégories : la volaille de chair, pour la consommation de viande, la volaille de ponte, pour la production d'œufs et d'ovo-produits, et les palmipèdes gras utilisés pour la production du foie gras.

2.1 Les volailles de chair

La France était le premier producteur européen de volaille de chair en 2013, avec 35 à 40 % de la production exportée [265]. La production est répartie sur l'ensemble du territoire, mais 65 % des abattages sont réalisés dans les régions Pays-de-la-Loire et Bretagne. Parmi les six espèces utilisées pour la production de viande de volailles, le poulet est largement majoritaire et représente 80 % de la production, devant le canard et la dinde (**Figure 7**).

La France se place ainsi au quatrième rang de la production européenne de poulets avec un total d'environ 1,15 millions de Tonnes Equivalent Carcasses (TEC) en 2013. La France est au deuxième rang pour la production de viande de dinde, et au premier rang européen pour la viande de canard. Les Français sont les deuxièmes plus gros consommateurs de viande de volailles en Europe, avec une consommation moyenne de 25,8 kg/habitant/an en 2013, provenant à 55 % d'hypermarchés et supermarchés. La viande de volaille est la deuxième viande la plus consommée en France derrière le porc et devant le bœuf, avec 30 % de la consommation totale.

L'élevage des volailles de chair (principalement poulet, dinde et canard) se fait selon trois phases avec des paramètres zootechniques (alimentation, densité, lieu d'élevage, luminosité, température...) variables. Lors de la phase de démarrage, les jeunes âgés d'un jour sortent du couvoir et sont mis en place dans l'élevage. Pendant cette phase, la température et la luminosité sont élevées et les accès à l'aliment et à l'eau doivent être nombreux. La seconde phase est celle dite de croissance. L'aliment distribué est plus riche afin d'avoir une forte croissance des animaux. Enfin, la dernière phase est la finition, pendant laquelle l'aliment est moins riche énergétiquement. Les animaux sont ensuite abattus (voir les étapes d'abattage sur la **Figure 12**). Les durées de ces différentes étapes varient selon l'espèce considérée, et selon le mode de production, à savoir standard, labellisé, bio, plein-air etc... Les durées moyennes des différentes étapes pour l'élevage standard des principales espèces de chair sont présentées en **Figure 8**.

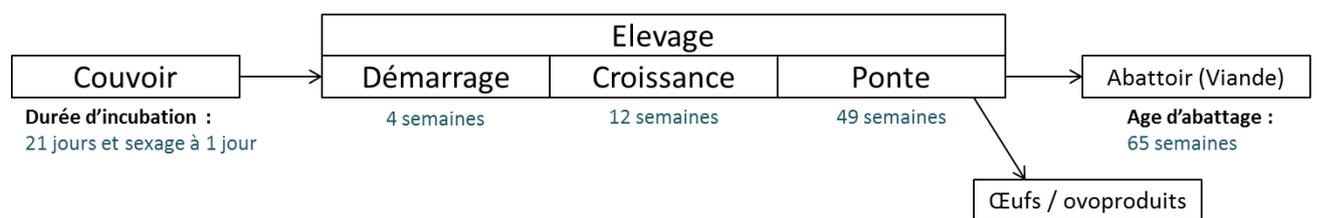


Figure 9 : Production des œufs de consommation et ovoproduits.
 (d'après Guérin [263], Thierry [264])

2.2 Les volailles de ponte

La France se place au premier rang de la production européenne d'œufs avec 15,2 milliards d'œufs produits en 2013 [266]. La région Bretagne représentait à elle seule 42 % du cheptel de poules pondeuses en 2010. La consommation des français s'élevait en 2013 à 230 œufs/habitants/an ou 14 kg/habitants/an avec plus de 40 % de la consommation sous forme d'ovo-produits (pâtes alimentaires, pâtisseries, desserts lactés...).

La production de volailles de ponte se fait en trois phases. La phase de démarrage est assez similaire à celle de la production de poulets de chair. Les poulettes d'un jour sont sexées en couvoir puis mises en place dans l'élevage. Durant la phase de croissance, l'équilibre alimentaire est assuré afin d'obtenir une croissance optimale des animaux, mais pas trop importante au niveau du système digestif. Les périodes d'éclairage sont également étudiées de manière à contrôler l'apparition de la maturité sexuelle des poules. Les poules entrent en phase de ponte vers l'âge de 16 semaines. La production va augmenter jusqu'à atteindre le pic de production, puis redescendre jusqu'à la réforme et l'abattage des animaux vers l'âge de 65 semaines (voir les étapes d'abattage sur la **Figure 12**). Les œufs produits durant la phase de ponte seront soit valorisés en œufs de consommation, soit en ovo-produits. Les durées des différentes phases de production sont présentées dans la **Figure 9**.

2.3 Les palmipèdes à foie gras

2.3.1. *Statistiques sur la production du foie gras en France*

La production du foie gras se base sur une prédisposition naturelle des palmipèdes utilisée au maximum de ses capacités. En effet, chez les oiseaux, le foie est le premier site de lipogenèse, contre le tissu adipeux chez les mammifères. Ainsi, les palmipèdes ont une tendance naturelle à l'hyperphagie et à la stéatose hépatique. Il a été démontré que la stéatose était réversible sous deux semaines, même après plusieurs cycles de gavage [267]. La production du foie gras remonte à l'Égypte ancienne, où l'oie fut le premier oiseau à être domestiqué et gavé. Aujourd'hui en France, trois espèces de palmipèdes sont utilisées pour la production du foie gras : l'oie grise des Landes (*Anser anser*), le canard de Barbarie (*Cairina moschata*) et le canard Mulard. Le canard représente 98 % de la production, avec moins de 5 % de canards de Barbarie. En 2013, 70 % de la production mondiale du foie gras était française, la production ayant augmenté de 21,5 % en 10 ans [268]. Le foie gras est globalement produit sur tout le territoire, avec une forte concentration dans l'Ouest. Ce produit est très apprécié puisque 80 % des français en consomment, avec une moyenne de 270 g/personne/an en 2013 [268].

2.3.2. *L'élevage du canard Mulard [267]*

La grande majorité du foie gras français provient de l'élevage du canard Mulard, hybride stérile obtenu par le croisement d'une femelle Pékin (*Anas platyrhynchos*) et d'un mâle de Barbarie (*Cairina moschata*).

2.3.2.1. *Elevage des reproducteurs*

Les femelles Pékin atteignent leur maturité sexuelle à l'âge de 22-24 semaines. Elles sont alors séparées en lots de 300 à 350 canes et placées sur paille ou sur caillebotis. Lorsque le taux de ponte dépasse les 50 %, les femelles sont inséminées à raison de deux fois par semaine. La production moyenne d'œufs à couvrir (OAC) est de 180 à 240 œufs pour une durée de production d'environ 40 semaines. La durée séparant la production de deux œufs est en moyenne de 24 h. Les femelles n'ont accès à un nid que la nuit afin d'éviter qu'elles ne se salissent trop et surtout pour éviter le phénomène de couvaie qui entrainerait une chute de ponte. Les mâles de Barbarie atteignent leur maturité sexuelle plus tard, vers l'âge de 27-28 semaines. Jusqu'à l'âge de 27 semaines, ils sont élevés en présence des femelles, puis ils sont séparés et placés dans des cages individuelles, bien que la présence de quelques femelles soit maintenue afin de les stimuler. Les semences de chaque mâle sont collectées quotidiennement et mises en commun, afin d'être utilisées fraîches, le jour même, pour l'insémination des femelles. Les mâles ont une durée de production d'environ 25 semaines.

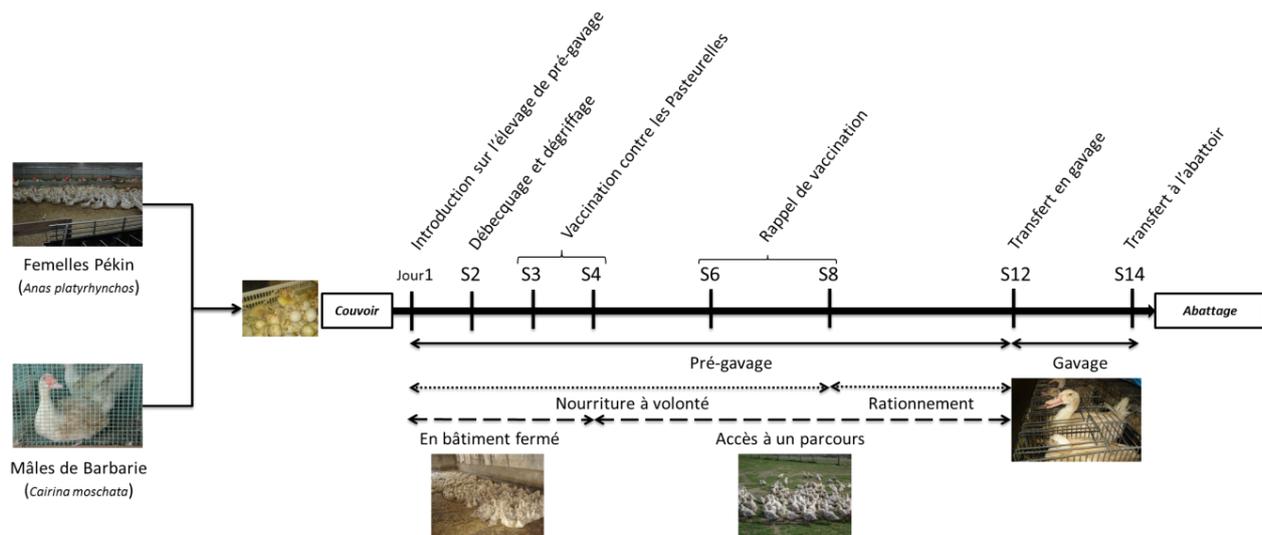


Figure 10 : Elevage du canard mulard pour la production du foie gras.
Les différentes interventions de l'Homme sont indiquées en fonction de l'âge de l'animal.
 (Crédit photo Pauline Bernard)



Figure 11 : Illustrations de l'élevage des canards Mulard.

A) Lot de canetons Mulard élevés en bâtiment fermé avec mangeoires (flèche continue) et abreuvoirs (flèche pointillée) ouverts.

B) Lot de canards Mulard desserrés sur un parcours herbeux découvert.

(Crédit photos Pauline Bernard)

Deux lots de mâles successifs sont nécessaires pour la durée de production d'un lot de femelles.

Les œufs à couvrir sont récupérés chaque jour, placés sur des plateaux et transportés au couvoir. Ils sont alors incubés pendant 32 jours à une température de 37,2°C. Un mirage effectué au 7^{ème} jour permet d'estimer la fertilité, c'est-à-dire le nombre d'œufs fécondés sur la totalité des œufs collectés. Pour le canard Mulard, ce taux de fertilité est d'environ 70 %. Mais seulement 70 à 80 % de ces œufs fécondés donneront naissance à un caneton vivant. En effet, certains canetons meurent durant l'incubation, et d'autres durant le bêchage de l'œuf, sans réussir à en sortir (Œufs bêchés non éclos (OBNE)). Environ 55 % des canetons sont des mâles, qui seront utilisés pour la production du foie gras. Les femelles, dont le foie est de moins bonne qualité du fait de son aspect veiné, sont éliminées ou utilisées pour la production de viande.

2.3.2.2. *Elevage des canards Mulard*

Les différentes étapes de l'élevage des canards mulards sont présentées sur la **Figure 10**.

2.3.2.2.1. *Pré-gavage*

Les canetons sont mis en place sur les élevages à l'âge d'un jour. Les animaux peuvent éventuellement être débecqués et dégriffés à l'âge de 2 semaines, si cela n'a pas déjà été effectué au couvoir sur demande de l'éleveur. Une première vaccination contre *Pasteurella multocida* est effectuée à l'âge de 3- 4 semaines, puis le rappel est administré à l'âge de 7-8 semaines. Durant leurs quatre premières semaines de vie, les animaux sont nourris à volonté et élevés dans des bâtiments fermés (**Figure 11A**). Durant les semaines 4 à 8, la nourriture est toujours disponible à volonté mais les canards sont desserrés et placés sur un parcours extérieur découvert (**Figure 11B**), sans accès à un bâtiment durant l'été. A partir de la semaine 8 et jusqu'au départ en gavage, les animaux sont rationnés soit par rationnement horaire (le temps d'accès à la nourriture est limité), soit par rationnement de quantité (ils sont nourris avec 80 à 90 % de la ration habituelle). Ce rationnement permet aux canards de prendre des repas très courts dans le temps, ce qui prépare le fonctionnement hépatique et également les voies alimentaires au futur gavage. Les canards subissent une mue à l'âge de 7 et 12 semaines environ qui entraîne la perte du plumage et les affaiblit, les rendant aussi plus vulnérables.

2.3.2.2.2. *Gavage*

Les canards sont transférés en ateliers de gavage à l'âge de 12 semaines et seront nourris à raison de 23 à 24 repas de 250 à 500 g pris matin et soir, soit environ 12 jours de gavage. L'aliment utilisé est un mélange d'eau et de maïs broyé, administré par le biais d'une machine ou parfois manuellement. Le vide sanitaire entre deux lots est de 72 h minimum pour le gavage au sol et 48 h pour les autres types de structures.

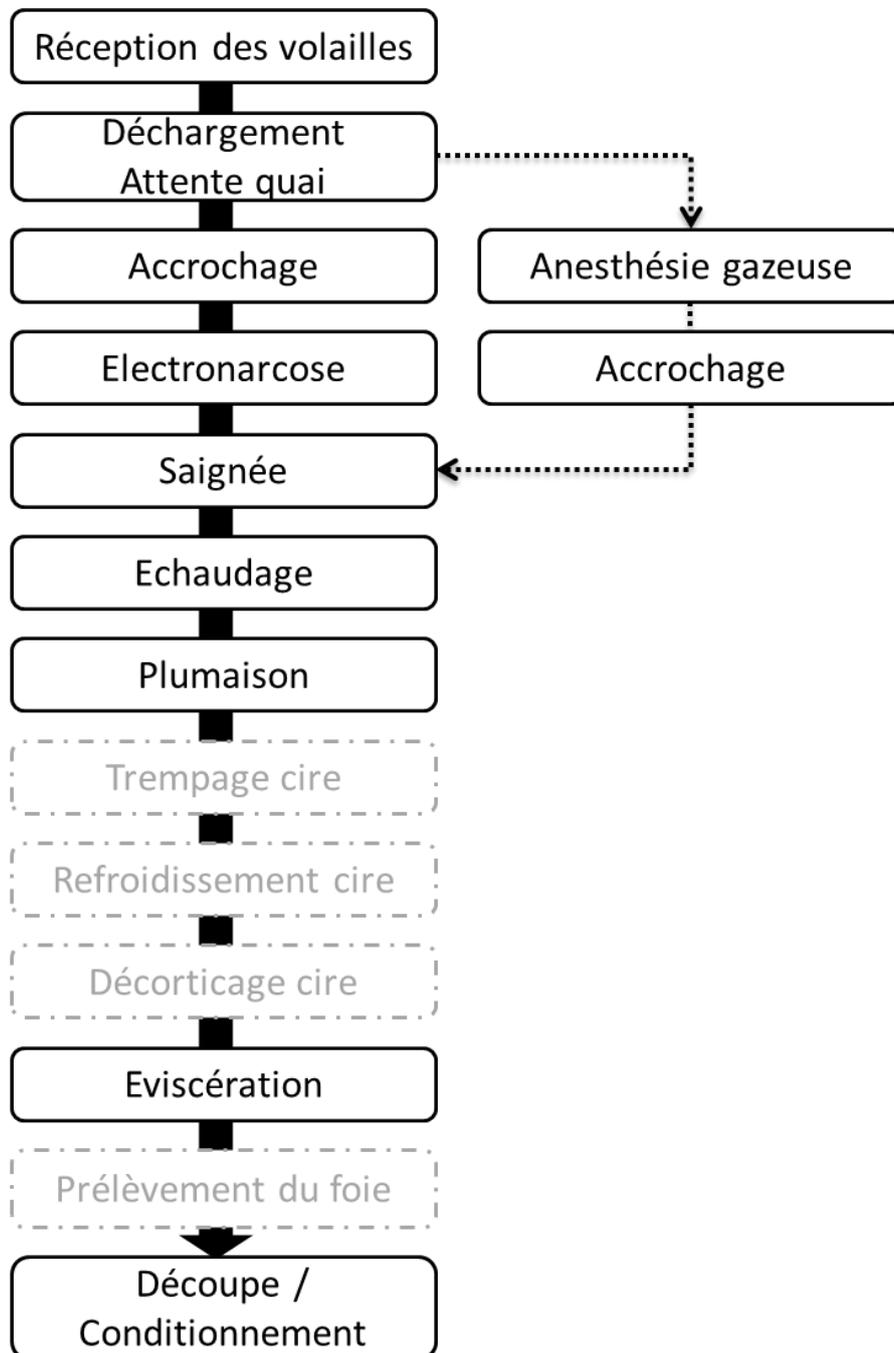


Figure 12 : Schéma des étapes d'abattage des volailles : Les étapes grisées sont spécifiques des palmipèdes à foie gras.

2.3.2.2.3. *Abattage*

Les canards sont transférés à l'abattoir vers l'âge de 14 semaines. Les différentes étapes d'abattage des volailles, et les étapes spécifiques de l'abattage des palmipèdes à foie gras sont présentées en **Figure 12**. Les animaux sont conduits à l'abattoir et déchargés sur le quai. Dans la majorité des cas en France, les animaux sont ensuite accrochés vivants par les pattes sur la chaîne d'abattage puis étourdis par électronarcose : les volailles passent dans un bain contenant un électrolyte et reçoivent une décharge électrique. Parfois, les animaux (principalement les volailles de chair) sont anesthésiés par gaz puis accrochés une fois étourdis. S'en suit la saignée, puis l'échaudage afin de faciliter la plumaison qui se fait en grande partie mécaniquement, bien que la totalité ne soit pas éliminée et qu'un plumage manuel complémentaire soit souvent nécessaire. Pour les palmipèdes à foie gras, une machine de plumaison spéciale est utilisée afin de retirer plus précautionneusement les plumes de l'abdomen pour ne pas endommager le foie. Les palmipèdes à foie gras passent ensuite dans des bains de cire successifs afin d'éliminer le duvet et les plumes restantes sur la carcasse. Les volailles sont ensuite éviscérées. Le foie, d'un poids réglementaire minimum de 300 g, est prélevé pour les palmipèdes à foie gras, et les carcasses sont valorisées en pièces de découpe (magret, cuisse...) et conditionnées.

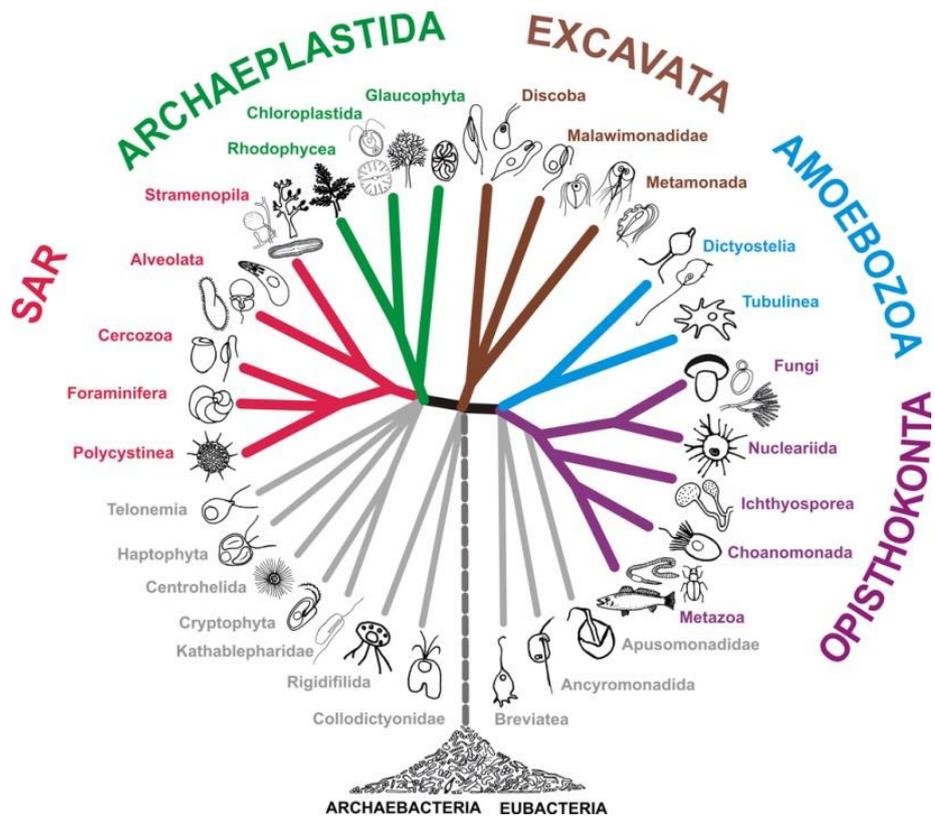


Figure 13 : Phylogénie des eucaryotes.
 (Adl, et al. [269])

3. Les amibes libres de l'environnement et leurs interactions avec les micro-organismes

3.1 Généralités sur les amibes

Le nom « amibe » provient du grec « *amoibē* » qui signifie transformation. Les amibes sont des micro-organismes eucaryotes unicellulaires du règne des protistes qui ont été décrits pour la première fois en 1755, et dont la famille fut définie en 1841 par Felix Dujardin [270]. La classification des eucaryotes comprenant les amibes ou *Amoebozoa* est présentée en **Figure 13**.

Toutes les espèces possèdent le point commun d'une forme amiboïde et d'un mouvement rampant. Les amibes possèdent un corps déformable émettant des prolongements appelés pseudopodes qui leur permettent à la fois de se déplacer et de se nourrir par phagocytose.

Il existe deux grands groupes d'amibes :

- Les amibes parasites

Ces amibes sont capables de survivre dans l'environnement mais s'y développent peu. Leur lieu de développement principal est plutôt constitué par l'appareil digestif de certaines espèces animales, dont l'Homme. Elles peuvent être pathogènes, et donc à l'origine de maladies, ou commensales, c'est-à-dire naturellement présentes dans le système digestif sans causer de pathologies.

- Les amibes libres ou telluriques

Ces amibes sont totalement indépendantes des animaux et survivent très bien dans l'environnement, notamment l'eau et les sols humides où elles sont ubiquitaires. Ces espèces représentent la majeure partie des amibes. Certaines espèces sont amphizoïdes, c'est-à-dire qu'elles peuvent être tantôt libres et tantôt parasites, causant dans ce cas principalement des pathologies graves touchant le cerveau, les yeux, la peau... Dans ce cas, l'infection ne se fait pas par le biais d'une ingestion, mais plutôt par effraction ou inhalation [16]. Les principales amibes libres de l'environnement appartiennent aux genres *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Naegleria*, *Acanthamoeba* et *Balamuthia*, les trois derniers étant pathogènes pour l'Homme.

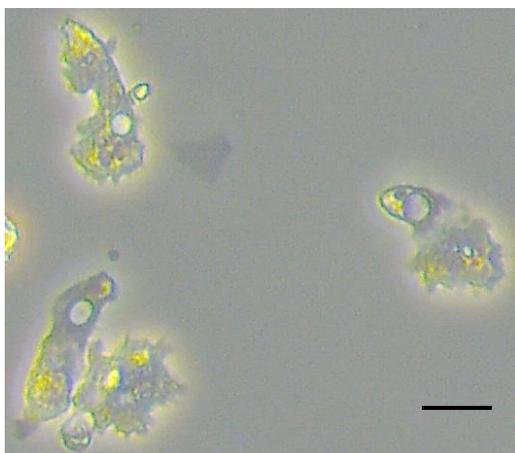


Figure 14 : Trophozoïtes d'*Acanthamoeba castellanii* cultivés en milieu liquide PYG. Microscopie optique, la barre représente 20 μm .

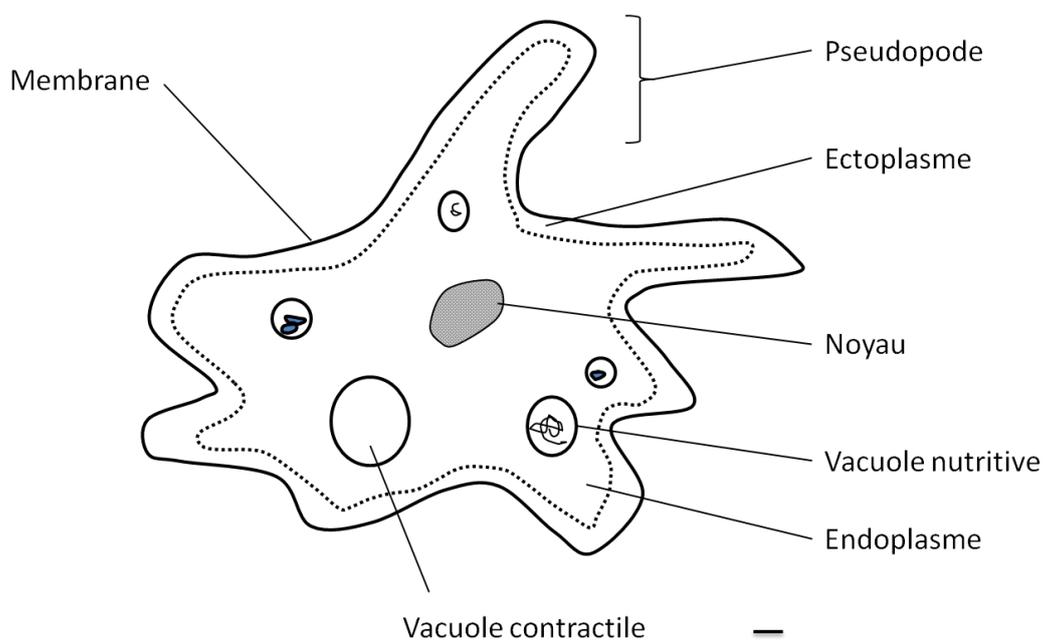


Figure 15 : Schéma de la structure d'un trophozoïte d'*Acanthamoeba*. La barre représente 1 μm .

3.2 Les Acanthamoeba

3.2.1. Classification

Les *Acanthamoeba* sont un genre d'amibes de la famille des *Acanthamoebidae* et de la classe des *Variosea* au sein du phylum *Amoebozoa*.

3.2.2. Biologie

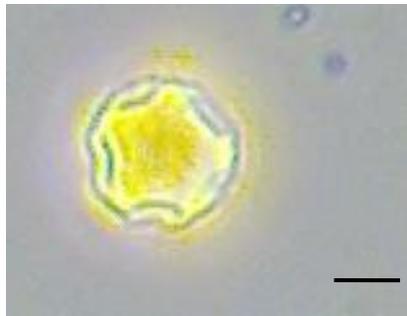
Les *Acanthamoeba* sont très répandues dans l'environnement. Elles sont de forme ronde ou ovale, non flagellées et d'une taille allant de 13,5 à 22,5 μm de diamètre. Elles sont présentes sous deux formes différentes morphologiquement.

- Le trophozoïte ou forme végétative (**Figure 14**)

Il s'agit de la forme métaboliquement active des amibes, majoritaire lorsque les conditions environnementales sont favorables (température, nutriments, densité, pH...). Les trophozoïtes se reproduisent de façon asexuée par fission binaire, avec un temps de réplication variant de 8 à 24 h selon l'isolat [16]. Elles se nourrissent en « broutant » via la phagocytose et la pinocytose les bactéries présentes à la surface des biofilms, aidant ainsi à la régulation de ces populations. Cette phagocytose est très rapide (environ 40 sec entre le contact et l'internalisation de la particule) et le turn-over de la membrane est élevé, environ 10 à 50 % par heure [271]. Certaines bactéries tirent cependant profit de ce mode de nutrition en résistant à la digestion intracellulaire par des mécanismes similaires à ceux leur conférant une résistance vis-à-vis des macrophages [272].

La structure simplifiée du trophozoïte est présentée en **Figure 15**.

Le trophozoïte est composé de deux cytoplasmes différents, l'endoplasme central d'une texture fluide, et l'ectoplasme périphérique sous forme d'un semi-gel. Cette structure permet notamment à l'amibe de se déplacer via le mouvement amiboïde. L'endoplasme s'infiltré par l'ectoplasme à l'extrémité du pseudopode naissant et permet l'extension de l'amibe. Ensuite, par un système de polymérisation et dépolymérisation de fibres du cytosquelette, l'endoplasme arrivé en périphérie se gélifie et se change en ectoplasme. L'ectoplasme arrivé en arrière de l'amibe se fluidifie et devient donc endoplasme pour perpétuer le mouvement. Les déplacements du trophozoïte ne se font pas au hasard dans l'environnement, en effet ceux-ci sont motivés par la détection de plusieurs produits bactériens par des phénomènes de chimiotactisme [273].



**Figure 16 : Kyste d'*Acanthamoeba castellanii* en culture en milieu liquide PYG.
Microscopie optique, la barre représente 5 μ m.**

- Le kyste (**Figure 16**)

Lorsque les conditions deviennent défavorables, les trophozoïtes rentrent en forme dormante : le kyste. Des changements morphologiques et biologiques s'effectuent durant l'enkystement, avec un ralentissement du cycle de réplication, une diminution de la surface cellulaire d'environ 65 %, une condensation et une déshydratation entraînant une diminution du volume de 80 % et la formation d'une double paroi solide. Lors de ce processus, une période de pré-enkystement démarre au bout de 4 à 6 h. Puis au bout de 20 à 24 h, la paroi externe est synthétisée, suivie de la paroi interne. La synthèse de l'ADN dans le kyste est maintenue à un faible niveau. Ces kystes sont très résistants et peuvent rester viables durant des années [274]. Ils peuvent notamment résister à la dessiccation, la famine, aux antibiotiques et à une variété d'agents chimiques et physiques [275]. La dissémination dans l'environnement est également facilitée via cette structure plus petite, plus solide et plus légère que le trophozoïte. Par le passé, la classification des espèces d'*Acanthamoeba* était effectuée selon la morphologie du kyste, mais il s'est avéré que celle-ci pouvait varier selon les conditions environnementales. Aujourd'hui, une classification selon le séquençage d'une portion du gène 18S est plutôt utilisée.

Lorsque les conditions de croissance deviennent à nouveau favorables, les kystes peuvent se retransformer en forme métaboliquement active. Pour cela, le trophozoïte se sépare de la paroi puis s'en extrait totalement via un ostiole ouvert.

Il est également possible d'observer des formes intermédiaires appelées pseudokystes. Celles-ci apparaissent lorsque les trophozoïtes sont mis en présence de produits chimiques à faible concentration. Les cellules s'arrondissent et se détachent de leur support. Les pseudokystes sont composés d'une simple membrane externe lisse et épaisse, ils sont plus résistants que les trophozoïtes, mais moins que les kystes. Il est impossible pour ces formes intermédiaires de se transformer en kystes, ils doivent au préalable repasser par le stade de trophozoïte [16].

3.2.3. Ecologie

Les amibes libres et particulièrement les *Acanthamoeba* sont ubiquitaires, c'est-à-dire qu'elles sont extrêmement répandues dans l'environnement. On les retrouve dans la mer, les sédiments océaniques [276, 277], les plages, les eaux stagnantes, les rivières [278] et les lacs [279], dans la poussière [280], la terre [281], le pollen [282], l'air [283, 284] et même en Antarctique [285] et dans le désert de Néguev en Israël [286].

Les amibes résistent aux traitements de potabilisation de l'eau [287] et des études ont notamment montré qu'on pouvait les détecter dans 80 % du réseau d'eau domestique aux Etats-Unis [288], ainsi que dans des réseaux hospitaliers [280, 289], des tours aéro-réfrigérantes [290], dans des élevages de volailles [291], des réfrigérateurs [292], sur des surfaces en abattoirs [293], des piscines [282], des climatisations, dans les bouteilles d'eau minérale [294], sur des légumes [295], sur des lentilles de contact [296], des instruments chirurgicaux et même des unités ophtalmologiques [282], de soins dentaires [297] et d'hémodialyse [298].

3.2.4. Culture

En conditions polyxeniques ou xeniques, les amibes se multiplient en présence de bactéries vivantes ou mortes dans un milieu pas ou peu nutritif. Les bactéries de choix incluent des souches non mucoïdes de *Klebsiella pneumoniae*, d'*Enterobacter* et d'*Escherichia coli* [299]. La culture se fait sur gélose, avec un tapis bactérien. Les amibes initiales sont placées au centre de la gélose d'où elles vont se multiplier et migrer de façon centrifuge au fur et à mesure que le tapis bactérien est phagocyté. Il est ensuite possible d'isoler une espèce d'amibe en particulier en effectuant des repiquages d'une seule cellule qui va alors produire un clone.

La culture peut également être effectuée en milieu axénique, c'est-à-dire en absence de bactéries. Cette culture se fait principalement en milieu liquide très nutritif, particulièrement le PYG (Peptone Yeast Glucose). Ce milieu est souvent supplémenté en antibiotiques afin d'éviter les contaminations bactériennes. Les températures d'incubation se situent généralement entre 25 et 35°C.

Les *Acanthamoeba* représentent des candidats de choix pour étudier les interactions entre amibes et micro-organismes du fait que ces amibes poussent facilement et rapidement dans des milieux de culture simples.

3.2.5. Pathogénicité

Certaines espèces d'*Acanthamoeba* peuvent être pathogènes à la fois pour les animaux et pour les Hommes. Chez l'Homme, elles causent principalement trois types d'infection [16] : La kératite amibienne [300], l'encéphalite granulomateuse amibienne (EGA) et l'amibiase cutanée.

Des *Acanthamoeba* ont déjà été isolées dans la paroi stomacale d'une femme décédée à la suite d'un ulcère perforant [275], à partir d'échantillons nasaux, buccaux et pharyngés de patients dans un cabinet dentaire [301] et à partir de prélèvements d'urines de patients dans un état critique dans une unité de soins intensifs [302]. Les amibes seraient dans ce cas à l'origine d'infections opportunistes, mais il n'est pas impossible qu'elles puissent également être en partie impliquées dans les pathologies observées telles qu'otites, rhino sinusites, pneumonies, vasculites...

Les *Acanthamoeba* peuvent également infecter les animaux. En effet, celles-ci ont notamment été détectées dans des fèces de bovins en Iran [282] et d'écureuils aux îles Canaries et au Maroc [303].

3.3 Interactions des *Acanthamoeba* avec les micro-organismes

De nombreux micro-organismes sont capables de survivre voire de se multiplier à l'intérieur des amibes libres et notamment les *Acanthamoeba*. Ces micro-organismes sont communément nommés endosymbiotes, bien qu'ils ne le soient pas toujours strictement, certains n'étant que des parasites occasionnels, et d'autres présentant des propriétés lytiques. Ces micro-organismes incluent des virus, des levures, des protozoaires et surtout des bactéries. Certaines espèces de bactéries ont même pu être isolées à l'aide de co-cultures d'échantillons environnementaux avec des amibes libres, comme par exemple *Criblamydia sequanensis* [9]. Environ 25 % des souches d'*Acanthamoeba* isolées présentent des endosymbiotes. La majorité de ces endosymbiotes survivent au sein des trophozoïtes, mais certains peuvent également survivre dans les kystes, ce qui leur confère une protection plus importante vis-à-vis de l'environnement.

Les micro-organismes pouvant interagir avec les *Acanthamoeba* sont listés en **Tableau 5**.

3.3.1. *Interactions avec les virus*

Plusieurs familles de virus ont pu être isolées chez des amibes libres, particulièrement des virus géants tels que les *Mimiviridae*. Les virus appartenant à cette famille et au genre *Mimivirus* infectent, pour la plupart, des amibes du genre *Acanthamoeba* et potentiellement d'autres cellules eucaryotes. L'*Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV) a été isolé pour la première fois en 1992 suite à une épidémie de pneumonie, à partir d'une co-culture d'*Acanthamoeba polyphaga* sur un échantillon d'eau provenant de la tour aéro-réfrigérante d'un hôpital en Angleterre [304, 305]. L'*Acanthamoeba castellanii mamavirus*, proche de l'APMV mais d'une taille encore plus importante, a été isolé chez *Acanthamoeba castellanii* provenant d'une tour aéro-réfrigérante à Paris [306], et l'*Acanthamoeba polyphaga mousmouvirus* a été isolé en 2008 à partir d'échantillons d'eau d'une tour aéro-réfrigérante industrielle du Sud-Est de la France par co-culture avec *A. polyphaga* [307].

Le *marseillevirus* est un autre virus géant mais plus petit que le *mimivirus* et appartenant à la famille des *Marseilleviridae*, isolé en 2008 par co-culture avec *A. polyphaga* à partir d'eau et de biofilms provenant d'une tour aéro-réfrigérante de Paris [305, 308].

Les deux espèces de *Pandoravirus*, *Pandoravirus salinus* et *Pandoravirus dulcis* ont été isolées par co-culture avec des *Acanthamoeba* à partir de sédiments provenant respectivement du Chili et d'Australie [309]. Récemment, un nouveau genre de virus proche des *Pandoravirus*, le *Pithovirus*, a été isolé à partir d'une couche de pergélisol datant de 30 000 ans [310].

Les amibes libres joueraient un rôle dans la survie des *Coxsackieviridae*, mais également dans leur transmission à l'Homme car celles-ci libèrent les micro-organismes lorsqu'elles entrent en interaction avec les macrophages humains [311]. De même, quatre sérotypes différents d'adénovirus ont été détectés dans 34 souches d'*Acanthamoeba* qui pourraient donc jouer un rôle dans la dissémination de ces virus et dans leur transmission à l'Homme [312]. Enfin, certains entérovirus seraient capables de se fixer à la paroi des amibes et d'y survivre pendant 52 à 75 jours, ce qui favoriserait leur transport [313].

3.3.2. Interactions avec les levures

Une étude réalisée en 2001 a permis de mettre en évidence que la levure *Cryptococcus neoformans* pouvait être phagocytée par *Acanthamoeba* et s'y répliquer jusqu'à causer la mort de l'hôte. La lyse de la cellule entraîne probablement la libération de nutriments qui permettent la multiplication du champignon. Les mécanismes mis en jeu par *Cryptococcus* pour résister à la phagocytose semblent très similaires à ceux intervenant pour résister aux macrophages humains. Cette levure ne nécessitant pas d'être internalisée pour se reproduire, cette aptitude représenterait plus un mécanisme de défense vis-à-vis des prédateurs environnementaux [314].

3.3.3. Interactions avec les protozoaires

Il a été montré que certaines espèces d'amibes libres pouvaient internaliser jusqu'à six oocystes (la forme infectieuse du parasite) de *Cryptosporidium* par trophozoïte. Cela facilite leur transport et leur transmission, ils sont ensuite relâchés petit à petit dans le milieu [315]. De même, les oocystes de *Toxoplasma gondii* peuvent être internalisés par *Acanthamoeba* puis libérés. Il a été montré de façon expérimentale que l'infection de souris par des oocystes internalisés ou non ne changeait pas l'infectiosité de ceux-ci. Les amibes joueraient donc un rôle de dissémination dans l'environnement aquatique pour ces protozoaires [316].

3.3.4. Interactions avec les bactéries

Les amibes libres peuvent avoir deux rôles dans le cas du portage de bactéries, celui de "cheval de Troie" lorsque les bactéries survivent simplement au sein des amibes, leur conférant parfois une protection vis-à-vis de l'environnement, et celui de réservoir lorsqu'elles s'y multiplient également. Les mécanismes mis en jeu par les bactéries pour infecter et résister aux amibes semblent très proches de ceux impliqués pour infecter et résister aux macrophages de mammifères. Il est donc envisagé que cette capacité à infecter des protozoaires environnementaux puisse les assister dans leur adaptation aux cellules phagocytiques de mammifères, et donc de l'Homme.

De nombreuses bactéries sont capables de survivre voire de se multiplier dans les *Acanthamoeba*. Parmi celles-ci, *Legionella pneumophila* fut la première bactérie pour laquelle cette propriété endosymbiotique fut découverte dans les années 1980. Cette bactérie, causant la maladie du Légionnaire chez l'Homme, est répartie mondialement et très présente dans tous les milieux aquatiques. Sa capacité à se multiplier de façon extracellulaire n'ayant pu être observée qu'*in vitro* dans des conditions très particulières, il semblait donc que sa multiplication dans l'environnement soit dépendante d'autres organismes. Une étude *in vitro* réalisée en 1983 a permis de mettre en évidence qu'elle pouvait notamment se reproduire au sein d'*Acanthamoeba palestinensis* [317]. Il semblerait que les protozoaires, et notamment les amibes libres, représentent une niche de reproduction pour les Légionnelles de l'environnement. Il a également été possible d'isoler de nouvelles espèces de *Legionella* à partir de co-culture en présence d'*A. polyphaga* [318].

Parmi les endosymbiotes, on retrouve un grand nombre de bactéries pathogènes pour l'Homme et/ou l'animal, telles que *E. coli* souche O157:H7 [319], *Shigella* [320], *Salmonella* [321, 322], *Afipia felis* [323], *Vibrio cholerae* [324], *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia*, deux bactéries parodontopathogènes [325], *Burkholderia pseudomallei*, responsable de la mélioïdose [326], *Burkholderia cepacia* [327], *Coxiella burnetii*, agent de la fièvre Q [328] ou encore *Staphylococcus aureus* [329].

L'ordre des *Rickettsiales* comprend plusieurs espèces capable d'infecter des amibes et notamment *Acanthamoeba*, comme par exemple l'espèce récemment proposée *Candidatus Jidaibacter acanthamoeba* [330], ou *Rickettsia belli* qui présente de nombreux gènes très similaires à ceux d'autres bactéries se multipliant au sein d'amibes, laissant penser que des transferts de gènes auraient pu avoir lieu au sein des ancêtres des amibes libres entre les différentes bactéries intracellulaires les infectant, conduisant éventuellement à leur adaptation à la vie dans les cellules eucaryotes [331]. Ces échanges auraient, entre autres, eu lieu avec les *Chlamydiales*, comme le suggère la présence d'un opéron similaire chez ces deux groupes de bactéries [332].

Francisella tularensis, bactérie responsable de la zoonose nommée tularémie, est également capable de croître au sein d'*Acanthamoeba castellanii* entraînant parfois la lyse d'une partie des cellules hôtes. La bactérie se multiplie plus rapidement en présence d'*A. castellanii* que seule, dans un même milieu [333]. De plus, *Bacillus anthracis*, responsable de la maladie du charbon ou Anthrax, peut également germer et se multiplier au sein d'*A. castellanii* [334]. Ces résultats laissent penser que les *Acanthamoeba* pourraient constituer un réservoir environnemental pour ces bactéries très dangereuses, et que les amibes pourraient donc être utilisées en tant qu'arme de bioterrorisme [275].

Les mycobactéries pathogènes sont très souvent hébergées par des amibes. Une étude a montré que 26 espèces de mycobactéries étaient capables de rentrer dans les trophozoïtes d'*A. polyphaga* et d'y survivre pendant au moins cinq jours. Celles-ci pouvaient également survivre au moins 15 jours dans les kystes ce qui leur confère une protection notamment vis-à-vis du chlore [335]. Certaines mycobactéries sont même capables de survivre pendant plusieurs années dans les kystes [272]. De plus, la multiplication de ces bactéries au sein des amibes semble favoriser l'expression de certains gènes de virulence et pourrait aboutir à la sélection de souches plus résistantes et donc plus difficiles à traiter. Ceci pourrait donc représenter un réel risque sanitaire, notamment dans les hôpitaux où les amibes sont détectées dans les réseaux d'eau [272].

3.3.5. Interactions avec les Chlamydiales

La plupart des *Chlamydiales* environnementales sont capables de survivre voire de croître dans les amibes libres de l'environnement. Une étude réalisée en 2000 sur quatre souches d'*Acanthamoeba* a permis de mettre en évidence de nombreux endosymbiotes, dont 5 % de *Chlamydiales* [336].

Les *Parachlamydiaceae* font partie des *Chlamydiales* dont les hôtes naturels sont les amibes. *Parachlamydia acanthamoebae* fut isolée pour la première fois d'*Acanthamoeba* provenant d'un écouvillon nasal prélevé sur un individu sain [38]. Depuis, ces bactéries ont été souvent isolées d'amibes provenant de sources variées (prélèvements humains, eau, sol, boues d'épuration...) [6]. L'espèce *Protochlamydia amoebophila* fut également isolée d'*Acanthamoeba* provenant d'échantillons de sol des Etats-Unis. Cette espèce est capable de croître aussi bien dans les trophozoïtes que dans les kystes. La nature endosymbiotique de ces bactéries leur aurait permis de sélectionner des traits de virulence au cours de l'évolution afin de s'adapter à l'infection de macrophages, ce qui expliquerait leur intérêt médical actuel [332]. Certaines espèces de *Parachlamydiaceae* sont capables de bloquer l'enkystement de leurs hôtes [16].

Les *Simkaniaceae* ont été détectées pour la première fois en tant que contaminants d'une culture cellulaire en 1993 [38]. Leur hôte naturel n'était donc pas connu, cependant ces bactéries poussent très bien dans les amibes, laissant supposer que ces dernières constituent un réservoir environnemental. *Simkania negevensis* est capable d'infecter les trophozoïtes d'*A. polyphaga* de façon pérenne, car des inclusions ont pu être observées même des mois après l'infection initiale. Cette espèce peut également infecter les kystes. Après 79 jours passés à +4°C avec un enkystement de leur hôte, les bactéries conservaient une infectiosité supérieure à 50 % à celle de l'inoculum initial, alors qu'elles étaient incapables de survivre plus de 12 jours seules à cette température, même en milieu nutritif SPG [337].

Les *Waddliaceae* sont également capable de croître au sein des *Acanthamoeba* ainsi que d'autres amibes [338]. Des espèces de *Chlamydiales* récemment décrites ont pu être mises en évidence grâce à la co-culture avec des *Acanthamoeba*. C'est notamment le cas de *Criblamydia sequanensis*, isolée à partir de prélèvements d'eaux de la Seine et capable de se multiplier dans les *Acanthamoeba* avec une augmentation de 2 log en environ cinq jours [9]. De même pour *Estrella lausannensis*, isolée de prélèvement d'eaux d'une usine de traitement [10].

La possible survie des espèces de *Chlamydiaceae* au sein des *Acanthamoeba* a été étudiée. Une première étude a été menée afin d'observer les interactions entre *C. pneumoniae* et *A. castellanii* [339]. Cette étude fut motivée par le fait que *C. pneumoniae* présentait des modes d'infections et des conséquences sur l'Homme similaires à *Legionella pneumophila*, bactérie déjà bien connue pour se multiplier au sein des amibes libres ; et également par l'existence de rapports faisant état de co-infections avec *C. pneumoniae* et des amibes chez l'Homme. L'infection d'*A. castellanii* par *C. pneumoniae* a pu être détectée pendant les 14 jours de l'essai et la charge bactérienne est restée relativement stable, alors qu'une culture parallèle de *C. pneumoniae* seule a montré une baisse rapide de l'infectiosité. La microscopie électronique en transmission (MET) a révélé une phagocytose des bactéries par les amibes dès 4 h post-infection, et l'apparition d'inclusions typiques à partir du troisième jour, contenant tous les stades de développement. De grosses inclusions entraînant la lyse de la cellule hôte et la dispersion des CE dans l'environnement ont pu être observées. A partir du 10^{ème} jour, des inclusions plus petites contenant quelques CE, mais surtout des formes aberrantes sont observées. Le maintien de l'infection des amibes par *C. pneumoniae* pourrait donc être le résultat d'un cycle de développement normal avec l'infection de nouvelles amibes au cours du temps, mais également d'une infection persistante. La lyse des amibes au bout de 14 jours a permis de récupérer les corps élémentaires normaux qui se sont révélés infectieux et aptes à redémarrer de nouveaux cycles de développement. Il semble donc que cette espèce de *Chlamydia* soit capable de survivre et de faiblement se reproduire au sein d'*A. castellanii*. L'intérêt pour la bactérie résiderait dans l'utilisation de l'ATP délivré par la cellule hôte ainsi que dans la protection vis-à-vis de l'environnement extérieur.

Une seconde étude a permis d'observer la survie de *C. trachomatis* au sein de différentes souches d'*Acanthamoeba* [340]. En effet, cette bactérie a déjà été détectée dans des isolats d'*A. castellanii* provenant de cornées infectées de patients [341]. Lors de cette étude, des bactéries ont pu être détectées par immunofluorescence directe avec un kit commercial même après sept jours d'incubation à 33°C et 37°C. Aucun effet cytopathique n'a été observé sur les amibes. Le suivi de l'infection par PCR en temps réel n'a pas permis de mettre en évidence de réplication, le taux d'ADN étant resté constant au cours du temps. Ces résultats semblent indiquer que *C. trachomatis* est capable de survivre au sein des *Acanthamoeba*, mais pas de s'y multiplier, bien qu'il soit impossible d'exclure une très faible réplication non détectée dans le cadre de cette étude.

Enfin, une troisième étude a été réalisée avec l'espèce *C. abortus* [342]. Celle-ci est très proche de *C. pneumoniae* dont la survie dans les *Acanthamoeba* a été prouvée, et c'est une bactérie très fréquemment impliquée dans des avortements de ruminants, posant la question du possible mode de contamination via l'environnement. *C. abortus* a donc été utilisée pour infecter *A. castellanii* selon plusieurs ratios ou MOI (1:1, 50:1, 100:1 et 200:1) et les cultures ont été incubées à 25°C. Les analyses par MET et Microscope confocal à balayage laser (CLSM) ont permis de mettre rapidement en évidence la formation d'inclusions, mais contenant des CE dont la structure était déjà modifiée, laissant penser que les bactéries étaient dégradées par les amibes. Celles-ci ont ensuite disparues rapidement des amibes indépendamment des MOI. L'analyse par PCR en temps réel a montré une forte diminution de la quantité d'ADN durant les 96 premières heures, puis un taux d'ADN resté stable pendant une semaine. L'expérience a été renouvelée à 34°C et 36°C, et également en ajoutant des antibiotiques au milieu de culture, mais sans modification des résultats. Les analyses ont montré que l'infection avait tendance à engendrer un enkystement des amibes au bout de un à trois jours. Dans un second temps, l'enkystement des amibes infectées a donc été forcé en les plaçant dans un milieu de culture adapté, et la présence ou non de *Chlamydia* dans les kystes a été recherchée. Cet essai s'est révélé négatif. Les *Acanthamoeba* ne semblent donc pas représenter un réservoir naturel pour *C. abortus*. La bactérie est phagocytée par l'amibe mais rapidement digérée. Cependant, il n'est pas totalement exclu que quelques bactéries puissent résister à la phagocytose.

Aucune expérience similaire n'a pour le moment été effectuée sur *C. psittaci*, bien que cette bactérie présente des modes d'infection assez proches de ceux de *C. pneumoniae* et *C. trachomatis*, dont la survie au sein des *Acanthamoeba* a été mise en évidence.

Tableau 5 : Micro-organismes pouvant interagir avec les *Acanthamoeba*.

	Micro-organismes	Hôtes connus	Caractéristiques de l'interaction	Référence
Virus	Adénovirus	<i>Acanthamoeba</i>	Détection de 4 sérotypes d'adénovirus dans des souches d' <i>Acanthamoeba</i> issues de sources d'eau	[312]
	APMV	<i>A. polyphaga</i>	Isolé d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[304, 305]
	<i>Coxsackieviridae</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et libération des particules virales en présence de macrophages humains	[311]
	Entérovirus	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Adhésion des virus en surface des amibes, rôle de transport	[313]
	<i>Mamavirus</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolé d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[306]
	<i>Marseillevirus</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolé d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[308]
	<i>Moumouvirus</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolé d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[307]
	<i>Pandoravirus</i>			
	<i>Pandoravirus salinus</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Isolé d'un échantillon de sédiments par la technique de co-culture	[309]
	<i>Pandoravirus dulcis</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Isolé d'un échantillon de boue par la technique de co-culture	[309]
	<i>Pithovirus</i>	<i>A. castellanii</i>	Isolé d'un échantillon de pergélisol par la technique de co-culture	[310]
Levures	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication de la levure jusqu'à lyse de l'amibe	[314]
Protozoaires	<i>Cyrtosporidium</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie des oocystes dans l'amibe et libération progressive dans l'environnement	[315]
	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>A. castellanii</i>	Etudes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> Pas de baisse d'infectivité sur un modèle murin avec des oocystes internalisés	[316]
Bactéries	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>A. polyphaga</i> <i>A. castellanii</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
	<i>Aeromonas</i> spp.			
	<i>A. caviae</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie dans les amibes	[344]
	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie dans les amibes	[344]
	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[345]
	<i>A. veronii</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie dans les amibes	[344]
	<i>Afipia</i> spp.			
	<i>A. felis</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[323]
	<i>A. broomae</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Détectée dans une <i>Acanthamoeba</i> provenant d'eau de réseau hospitalier	[346]
	<i>Amoebophilus asiaticus</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Isolée d'un échantillon de sédiments par la technique de co-culture	[347]

Micro-organismes	Hôtes connus	Caractéristiques de l'interaction	Référence
<i>Bacillus</i> spp.			
<i>B. anthracis</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Multiplication et germination dans l'amibe	[334]
<i>B. cereus</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie dans l'amibe et lyse partielle	[345]
<i>Bosea</i> spp.			
<i>B. enea</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[348]
<i>B. massiliensis</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[348]
<i>B. vestrisii</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[348]
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Détectée dans une <i>Acanthamoeba</i> provenant d'eau de réseau hospitalier	[346]
<i>Brevundimonas</i> spp.			
<i>B. diminuta</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[345]
<i>B. vesicularis</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Burkholderia</i> spp.			
<i>B. cepacia</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[327]
<i>B. pickettii</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Détectée dans une <i>Acanthamoeba</i> provenant du sol de la douche d'une unité de physiothérapie	[349]
<i>B. pseudomallei</i>	<i>A. castellanii</i> <i>A. astronyxis</i> <i>A. polyphaga</i>	Etudes <i>in vitro</i> Survie dans les amibes	[326]
<i>Caedibacter acanthamoebae</i>	<i>A. polyphaga</i>	Détectée dans une <i>A. polyphaga</i> provenant d'une lentille de contact	[350]
<i>Campylobacter</i> spp.			
<i>C. coli</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[351]
<i>C. hyointestinalis</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[351]
<i>C. jejuni</i>	<i>A. castellanii</i>	Etudes <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[351, 352]
<i>C. lari</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[351]
<i>Chlamydiales</i> spp.			
<i>Parachlamydiaceae</i> spp.			
<i>Parachlamydia acanthamoeba</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Détectée dans un isolat d' <i>Acanthamoeba</i> provenant d'un écouvillon nasal de patient sain	[38]
<i>Protochlamydia amoebophila</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Détectée dans des <i>Acanthamoeba</i> provenant d'un échantillon de sol	[38]
<i>Simkaniaceae</i> spp.			
<i>S. negevensis</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe, survie dans les kystes	[337]
<i>Waddliaceae</i> spp.			
<i>W. chondrophila</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Etudes <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[338]
<i>Criblamydia sequanensis</i>	<i>A. castellanii</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[9]
<i>Estrella lausanensis</i>	<i>A. castellanii</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[10]

Bactéries

Micro-organismes	Hôtes connus	Caractéristiques de l'interaction	Référence
<i>Chlamydiaceae</i> spp.			
<i>C. pneumoniae</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et faible multiplication dans l'amibe	[339]
<i>C. trachomatis</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie dans l'amibe	[340]
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>A. castellanii</i>	Etudes <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[353]
<i>Coxiella burnetti</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et sporulation dans l'amibe	[328]
<i>Delftia acidovorans</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Enterobacter</i> spp.			
<i>E. aerogenes</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>E. amnigenus</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>E. cancerogenus</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>E. cloacae</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[345, 353]
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[319]
<i>Flavobacterium</i> spp.			
<i>F. johnsoniae</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Isolée d'un échantillon d'eau de réseau hospitalier par la technique de co-culture	[347]
<i>F. succinicans</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Isolée d'un échantillon d'eau de réseau hospitalier par la technique de co-culture	[347]
<i>Francisella tularensis</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe conduisant majoritairement à la lyse cellulaire. Meilleure croissance en présence d'amibes que la bactérie seule dans le même milieu.	[333]
<i>Hafnia alvei</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[354]
<i>Klebsiella</i> spp.			
<i>K. oxytoca</i>	<i>A. castellanii</i>	Etudes <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[353]
<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. castellanii</i>	Etudes <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[353]
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Legionella</i> spp.	<i>Acanthamoeba</i>	Niche de multiplication dans l'environnement	[317, 318, 355-357]
<i>Listeria</i> spp.			
<i>L. ivanovii</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie dans l'amibe	[358]
<i>L. monocytogenes</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie dans l'amibe	[359]
<i>L. seeligeri</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie dans l'amibe	[358]
<i>L. welshimeri</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie dans l'amibe	[358]

Bactéries

Micro-organismes	Hôtes connus	Caractéristiques de l'interaction	Référence
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Mezorhizobium amorphae</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Détectée dans une <i>Acanthamoeba</i> provenant d'eau de réseau hospitalier	[346]
<i>Molibuncus curtisii</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe en milieu aérobie (bactérie anaérobie)	[360]
<i>Morganella morgani</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>A. polyphaga</i> <i>A. castellanii</i>	Etudes <i>in vitro</i> Survie dans les trophozoïtes, et également dans les kystes pour certaines espèces Virulence de <i>M. avium</i> accrue en présence d' <i>A. castellanii</i> <i>M. avium</i> peut être cultivée en présence de molécules sécrétées par <i>A. polyphaga</i>	[335, 361-363]
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Odysseella thelassonicensis</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[364]
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Paracaedibacter</i> spp.			
<i>P. acanthamoebae</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Détectée dans une <i>Acanthamoeba</i> provenant d'un échantillon de sol	[350]
<i>P. symbiosus</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Détectée dans une <i>Acanthamoeba</i> provenant d'un écouvillon nasal humain	[350]
<i>Pasteurella multocida</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[365]
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[325]
<i>Prevotella intermedia</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[325]
<i>Procabacter acanthamoeba</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Détectée dans une <i>Acanthamoeba</i> provenant d'un prélèvement cornéen de patient atteint de kératite	[366]
<i>Providencia</i> spp.			
<i>P. alcalifaciens</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>P. rettgeri</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Pseudomonas</i> spp.			
<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. polyphaga</i>	Survie et multiplication dans l'amibe	[367]
<i>P. alcaligenes</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[345]
<i>P. fluorescens</i>	<i>A. castellanii</i> <i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>P. mendocina</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[345]
<i>P. putida</i>	<i>A. castellanii</i> <i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Rhodococcus</i> spp.			
<i>R. equi</i>	<i>A. castellanii</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>R. erythropolis</i>	<i>A. castellanii</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]

Bactéries

Micro-organismes	Hôtes connus	Caractéristiques de l'interaction	Référence
<i>Rickettsiales</i> spp.			
<i>R. belli</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie dans l'amibe	[331]
<i>Candidatus Jidaibacter acanthamoeba</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Détectée dans une <i>Acanthamoeba</i> provenant d'un prélèvement cornéen de patient atteint de kératite	[368]
<i>Rothia dentocariosa</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[345]
<i>Salmonella</i> spp.			
<i>S. enterica</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[321]
<i>S. typhimurium</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[322]
<i>Serratia</i> spp.			
<i>S. ficaria</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>S. marcescens</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>S. plymuthica</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[345]
<i>S. proteamaculans</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Shigella</i> spp.			
<i>S. boydii</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>S. dysenteriae</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[320]
<i>S. sonnei</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[320]
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[345]
<i>Staphylococcus</i> spp.			
<i>S. aureus</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans les trophozoïtes et les kystes	[329]
<i>S. epidermidis</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans les trophozoïtes et les kystes	[329]
<i>S. pasteurii</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[345]
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[345]
<i>Taylorellae</i> spp.			
<i>T. asinigenitalis</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie dans l'amibe	[369]
<i>T. equigenitalis</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie dans l'amibe	[369]
<i>Vibrio</i> spp.			
<i>V. cholerae</i>	<i>A. polyphaga</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[324]
<i>V. mimicus</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans les trophozoïtes et les kystes	[370]

	Micro-organismes	Hôtes connus	Caractéristiques de l'interaction	Référence
Bactéries	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>A. castellanii</i>	Etude <i>in vitro</i> Pas d'internalisation mais la présence en co-culture de <i>A. castellanii</i> améliore la survie de la bactérie par la sécrétion de facteurs	[371]
	<i>Yersinia</i> spp. <i>Y. enterocolitica</i>	<i>A. castellanii</i>	Etudes <i>in vitro</i> Survie et multiplication dans l'amibe	[353]
	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>A. polyphaga</i>	Isolée d'un échantillon d'eau par la technique de co-culture	[343]

Objectifs

En France, l'infection à *C. psittaci* en élevages avicoles constitue principalement un problème de santé publique, les animaux infectés ne présentant pas de symptômes, le plus souvent. Une étude menée par l'INVS dans l'Ouest de la France en 2008-2009 et dont l'objectif était de recenser les cas graves de psittacose avait montré que l'infection à *C. psittaci* concernait principalement les professionnels, souvent au sein de la filière avicole. Les cas étaient particulièrement recensés dans la filière canard Mulard, espèce la plus utilisée en France pour la production du foie gras.

Des études antérieures avaient mis en évidence la présence de *C. psittaci* dans les élevages de canards Mulard [1, 2]. Durant toute la période d'élevage, les animaux sont manipulés à de nombreuses reprises par les professionnels, lors des transferts entre les différents ateliers, lors des vaccinations, des interventions spécifiques, etc. Afin d'affiner nos connaissances sur cette zoonose d'importance en santé publique, les objectifs de cette thèse ont visé à évaluer l'exposition des professionnels aux *Chlamydiaceae* dans la filière avicole, avec un focus particulier sur la filière canard Mulard, et à étudier les caractéristiques de survie de la bactérie dans l'environnement à l'aide de modèles *in vitro*. Pour cela, deux études ont été mises en place :

1/ Etude de la **circulation** des *Chlamydiaceae* en filière avicole et de l'**exposition** des professionnels à *C. psittaci*.

Pour cela, un protocole de prélèvements a été mis en place dans trois établissements ayant eu à faire face à des cas plus ou moins sévères de psittacose en 2008-2009, à savoir un couvoir et un abattoir spécialisés dans la filière canards, et un abattoir de volailles spécialisé dans l'abattage d'espèces autres que le canard. Pour évaluer le niveau de portage des *Chlamydiaceae*, des prélèvements ont été réalisés sur les animaux/œufs à différentes périodes de l'année afin de prendre en compte l'effet saison. Des prélèvements d'air ont été effectués à proximité des postes de travail dans le but d'apprécier le niveau de contamination de l'air ambiant par *C. psittaci*. De plus, un suivi du personnel volontaire a été réalisé dans les deux abattoirs afin d'observer le niveau de portage de *C. psittaci* par les professionnels du secteur, en fonction des lieux et des postes occupés, et également pour recenser d'éventuels cas de psittacose.

Un suivi de sept lots de canards Mulard a été mis en place, avec des prélèvements réalisés sur les animaux à chaque étape de l'élevage (du couvoir à l'abattoir) nécessitant leur manipulation par l'Homme. Des prélèvements d'eau, de sol, d'air ambiant et de poussières ont également été réalisés, ceci dans le but d'évaluer la contamination de l'environnement par *C. psittaci* et de voir s'il pourrait constituer une voie de contamination pour les animaux, comme évoqué lors d'une étude précédente [1]. Un questionnaire portant à la fois sur les pratiques d'élevage et sur les pratiques de désinfection et de nettoyage du matériel et des installations a été soumis aux éleveurs à l'occasion de ce suivi, afin d'évaluer l'impact de ces pratiques sur la présence de *C. psittaci* dans l'environnement.

2/ Etude des caractéristiques de **survie** de *C. psittaci* à l'aide de modèles *in vitro*.

Afin d'évaluer si l'environnement pourrait constituer une voie de contamination pour les animaux en élevage, des études *in vitro* complémentaires ont été réalisées. Afin d'investiguer les modes de survie possibles de *C. psittaci* dans l'environnement, une première étude a été réalisée afin d'observer la survie de la bactérie seule selon différentes conditions de température. Dans un second temps, une série d'essais a été réalisée afin d'observer les éventuelles interactions entre *C. psittaci* et une amibe libre de l'environnement, protozoaire très ubiquiste qui pourrait représenter un hôte de choix pour la bactérie.

Matériel et méthodes

1. Prévalence des *Chlamydiaceae* en filières avicoles et exposition des professionnels

Le couvoir, les cinq élevages (A à E) ainsi que les deux abattoirs de volailles (un abattoir spécialisé dans le canard (A) et un abattoir spécialisé dans les volailles autres que le canard (B)) suivis dans le cadre de cette étude se situent tous dans la même zone géographique, à savoir la région Pays de la Loire. Trois élevages (A, B et D) ainsi que les abattoirs A et B sont situés en Vendée (85), un élevage (E) se trouve en Loire Atlantique (44), et le dernier élevage (C) ainsi que le couvoir se situent dans le Maine et Loire (49). L'ensemble des élevages de canards Mulard sont affiliés à la même Organisation Professionnelle Avicole (OPA), ils sont supposés avoir des pratiques d'élevage homogènes. Les canetons proviennent tous du couvoir suivi, et sont tous abattus dans l'abattoir A.

1.1 Suivis mensuels de lots en couvoir et en abattoir A (canards)

1.1.1. *En couvoir*

1.1.1.1. *Prélèvements effectués*

Des prélèvements ont été réalisés dans le couvoir de canards Mulard d'avril 2012 à avril 2013. Une fois par mois, 15 œufs bêchés non éclos (OBNE) issus d'un même lot ont été récupérés de façon arbitraire, ainsi que 15 écouillons cloacaux réalisés sur les canetons âgés d'un jour sélectionnés au hasard et provenant de ce même lot. Cinq prélèvements d'airs ont également été réalisés lors de cinq étapes clés nécessitant la manipulation des œufs ou des animaux de ce lot par l'Homme: la réception des œufs, l'incubation, le mirage, l'éclosion et le sexage. Les prélèvements d'air ont été réalisés par impact sur une gélose semi-liquide à un débit de 100 L/min durant 10 min avec l'appareil MAS100 NT® (MBV, Switzerland), comme décrit par Van Droogenbroeck *et al.* [261].

Suite à une panne du collecteur d'air en février 2013, seuls deux prélèvements d'air ont pu être effectués durant ce mois, et les prélèvements du mois de mars 2013 ont été remplacés par deux pédichiffonnettes portées par un employé lors de l'éclosion et du sexage.

L'ensemble des prélèvements a été envoyé au laboratoire, puis stocké jusqu'à analyse à -80°C pour les écouillons et les OBNE et à +4°C pour les prélèvements d'air et les pédichiffonnettes.

1.1.1.2. *Extraction d'ADN*

1.1.1.2.1. *Ecouvillons cloacaux*

Les écouillons cloacaux ont été soumis à une extraction d'ADN avec le kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) selon le protocole du fabricant nommé « buccal swab spin protocol » et présenté en **Annexe 1**.

1.1.1.2.2. OBNE

Les OBNE ont été autopsiés et des échantillons de foie, de rate, de poumons et d'intestins ont été prélevés et soumis à une extraction d'ADN avec le kit QIAGEN selon le protocole du fabricant nommé «Tissues » et présenté en **Annexe 1**.

1.1.1.2.3. Prélèvements d'air et pédichiffonnettes

Les prélèvements d'air ont été centrifugés durant 1 h à 10°C et 32 000 *g*, puis le culot a été repris dans 400 µL de PBS et soumis au même protocole d'extraction que les écouvillons cloacaux.

Les deux pédichiffonnettes réalisées en mars 2013 suite à la panne du collecteur d'air ont été traitées comme indiqué en 1.3.2.2.

1.1.1.3. Analyse par PCR en temps réel

Tous les ADN obtenus ont été analysés par PCR en temps réel ciblant le gène ribosomal 23S rRNA et spécifique de l'ensemble des bactéries de la famille des *Chlamydiaceae* [200]. Un témoin positif (souche Loth de *C. psittaci*) et un témoin négatif (eau stérile) ont été systématiquement inclus. Les échantillons présentant une valeur de Cq supérieure à 40 ont été considérés comme négatifs. En effet, un test réalisé au laboratoire dans le but de valider la méthode de diagnostic par PCR en temps réel ciblant le gène 23S rRNA a mis en évidence qu'une valeur de Cq égale à 40 correspondait à 1 IFU dans le milieu réactionnel (données non publiées).

Les ADN ayant donné un résultat positif ont été analysés avec une seconde PCR ciblant le gène *incA* et spécifique de l'espèce *C. psittaci* [201].

1.1.2. *En abattoir de canards (Abattoir A)*

1.1.2.1. *Prélèvements effectués*

Des prélèvements ont été effectués dans l'abattoir A de mars 2012 à mars 2013. Une matinée par mois, l'ensemble des lots de canards gras (canards Mulard) abattus ont fait l'objet d'un prélèvement aléatoire de 15 écouillons cloacaux effectués sur la chaîne d'abattage après l'étape de plumaison. En parallèle, 10 prélèvements d'air ont été effectués comme indiqué en 1.1.1.1. à raison de deux prélèvements espacés dans le temps effectués sur le quai de déchargement des animaux, dans les vestiaires du personnel, à l'étape d'accrochage des volailles, lors de la plumaison et lors de l'éviscération.

1.1.2.2. *Extraction d'ADN et analyse par PCR en temps réel*

Les écouillons cloacaux et les prélèvements d'air ont été soumis aux mêmes protocoles d'extraction que présentés en 1.1.1.2. Les deux prélèvements d'air effectués dans un même lieu ont été poolés avant extraction. Les ADN ont ensuite été analysés par PCR en temps réel selon les mêmes étapes qu'en 1.1.1.3.

1.1.2.3. *Génotypage et séquençage*

Le gène *ompA* de six échantillons positifs vis-à-vis de *C. psittaci* et présentant une valeur de Cq inférieure à 34 a été séquencé à l'aide des amorces 5GPF/3GPB [88]. Les séquences obtenues ont été comparées entre elles et par rapport à des séquences de référence des différents génotypes de *C. psittaci* (Accession numbers AF269281, X56980, Y16561, AF269265, L25436, AF269266, EF375557, X12647, AY762613, EU159263, AB284062 et AF269259) par alignement grâce à l'outil Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

1.2 Etude ponctuelle dans deux abattoirs de volailles A et B

Publications n°1 et n°2

1.2.1. *Prélèvements animaux*

En février 2013, des prélèvements ont été effectués sur tous les lots de volailles abattus durant une semaine dans les abattoirs A (abattant uniquement des canards) et B (abattant d'autres espèces de volailles, principalement du poulet et de la dinde mais pas de canards). Pour chaque lot, 15 écouvillons cloacaux ont été prélevés arbitrairement par le personnel de l'abattoir après l'étape de plumaison. Les prélèvements ont été envoyés au laboratoire puis stockés à -80°C jusqu'à analyse.

Des prélèvements supplémentaires ont été effectués selon le même protocole dans l'abattoir B en novembre 2012, juin et septembre 2013, et également durant une journée en décembre 2012 à l'occasion de l'abattage de volailles festives.

1.2.1.1. *Extraction d'ADN*

Les écouvillons cloacaux ont été soumis au même protocole d'extraction d'ADN qu'indiqué en **Annexe 1**.

1.2.1.2. *Analyse par PCR en temps réel*

Tous les ADN ont été soumis à la PCR en temps réel ciblant le gène 23S rRNA telle que décrite en 1.1.1.3. Les ADN positifs ont ensuite été analysés par la seconde PCR ciblant le gène *incA* et spécifique de l'espèce *C. psittaci*, mais également par une PCR en temps réel ciblant le gène 16S rRNA et spécifique de l'espèce *C. gallinacea* [90]. Un témoin positif (souche Loth de *C. psittaci* pour la PCR 23S rRNA et la PCR *incA*, et la souche 08-1274/3 de *C. gallinacea* pour la PCR 16S rRNA) et un témoin négatif (eau stérile) ont été systématiquement inclus. Les échantillons dont le Cq était supérieur à 40 ont été considérés comme négatifs.

Chaque lot contenant au moins un animal positif a été considéré comme positif, et un lot contenant au moins 50 % d'animaux positifs avec un Cq moyen ≤ 35 a été considéré comme moyennement à fortement positif.

1.2.1.3. *Génotypage et séquençage*

Le gène *ompA* des échantillons positifs vis-à-vis de *C. psittaci* ou *C. gallinacea* a été séquencé à l'aide des amorces 5GPF/3GPB ou Chomp191/371 respectivement [88, 372]. Les séquences obtenues ont été comparées entre elles et par rapport à des séquences de référence des différents génotypes de *C. psittaci* (Accession numbers AF269281, X56980, Y16561, AF269265, L25436, AF269266, EF375557, X12647, AY762613, EU159263, AB284062 et

AF269259) ou par rapport à une séquence connue de *C. gallinacea* (Accession number GQ398038) par alignement grâce à l'outil Multalin.

Les échantillons positifs par la PCR 23S rRNA spécifique des *Chlamydiaceae* mais négatifs vis-à-vis de *C. psittaci* et de *C. gallinacea* ont été soumis au séquençage partiel du gène 16S rRNA à l'aide des amorces 16S1 [373] et rp2 [9]. Les séquences obtenues ont été analysées grâce à l'outil BLAST (NCBI).

1.2.2. Prélèvements humains

Dans les deux abattoirs A et B, l'ensemble du personnel a été convié à une réunion détaillant les objectifs de l'étude et son déroulement. Une fiche d'information leur a été remise. Les personnes volontaires ont été recensées par la maîtrise des entreprises en collaboration avec la médecine du travail. Un consentement écrit a été requis pour chacun.

Le personnel volontaire a été soumis à un entretien médical avec un questionnaire portant sur leur expérience, les postes occupés, l'ancienneté, les éventuelles expositions extra-professionnelles aux oiseaux, les antécédents etc. A l'occasion de cet entretien, un écouvillon pharyngé a été prélevé, ainsi qu'un échantillon de sang renouvelé au bout de 30 jours (J_0 et J_{30}). Pour des raisons techniques, les prélèvements humains n'ont pas pu être effectués en parallèle des prélèvements animaux et ont été réalisés en avril et mai 2013 pour l'abattoir A et en mai et juin 2013 pour l'abattoir B.

1.2.2.1. Extraction d'ADN et détection par PCR en temps réel

Les écouvillons pharyngés ont été soumis à une extraction d'ADN à l'aide du système automatisé MagNA Pure (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les ADN ont été analysés à l'aide de PCR spécifiques de *Chlamydiaceae* puis de *C. psittaci* telles que décrites en 1.1.1.3. Ces analyses ont été réalisées par le CNR *Chlamydia* (Bordeaux).

1.2.2.2. Sérologie

1.2.2.2.1. Micro immunofluorescence

Un test de MIF commercialisé (*Chlamydia* MIF, Focus, Eurobio, France) a été utilisé pour analyser les sera. Cet essai détecte les réponses aux IgG et IgM vis-à-vis de *C. psittaci*, *C. trachomatis* et *C. pneumoniae*. Les résultats présentés pour les IgG correspondent à la plus forte dilution du sérum donnant une fluorescence. Concernant les IgM, seule la dilution au $1/16^{\text{ème}}$ a été testée et le résultat est positif ou négatif. Ces analyses ont été réalisées par le CNR *Chlamydia* (Bordeaux).

1.2.2.2.2. *RecomLine*

Les séras ont également été analysés grâce au test commercialisé *RecomLine Chlamydia IgG strip assay* (Mikrogen, Neuried, Allemagne). Ce test sous forme de bandelette permet de détecter des réponses vis-à-vis d'antigènes recombinants spécifiques de *C. psittaci*, *C. trachomatis* et *C. pneumoniae*. Un score est attribué en fonction des réactions observées pour chaque antigène et le score final permet de donner un résultat négatif, douteux ou positif pour chacune des trois espèces de *Chlamydia*.

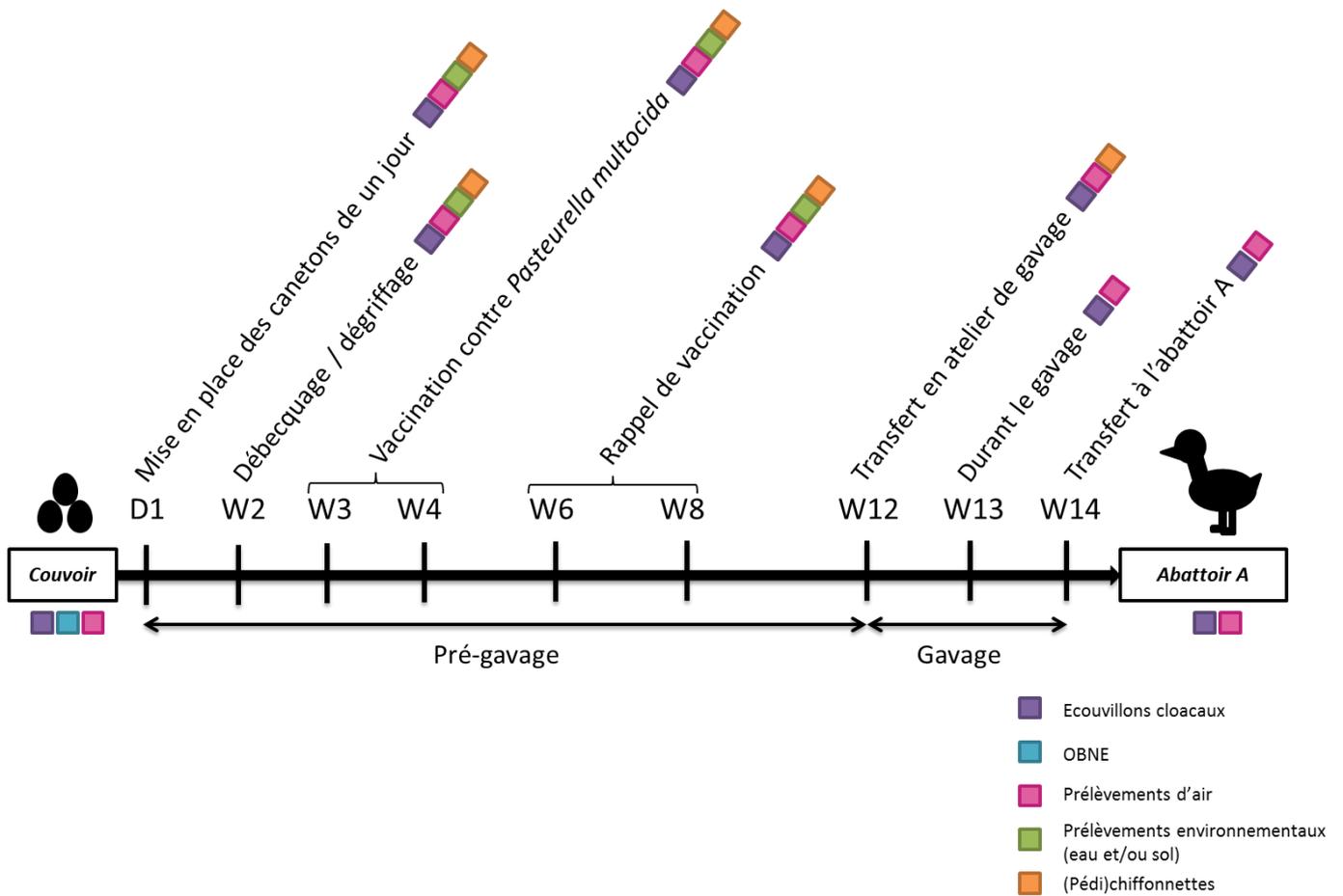


Figure 17 : Schéma du processus d'élevage du canard Mulard, date et type des interventions auprès des animaux et prélèvements effectués.

1.3 Suivi de sept lots de canards Mulard du couvoir à l'abattoir

Publication n°3

Cette étude a été menée auprès de sept lots de canards Mulard (A1, A2, B, C, D1, D2 et E) répartis dans cinq élevages (A à E). Quatre des cinq élevages (A à D) inclus lors de cette étude ont été sélectionnés suite à la détection par PCR en temps réel de *C. psittaci* dans la quasi-totalité voire la totalité de 10 écouillons cloacaux réalisés sur les animaux âgés de 8 semaines présents dans les élevages en novembre 2012. Un élevage supplémentaire a été ajouté à l'étude car il avait fait l'objet de prélèvements réguliers toujours très positifs vis-à-vis de *C. psittaci*. De janvier à juillet 2013, des prélèvements ont été effectués dans chaque lot à chacune des étapes nécessitant la manipulation des animaux par l'Homme, du couvoir à l'abattoir.

1.3.1. *Prélèvements effectués*

Le détail des prélèvements effectués est présenté en **Figure 17**. Les prélèvements ont été expédiés au laboratoire puis stockés à +4°C (air, eau, sol et (pédi)chiffonnettes) ou à -80°C (écouvillons et OBNE) avant analyse.

1.3.1.1. *Couvoir*

Au couvoir pour chaque lot, 15 OBNE ont été prélevés arbitrairement, 15 écouillons cloacaux ont été effectués au hasard sur les canetons âgés d'un jour et des prélèvements d'air ont été réalisés au moment de l'éclosion et du sexage.

En fonction des lots, les canetons pouvaient provenir de deux parquets différents au couvoir. Dans ce cas, et selon la disponibilité du personnel, les prélèvements ont été effectués soit sur les deux parquets, soit sur un seul.

1.3.1.2. *Elevages de pré-gavage*

Dès la mise en place des canetons âgés d'un jour dans les élevages (de janvier 2013 pour le premier lot à avril 2013 pour le dernier), des prélèvements ont été effectués à chaque étape nécessitant l'intervention de l'Homme auprès des animaux, tels que présentés en **Figure 17**, à savoir : la mise en place des canetons d'un jour sur l'élevage, les éventuels débecquages et dégriffages, la vaccination contre *P. multocida* et son rappel ainsi que le transfert dans les ateliers de gavage.

Lors de la mise en place, les canetons ont été distribués soit:

- dans un même bâtiment de démarrage (lots B, C, D1 et D2),
- dans plusieurs bâtiments, auquel cas le bâtiment le plus grand et contenant le plus d'animaux possible a été choisi pour le suivi (lots A1 et A2),
- dans un unique bâtiment mais mélangé avec des canetons provenant d'un autre couvoir (lot E). Dans ce cas, il est possible que des prélèvements aient été effectués par la suite sur des animaux provenant de l'autre couvoir, bien qu'ils aient été en minorité.

A chaque temps de prélèvement, 15 écouillons cloacaux ont été effectués arbitrairement sur les animaux. Afin de tenter d'isoler les souches de *C. psittaci* impliquées, les écouillons ont été effectués en double lors du rappel de vaccination, car cette étape correspondait au pic d'excrétion classiquement décrit lors des précédentes études. Deux échantillons d'air ont également été réalisés à chaque étape de la mise en place jusqu'au transfert en ateliers de gavage.

Des prélèvements environnementaux ont été réalisés en élevages de pré-gavage à raison de deux échantillons d'eau de boisson et cinq échantillons de sol (fientes, paille, terre...) prélevés à chaque étape de la mise en place jusqu'au rappel de vaccination, excepté lors du dégriffage/débecquage où seuls les prélèvements d'eau ont été réalisés. De plus, des pédichiffonnettes ont été portées sur l'ensemble de la surface du bâtiment et/ou du parcours extérieur à chaque étape de la mise en place jusqu'au rappel de vaccination, et une chiffonnette a été passée sur les murs du bâtiment de desserrage lors du transfert en atelier de gavage, si celui-ci abritait encore les animaux et/ou n'avait pas encore été nettoyé.

1.3.1.3. Ateliers de gavage

Compte tenu de la taille importante des lots suivis (de 2 500 à 8 000 canards), ceux-ci ont été transférés dans plusieurs ateliers de gavage. Un seul atelier par lot a été sélectionné pour la poursuite du suivi, pour des raisons pratiques et économiques. Pour des questions d'homogénéité avec l'étude précédente [1], seuls les ateliers de gavage en cages individuelles ont été retenus et, dans la mesure du possible, l'atelier accueillant le plus grand nombre de canards et se situant proche de l'abattoir A a été sélectionné.

Pour les lots A1 et D1, les canards ont été mélangés en atelier de gavage avec des animaux provenant d'autres lots non inclus dans l'étude, mais ces derniers ne représentant qu'une minorité.

Pour chaque lot, 15 écouillons cloacaux ont été réalisés arbitrairement au cours du gavage et lors de l'enlèvement pour le transfert à l'abattoir. Deux prélèvements d'air ont également été effectués lors de la mise en place en gavage, au cours du gavage et à l'enlèvement.

1.3.1.4. *Abattoir A*

Lors de l'abattage, 15 écouvillons cloacaux ont été réalisés arbitrairement pour chaque lot après l'étape de plumaison. Des analyses d'air ont également été effectuées au niveau du quai de déchargement et du poste d'accrochage des volailles.

1.3.2. *Extraction d'ADN*

Les écouvillons cloacaux, les OBNE et les prélèvements d'air ont été traités comme indiqué en 1.1.1.2.

1.3.2.1. *Prélèvements d'eau et de sol*

Les prélèvements d'eau et de sol ont été soumis à des étapes d'extraction supplémentaires afin de collecter également l'ADN d'éventuelles amibes enkystées. Tout d'abord, 35 mL de chaque échantillon d'eau ont été centrifugés durant 1 h à 26 500 *g*, puis le culot a été repris dans 500 µL de PBS. Un échantillon de 5 g de chaque prélèvement de sol a été mélangé dans 10 mL de PBS et 500 µL de surnageant ont été prélevés après sédimentation. Les deux types de prélèvements ont ensuite été soumis à cinq cycles de chocs thermiques consécutifs de 2 min dans un bain d'éthanol à -80°C puis 1 min 30 dans un bain sec à 99°C. Après remise en suspension, les prélèvements ont été ribolysés selon trois cycles de 15 sec à 6 000 rpm et 15 sec de repos (Precellys 24). Un pulse a été effectué afin de faire tomber les billes de ribolyse au fond du tube, et 200 µL de surnageant ont été utilisés pour effectuer une extraction d'ADN selon le même protocole que les écouvillons cloacaux, mais adapté pour un volume de 200 µL (valeurs en rouge dans le protocole présenté en **Annexe 1**).

1.3.2.2. *Pédichiffonnettes et chiffonnettes*

Les paires de pédichiffonnettes et les chiffonnettes ont été placées dans des sacs en plastique avec 30 mL de PBS puis malaxées afin de remettre les poussières en suspension. Une extraction d'ADN a été effectuée sur 400 µL de surnageant selon le protocole utilisé pour les écouvillons cloacaux.

1.3.3. *Analyse par PCR en temps réel*

Tous les ADN issus des différents prélèvements ont été soumis à la première PCR en temps réel spécifique des *Chlamydiaceae* et ciblant le gène 23S rRNA, puis à la PCR spécifique de *C. psittaci* ciblant le gène *inca* pour les échantillons positifs. Un témoin positif (souche Loth de *C. psittaci*) et un témoin négatif (eau stérile) ont été systématiquement inclus. Un contrôle interne d'inhibition (Taqman exogenous internal positive control, Applied Biosystems) a été inclus pour l'analyse des prélèvements environnementaux (eau, sol et

(pédi)chiffonnettes). En cas d'inhibition, la PCR a été réalisée de nouveau en diluant l'échantillon au 1/10^{ème}. Les échantillons présentant une valeur de Cq supérieure à 40 ont été considérés comme négatifs.

1.3.4. *Génotypage de C. psittaci*

Les ADN les plus concentrés (Cq ≤ 30) provenant à la fois d'écouillons cloacaux et de prélèvements environnementaux ont été analysés afin de déterminer le génotype de *C. psittaci* impliqué. Le gène *ompA* a été amplifié à l'aide des amorces 3GPF/5GPB [372]. Les séquences ont été analysées tel que précisé en 1.1.2.3.

1.3.5. *Détection et séquençage du bactériophage Chp1*

1.3.5.1. *Par PCR en temps réel*

L'ensemble des échantillons obtenus dans le cadre du suivi effectué en élevage a été soumis à une analyse par PCR en temps réel ciblant le gène ORF 1, codant pour la protéine majeure VP1 du bactériophage Chp1 infectant *C. psittaci*. Les amorces utilisées étaient VP1_Chp1_forw (5'-CCG CCT TTT GTT AAG GGT GA-3') et VP1_Chp1_rev (5'-ATG AAC GCC AAA ATG ACC TTG-3') et la sonde VP1_Chp1_probe (5'-FAM-GTT TAT GTT GAT TTA GCG GCT TCA-TAM-3'). Ces amorces/sonde ont été dessinées dans le cadre de ce projet grâce à l'outil Primer Express et soumises à un protocole d'amplification classique.

1.3.5.2. *Par PCR conventionnelle et séquençage*

Afin de valider la détection du bactériophage Chp1 et de comparer les séquences obtenues, deux nouveaux couples d'amorces de PCR conventionnelle ont été dessinés grâce à l'outil PRIMER-BLAST. Les amorces VP1-forw (5'-TGG TAC GAC TGT TGC CCA AA-3') et VP1-rev (5'-CAG GCT GCT CTC CCA AAT GA-3') ciblant le gène ORF 1 et les amorces VP2-forw (5'-TTT GGC GGT CTT GCT TCA GG-3') et VP2-rev (5'-CAG GCA ACA ACT TGC CAG C-3') ciblant le gène ORF 2, codant pour la protéine mineure VP2. Pour chaque lot suivi, les ADN issus des écouillons cloacaux et ayant donné les résultats les plus positifs par le biais de la PCR en temps réel spécifique des *Chlamydiaceae* ont été soumis à une PCR conventionnelle avec ces deux couples d'amorces selon le cycle suivant : une étape initiale de dénaturation à 95°C durant 10 min, puis 30 cycles d'amplification consistant en 30 sec de dénaturation à 95°C, 30 sec d'hybridation des amorces à 58°C et 1 min d'élongation à 72°C et enfin une incubation de 10 min à 72°C.

Une sélection de sept ADN ayant engendré les signaux les plus forts lors de la migration sur gel d'agarose a été envoyée pour séquençage à Eurofins Genomics. Les séquences obtenues

ont été comparées entre elles et par rapport à une séquence référence (Access number D00624.1) par alignement grâce à l'outil Multalin.

1.3.6. Détection des amibes

Tous les ADN issus de prélèvements d'eau et de sol ont été analysés par PCR conventionnelle à l'aide de deux couples d'amorces ciblant le gène 18S rRNA selon le cycle suivant : une étape initiale de dénaturation à 94°C durant 1 min 30, puis 40 cycles d'amplification consistant en 30 sec de dénaturation à 94°C, 1 min d'hybridation des amorces à 62°C et 2 min d'élongation à 72°C et enfin une incubation de 10 min à 72°C. Les amorces utilisées étaient Amo_1400_F/Amo_1540_R spécifiques de l'embranchement des *Amoebozoa* et Vahl_560_F/Vahl_730_R spécifiques des *Vahlkampfiidae* [374].

1.3.7. Questionnaire soumis aux éleveurs

Un questionnaire a été soumis en face-à-face aux éleveurs et portait sur l'organisation de l'exploitation, les pratiques d'élevages et les pratiques de nettoyage et désinfection. Une copie du questionnaire avec les réponses apportées par les éleveurs est présentée en **Annexe 3**.

1.3.8. Analyses statistiques des résultats

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS (Statistical Package for Social Science, version 22, IBM) par V. Siarkou et L. Angelis (Aristotle University of Thessaloniki, Grèce). La p-value était fixée à 0,05 pour tous les tests. Seuls des tests non paramétriques ont été utilisés à cause du manque de normalité des données.

De possibles corrélations ont été analysées grâce au test non paramétrique de corrélation de Spearman entre les variables indépendantes d'excrétion et de niveau d'excrétion de *C. psittaci*, de contamination de l'air et de l'environnement, d'excrétion du bactériophage Chp1 ainsi que d'autres variables portant sur les pratiques d'élevage, de nettoyage et désinfection et les activités des travailleurs. L'effet du lieu de vie des animaux sur l'excrétion de *C. psittaci* a été analysé grâce aux tests non paramétriques de Mann-Whitney et Kruskal-Wallis. Le test de Mann-Whitney a également été utilisé pour analyser l'impact de la présence des amibes dans l'environnement sur la contamination par *C. psittaci* des prélèvements environnementaux. Et le test de Kruskal-Wallis a permis d'analyser l'impact des types d'intervention et du mois de l'année sur la prévalence de *C. psittaci*.

2. Etude de la survie de *Chlamydia psittaci* par des modèles *in vitro*

2.1 Culture cellulaire

Les cellules de rein de singe de lignée BGM (Buffalo Green Monkey) ont été cultivées en milieu Minimum Essential Medium (MEM, Sigma-Aldrich) supplémenté en L-glutamine et en Sérum de Veau Fœtal (SVF, Sigma-Aldrich) à 5 % et incubées dans une étuve à 37°C avec 5 % de CO₂.

2.2 Infection des cellules par *C. psittaci*

Les tapis cellulaires confluents ont été infectés par *C. psittaci*. Lors d'infection en tubes bijoux (tubes de culture contenant une lamelle de verre), une centrifugation lente a été réalisée à 3 400 *g* durant 1 h et à 37°C afin d'améliorer le rendement de l'infection. Cela a également été appliqué aux plaques de culture P6 à 1 000 *g*. Après centrifugation, le milieu a été remplacé par du milieu frais UltraMDCK (Ozyme) supplémenté à 1 % d'acides aminés (MEM Non-essential Amino Acid Solution, Sigma-Aldrich) et à 1 % de vitamines (MEM Vitamin Solution, Sigma-Aldrich), et les cultures infectées ont été incubées à 37°C sans CO₂.

2.3 Titrage par Immunofluorescence directe (IFD)

Pour le titrage de l'inoculum de départ, celui-ci a été rapidement décongelé dans un bain marie à 37°C. Puis, quatre dilutions allant de 10⁻³ à 10⁻⁶ ont été préparées et 200 µL de chacune de ces dilutions ont été utilisés pour infecter des cellules BGM cultivées en tube bijoux.

La coloration par IFD a été effectuée avec le kit commercial IMAGEN *Chlamydia* (Thermo Scientific) sur les lamelles des tubes bijoux 24 h après infection. Ce temps d'incubation a été établi au préalable selon la vitesse de multiplication de *C. psittaci*, le but étant d'observer les inclusions lorsqu'elles sont d'une taille suffisante, mais avant que les cellules ne soient lysées. La coloration permet alors d'estimer le titre bactérien par comptage au microscope à la dilution la plus aisée, c'est-à-dire celle présentant un nombre d'inclusions par champ facilement comptable. Le nombre d'inclusions a été compté dans 20 champs sélectionnés au hasard sur la lamelle, puis le titre bactérien a été déterminé selon la formule suivante :

Titre bactérien estimé = 5 * Nombre moyen d'inclusions par champ * rapport de grossissement * 10^x

Le titre est exprimé en IFU/mL (Inclusion Forming Unit par mL).

Il est nécessaire de multiplier par 5 afin d'obtenir un titre en mL, car 200 μ L ont été utilisés pour l'infection.

Le rapport de grossissement a été déterminé en fonction de l'objectif utilisé pour le comptage.

10^x représente l'opposé de la dilution d'inoculum utilisée pour le comptage.

2.4 Etude de la survie de *C. psittaci* souche 06-859 maintenue à différentes conditions de température

Un inoculum de la souche 06-859 de *C. psittaci* (génotype E/B) a été préparé sur cellules BGM.

2.4.1. *Mise en place des échantillons*

Trois températures ont été testées : -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$ et $+20^{\circ}\text{C}$. Afin de faciliter l'étape de titrage effectuée aux différents temps de prélèvements, l'inoculum de *C. psittaci* souche 06-859 a été dilué de 10^{-2} à 10^{-7} et les dilutions ont été placées à chaque condition de température. Ces dilutions ont été effectuées en cascade dans du PBS et ont toutes été préparées à partir d'un même inoculum de départ, puis aliquotées et réparties dans les différentes enceintes en quintuplicat (S1 à S5).

2.4.2. *Prélèvements*

Des prélèvements ont été effectués à J₂, J₇, J₉, J₁₄, J₁₆, J₂₁, J₃₀ et J₆₀ après la mise en place des échantillons dans leurs enceintes respectives. A chaque temps de prélèvement, 200 μ L de chaque dilution (10^{-2} à 10^{-7}) de chaque série (S1 à S5) et à chaque température (-20°C , $+4^{\circ}\text{C}$ et $+20^{\circ}\text{C}$) ont été utilisés pour infecter un tapis cellulaire en tube bijou. Le titrage a été réalisé par IFD comme indiqué en 2.3.

2.4.3. *Analyse statistique des résultats*

Les résultats de cette étude (avec les titres bactériens exprimés en \log_{10}) ont été analysés selon un modèle mixte. La température (considéré comme une variable catégorielle avec trois valeurs distinctes, -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$ et $+20^{\circ}\text{C}$, $+4^{\circ}\text{C}$ étant considérée comme la valeur de référence) et le jour (également considéré comme une variable catégorielle) ont été traités comme des effets fixes, et les répétitions traitées comme des effets aléatoires. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R 3.2.2 par Benoît Durand (ANSES, EPI) [375].

2.5 Etude des interactions entre *C. psittaci* et *A. castellanii*

Les interactions entre *C. psittaci* et *A. castellanii* ont été étudiées afin de tenter de déterminer si cette association pourrait permettre une survie dans l'environnement de la bactérie. Un total de trois essais indépendants a été réalisé.

2.5.1. Lyse mécanique de l'inoculum de *C. psittaci*

La souche de *C. psittaci* 06-859 a été utilisée. Un premier essai non abouti de co-culture entre *C. psittaci* et *A. castellanii* avait mis en évidence par microscopie la présence de structures cellulaires dans lesquelles les *Chlamydia* étaient enfermées. Une étape supplémentaire de lyse mécanique a donc été réalisée sur l'inoculum afin de libérer les *Chlamydia* piégées et de les rendre disponibles pour l'infection des amibes. Pour cela, 500 µL d'inoculum ont été rapidement décongelés dans un bain marie à 37°C puis centrifugés 40 min à 20 000 *g* afin de récupérer l'ensemble des *Chlamydia*. Le culot a été repris dans 500 µL de PBS et soumis à deux étapes de congélation à -80°C et décongélation à 37°C. La suspension a été centrifugée 10 min à 500 *g* afin d'éliminer les gros débris cellulaires, et le surnageant a été de nouveau centrifugé 40 min à 20 000 *g*. Le culot contenant les *Chlamydia* a ensuite été repris dans 500 µL de PBS, et 10 µL de cet inoculum lysé ont été utilisés afin d'effectuer un nouveau titrage par IFD.

2.5.2. Culture de *A. castellanii*

Les trophozoïtes d'*A. castellanii* ont été cultivés à 25°C en milieu axénique PYG (la recette est précisée en **Annexe 2**) supplémenté en antibiotiques (pénicilline à 100 U/mL et streptomycine à 100 µg/mL) dans des flasques de culture de 175 cm². Un passage a été effectué toutes les semaines, lors duquel le tapis de trophozoïtes était décollé en tapant la flasque. Ensuite, 10 mL de suspension ont été récupérés et transférés dans une nouvelle flasque de 175 cm² contenant 65 mL de PYG frais supplémenté en antibiotiques.

2.5.3. Infection de *A. castellanii* par *C. psittaci*

Les amibes ont été placées dans des puits de plaques de culture P6 à raison de 5.10⁵ amibes/puits, dans 2 mL de PYG 0,1X sans antibiotiques. Ces plaques ont ensuite été incubées quelques heures à 25°C afin de laisser le temps aux trophozoïtes d'adhérer à la surface. Ensuite, *A. castellanii* a été infectée par *C. psittaci* et les plaques de culture ont été centrifugées pendant 1 h à 25°C et 1 000 *g*. Le milieu a ensuite été remplacé par 2 mL de

PYG 0,1X frais et les plaques ont été incubées à 25°C. Le reliquat d'inoculum lysé de *C. psittaci* a été aliquoté et congelé à -80°C.

2.5.4. *Essai 1 - Infection de A. castellanii par C. psittaci et analyse par PCR*

Dans ce premier essai, des tapis d'*A. castellanii* ont été infectés par *C. psittaci* selon quatre MOI (nombres de *Chlamydia* pour une amibe) : 1, 50, 100 et 200. Les MOI ont été calculées en fonction du titre de départ de l'inoculum, avant lyse mécanique. Le titre réel de l'inoculum lysé calculé durant l'essai a permis de réévaluer ces MOI lors de l'analyse des résultats. Les tapis d'amibes ont été récupérés par grattage et analysés par PCR en temps réel afin de 1) détecter l'ADN d'éventuelles *Chlamydia* internalisées et 2) suivre l'évolution du titre pour évaluer si les *Chlamydia* présentes semblent être dégradées ou survivre, voire se multiplier.

2.5.4.1. *Prélèvements*

Les prélèvements ont été effectués à J₁, J₂, J₃, J₄ et J₈ post-infection. Chaque veille de prélèvement, une aliquote d'inoculum congelée a été utilisée pour infecter un puits de plaque P6 contenant un tapis cellulaire BGM, afin de constituer un témoin positif pour la détection par PCR. A chaque temps de prélèvement, une plaque P6 contenant 4 MOI et un témoin négatif, ainsi qu'un témoin positif ont donc été utilisés. Le milieu de culture a été éliminé et remplacé par 1 mL de PBS frais. Les amibes (ou cellules pour le témoin positif) ont été récupérées par grattage à l'aide d'un râteau. Les suspensions ont ensuite été centrifugées 10 min à 500 g afin de ne récupérer que les amibes et les *Chlamydia* internalisées et/ou fixées à la membrane des amibes. Le culot a été repris dans 500 µL de PBS puis soumis à une extraction d'ADN.

2.5.4.2. *Extraction d'ADN*

Afin d'extraire l'ADN des *Chlamydia* éventuellement internalisées par les amibes, la méthode d'extraction efficace sur les kystes décrite en 1.3.2.1. a été utilisée. Les amibes infectées étaient sous forme de trophozoïtes, cependant certaines se sont décollées durant l'incubation et pourraient s'être enkystées, il était donc préférable d'effectuer une lyse active sur les kystes.

2.5.4.3. *PCR en temps réel*

Les ADN obtenus ont été analysés par PCR en temps réel spécifique des *Chlamydiaceae* ciblant le gène 23S rRNA.

2.5.5. *Essai 2 - Infection de A. castellanii par C. psittaci et analyse par culture*

Suite aux résultats obtenus dans l'**Essai 1**, de nouvelles co-cultures ont été réalisées et analysées par IFD afin de détecter si les *Chlamydia* présentes dans les grattages de tapis de *A. castellanii* étaient viables et infectieuses. Les milieux de culture ont également été analysés afin de détecter les *Chlamydia* libres et suivre l'évolution du titre bactérien.

La souche de *C. psittaci* 06-859 a été soumise à une lyse mécanique comme indiqué en 2.5.1. et a été utilisée pour infecter *A. castellanii* selon le protocole indiqué en 2.5.3. Les MOI ont été fixées à 1, 50, 100 et 200 à partir du titre de l'inoculum lysé de la précédente expérience ($1,0 \cdot 10^9$ IFU/mL).

Les prélèvements ont été effectués à J₁, J₂, J₃ et J₇ post-infection.

Pour chaque temps de prélèvement, une plaque de culture P6 (contenant les quatre MOI et un témoin négatif) a été utilisée pour l'analyse par IFD. Le milieu de culture a été ôté et récupéré dans des microtubes, et les amibes ont été collectées par grattage dans 1 mL de PBS. Les suspensions ont ensuite été centrifugées 10 min à 500 *g* afin de ne récupérer que les amibes et les *Chlamydia* internalisées et/ou fixées à la membrane des amibes. Le culot a été repris dans 250 µL de Triton-X-100 à 0,04 % afin de lyser les amibes et de libérer les éventuelles bactéries internalisées. Le traitement au Triton-X-100 a été effectué durant 15 min à température ambiante en pipetant régulièrement les suspensions. Puis, les tubes ont été centrifugés à nouveau pendant 10 min à 1 000 *g* afin de culoter les gros débris et les surnageants ont été collectés. Des tubes bijoux ont été infectés avec 200 µL de chaque surnageant ou milieu d'incubation préalablement récupérés. L'IFD a été effectuée selon le protocole décrit en 2.3.

2.5.6. *Essai 3* - Infection de *A. castellanii* par *C. psittaci* et analyse par MET

Suite à la détection par IFD de *C. psittaci* dans les grattages d'amibes de l'*Essai 2*, de nouvelles co-culture ont été réalisées et analysées par MET afin de visualiser d'éventuelles *Chlamydia* internalisées par *A. castellanii*.

Les co-cultures ont été réalisées comme indiqué en 2.5.3. à une unique MOI de 200, à raison de six puits de plaque P6 ainsi que deux puits témoin ne contenant que des amibes.

2.5.6.1. *Fixation des co-cultures*

Les prélèvements ont été effectués à 24h post-infection. Le milieu a été ôté et trois lavages successifs avec 1 mL de PBS à température ambiante ont été réalisés. Chaque co-culture a ensuite été fixée grâce à une solution de fixation à 2,5 % de glutaraldehyde (Glutaraldehyde solution 25 %, Sigma-Aldrich) et 2 % de paraformaldehyde (Paraformaldehyde, Sigma-Aldrich). Les fixations ont été réalisées durant 30 min à température ambiante puis 30 min à +4°C. La solution de fixation a ensuite été enlevée et un rinçage au PBS effectué. Les tapis d'amibes ont été récupérés dans 500 µL de PBS à l'aide d'un râteau et placés dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL à raison de 3 puits de plaque P6 par tube pour les co-cultures et 2 puits pour le témoin négatif. Les tubes ont été centrifugés afin de sédimenter les amibes et placés à +4°C.

2.5.6.2. *Analyse par MET*

Les fixations ont été envoyées au laboratoire chargé de réaliser les analyses par MET aux Etats-Unis (Pr Hsia, Ru-Ching, Core Imaging Facility, University of Maryland).

Résultats

Mois de prélèvement	Ecouillons cloacaux		OBNE		Air		
	Nb pos / Nb tot ¹	Cq moyen	Nb pos / Nb tot ¹	Cq moyen	Nb pos / Nb tot ¹	Cq moyen	
2012	Avril	0/15	-	0/60	-	0/5	-
		0/15	-	0/60	-	0/4	-
	Mai	0/15	-	0/60	-	0/5	-
	Juin	0/15	-	0/60	-	1/5	39,8
	Juillet	0/15	-	1/60	38,7	0/5	-
	Août	0/15	-	0/60	-	0/5	-
	Septembre	0/15	-	0/60	-	0/5	-
	Octobre	0/15	-	0/60	-	0/5	-
	Novembre	0/15	-	0/60	-	0/5	-
Décembre	0/15	-	0/60	-	0/4	-	
2013	Janvier	0/15	-	0/60	-	0/5	-
	Février	0/15	-	0/60	-	0/2	-
		0/15	-	2/60	39,5		
	Mars	0/15	-	1/60	38,8	0/2	-
	Avril	0/15	-	0/60	-	0/5	-
0/15		-	0/60	-			

1 Nombre d'échantillons positifs sur le nombre total de prélèvements testés

Tableau 6 : Résultats des PCR ciblant le gène 23S rRNA pour les prélèvements effectués durant un an en couvoir de canards.

1. Prévalence des *Chlamydiaceae* en filières avicoles et exposition des professionnels

1.1 Filière canards Mulard : suivis ponctuels et mensuels pendant un an

1.1.1. *En couvoir*

D'avril 2012 à avril 2013, des prélèvements (écouvillons cloacaux, OBNE et prélèvements d'air) ont été réalisés chaque mois dans le couvoir de canards. Les résultats des analyses par PCR en temps réel de l'ensemble des échantillons sont présentés dans le **Tableau 6**.

En avril et décembre 2012, le prélèvement d'air habituellement effectué lors de la réception des œufs n'a pas pu être fait par manque de temps du personnel du couvoir en charge de la réalisation des prélèvements. Deux lots ont été prélevés en avril 2012. Les prélèvements effectués de janvier à avril 2013 ont été réalisés sur les lots mis en place dans le suivi de lots de canards Mulard présenté en 1.3. Cela explique que plusieurs lots aient été suivis pour un même mois.

Les écouvillons cloacaux réalisés sur les canetons âgés de un jour se sont tous révélés négatifs, de même que les prélèvements d'air, à l'exception d'un prélèvement effectué en juin 2012 lors du sexage des animaux qui s'est avéré être très faiblement positif (Cq proche de 40). Parmi les organes collectés par autopsie des OBNE, quatre organes se sont révélés positifs. Les quatre organes étaient un intestin prélevé en juillet 2012, une rate et un poumon prélevés sur deux OBNE distincts en février 2013 et un foie prélevé en mars 2013. Chacun de ces organes ne présentait qu'une faible positivité par PCR avec un Cq compris entre 38 et 40.

Ce suivi réalisé mensuellement durant un an dans un couvoir n'a pas permis de mettre en évidence une forte contamination des œufs ou de l'air ambiant, ni une excrétion chez les canetons âgés de un jour.

	Mois	Lot	Ec cloacaux		Air	
			Nb pos / Nb tot ¹	Cq moyen	Nb pos / Nb tot ¹	Cq moyen
2012	Mars	1-1	0/15	-	1/5	39,77 Quai de déchargement
		1-2	0/15	-		
		1-3	0/15	-		
		1-4	3/15	39,3		
		1-5	0/15	-		
	Avril	2-1	0/15	-	0/5	-
		2-2	0/15	-		
		2-3	0/15	-		
		2-4	0/15	-		
	Mai	3-1	3/15	36,2	0/5	-
		3-2	0/15	-		
		3-3	0/15	-		
		3-4	3/15	36,0		
		3-5	0/15	-		
		3-6	0/15	-		
	Juin	4-1	0/15	-	0/5	-
		4-2	0/15	-		
		4-3	0/15	-		
		4-4	0/15	-		
		4-5	0/15	-		
Juillet	5-1	0/15	-	0/5	-	
	5-2	0/15	-			
	5-3	0/15	-			
	5-4	0/15	-			
	5-5	0/15	-			
Août	6-1	0/15	-	0/5	-	
	6-2	0/15	-			
	6-3	0/15	-			
	6-4	0/15	-			
Septembre	7-1	0/15	-	0/5	-	
	7-2	1/15	39,0			
	7-3	0/15	-			
	7-4	0/15	-			
	7-5	0/15	-			
Octobre	8-1	1/15	39,9	1/5	39,13 Quai de déchargement	
	8-2	0/15	-			
	8-3	0/15	-			
	8-4	0/15	-			
Décembre	9-1	0/10	-	0/5	-	
	9-2	0/15	-			
	9-3	1/15	34,4			
	9-4	5/15	35,0			
	9-5	9/15	35,9			
2013	Janvier	10-1	0/15	-	1/5	39,87 Quai de déchargement
		10-2	4/15	30,9		
		10-3	5/15	35,8		
	Février	11-1	4/15	38,4	0/5	-
		11-2	0/15	-		
		11-3	3/15	39,0		
		11-4	4/15	39,4		
		11-5	8/15	38,2		
	Mars	12-1	3/15	37,8	2/5	38,79 Quai de déchargement Accrochage des volailles
		12-2	3/15	37,5		
		12-3	3/15	38,6		
		12-4	2/15	38,8		

¹ Nombre d'échantillons positifs sur le nombre total de prélèvements testés

Tableau 7 : Résultats des PCR ciblant le gène 23S rRNA pour les prélèvements effectués durant un an en abattoir de canards.

1.1.2. En abattoir A (canards exclusivement)

Tous les mois durant un an de mars 2012 à mars 2013, des écouvillons cloacaux ont été réalisés sur l'ensemble des lots abattus sur une journée dans l'abattoir A, spécialisé dans l'abattage de canards.

Les prélèvements n'ont pas pu être effectués en novembre 2012 suite à un problème de planning. De plus, dans le lot 9-1 seuls 10 animaux au lieu de 15 ont été prélevés en raison du faible effectif de ce lot et de la vitesse élevée de la chaîne d'abattage.

Les résultats de l'analyse par PCR en temps réel de l'ensemble des prélèvements sont présentés dans le **Tableau 7**.

Un total de 55 lots a été analysé et parmi ceux-ci, 18 lots ont présenté au moins un écouvillon cloacal positif par PCR en temps réel vis-à-vis des *Chlamydiaceae*. Parmi ces 18 lots, seulement trois présentaient un Cq moyen inférieur à 35, mais avec un nombre d'animaux positifs limité. L'occurrence de lots positifs était plus importante sur les mois de décembre à mars, les mois d'été de juin à août étant au contraire tous négatifs.

Les prélèvements d'air étaient majoritairement négatifs. La présence de *Chlamydiaceae* n'a pu être mise en évidence par PCR que dans cinq d'entre eux, tous présentant des valeurs de Cq très faibles, proches de 40. Ces prélèvements avaient été effectués en mars et octobre 2012, et janvier et mars 2013, sur le quai de déchargement pour les quatre premiers, ainsi que lors de l'accrochage des volailles pour le dernier. Ces deux postes de travail correspondent à des zones où les canards sont encore vivants et très agités et/ou manipulés. Le séquençage du gène *ompA* de six ADN issus d'écouvillons cloacaux prélevés en décembre 2012 et janvier 2013 a mis en évidence uniquement le génotype E/B, sous-génotype 06-859.

1.2 Etudes ponctuelles dans deux abattoirs de volailles A et B

Publications n°1 (publiée le 6 février 2015) et n°2

Les professionnels des filières avicoles sont fréquemment concernés par la psittacose, et tout particulièrement les employés des abattoirs. En 2008-2009, deux abattoirs de volailles de l'Ouest de la France ont eu à faire face à des cas fatals de psittacose impliquant une souche de *C. psittaci* classiquement isolée de canards. Le premier abattoir (abattoir A) est spécialisé dans l'abattage de canards (abattoir chez lequel un suivi sur une année a été réalisé, voir 1.1.2.). Le second (abattoir B) abat différentes espèces de volailles, à l'exception des canards.

Des écouvillons cloacaux ont été effectués en double sur 15 animaux choisis au hasard pour chaque lot abattu durant une semaine en février 2013 dans ces deux abattoirs. Des prélèvements supplémentaires ont été réalisés selon le même protocole dans l'abattoir B en

novembre 2012, juin 2013 et septembre 2013. Les ADN extraits des écouillons ont été analysés dans un premier temps à l'aide d'une PCR en temps réel ciblant la famille des *Chlamydiaceae*. Dans un second temps, les ADN positifs ont été analysés avec deux PCR en temps réel spécifiques de *C. psittaci* et *C. gallinacea*, respectivement.

Un suivi médical a été mis en place auprès du personnel volontaire de ces deux abattoirs, consistant en une visite médicale avec un questionnaire portant sur le poste occupé, l'ancienneté, les antécédents et les expositions extra-professionnelles aux oiseaux, et la réalisation de prélèvements (un écouillon pharyngé et deux prises de sang espacées de 30 jours).

Les écouillons pharyngés ont été analysés par PCR en temps réel ciblant *C. psittaci*, et les sérums par la technique de micro immunofluorescence (MIF) et à l'aide d'un kit commercial ciblant des antigènes recombinants de *Chlamydia* (RecomLine).

Les résultats ont montré une prédominance de l'espèce *C. psittaci* chez les canards et une prédominance de l'espèce *C. gallinacea* chez les autres volailles (particulièrement chez les poulets, dindes et pintades). La majorité des lots d'animaux hébergeait au moins un animal positif par PCR, avec toutefois en général de faibles charges bactériennes détectées. La présence de plusieurs lots fortement positifs a cependant été observée dans les deux abattoirs. En particulier, une *Chlamydia* atypique, bien différente de *C. psittaci*, a été détectée chez deux lots de canards fortement excréteurs provenaient d'un même élevage. Les prélèvements supplémentaires effectués sur les lots de canards mis en place par la suite dans ce même élevage n'ont pas permis de détecter à nouveau cette *Chlamydia* atypique qui avait été mise en évidence par le passé chez des goélands sauvages.

Les résultats du suivi médical ont mis en évidence une possible épidémie au sein de l'abattoir A, avec l'hospitalisation d'un membre du personnel en activité depuis peu. Au contraire, seules de très faibles réponses sérologiques ont été observées dans l'abattoir B, mais il est à noter que les tests sérologiques utilisés ne ciblent pas *C. gallinacea*, l'espèce quasi exclusivement détectée chez les animaux testés en provenance de cet établissement.

Publication n°1 : Host preference and zoonotic potential of *Chlamydia psittaci* and *C. gallinacea* in poultry.



FEMS Pathogens and Disease, 73, 2015, 1-11

doi: 10.1093/femspd/ftv005

Advance Access Publication Date: 6 February 2015

Research Article

RESEARCH ARTICLE

Host preference and zoonotic potential of *Chlamydia psittaci* and *C. gallinacea* in poultry

Virginie Hulin^{1,#}, Sabrina Oger^{2,#}, Fabien Vorimore¹, Rachid Aaziz¹, Bertille de Barbeyrac³, Jacques Berruchon², Konrad Sachse⁴ and Karine Laroucau^{1,*}

¹Paris-Est University, Anses, Animal Health Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, 94701 Maisons-Alfort, France, ²Regional hospital, Les Oudairies, 85000 La Roche-sur-Yon, France, ³National Reference Center for Chlamydia, University of Bordeaux, 33076 Bordeaux, France and ⁴OIE Reference Laboratory for Chlamydiosis, Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), 07743 Jena, Germany

*Corresponding author: ANSES, Animal Health Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, Paris-Est University, 94701 Maisons-Alfort, France. Tel: (33) 149 77 2686; E-mail: karine.laroucau@anses.fr

[#]VH and SO equally contributed to this work.

One sentence summary: *C. psittaci* has a certain preference for ducks, whereas *C. gallinacea* is predominant in chickens and guinea fowl. Editor: Georg Häcker

ABSTRACT

Chlamydia psittaci and *C. gallinacea* are obligate intracellular bacteria infecting poultry. We conducted a survey in two poultry slaughterhouses that were processing either exclusively ducks (A) or various poultry species except ducks (B). Cloacal swabs were collected from all incoming poultry flocks in the course of a week, and blood samples and pharyngeal swabs were taken from workers. Swabs were examined using PCR and sera were analyzed with two immunoassays. PCR testing revealed the presence of *C. psittaci* in 9/38 duck flocks and the complete absence of *C. gallinacea* in these flocks (slaughterhouse A), whereas 16/33 *Chlamydiaceae*-positive poultry flocks handled in slaughterhouse B harbored *C. gallinacea* only. In an episode of psittacosis in slaughterhouse A, where one PCR-positive worker presented clinical signs, seroconversions were detected in 10 workers. In contrast, serological responses of slaughterhouse B workers to *C. psittaci* were generally low. This is in line with the almost complete absence of *C. psittaci* in handled flocks, where in additional sampling campaigns the agent was detected only once in the course of a year. Our study indicates that *C. psittaci* has a certain preference for ducks, whereas *C. gallinacea* was the predominant chlamydial agent in chickens and guinea fowl flocks.

Key words: *Chlamydiaceae*; *C. psittaci*; *C. gallinacea*; slaughterhouse; duck; poultry; workers

INTRODUCTION

Avian chlamydiosis is a zoonotic disease known for centuries and caused by *Chlamydia psittaci*, a small obligate intracellular bacterium. Widespread throughout the world, *C. psittaci* can infect more than 450 bird species from 30 different orders (Kaleta and Taday 2003). In birds, clinical signs vary considerably in

severity and depend on the species and age of the bird, as well as the infecting strain involved. However, most *C. psittaci* infections remain asymptomatic.

Avian strains of *C. psittaci* are currently divided into 15 outer membrane protein A (OmpA) genotypes (Sachse et al., 2009), each one tending to be associated with certain species of birds. The main genotypes encountered in birds are designated by the

Received: 5 December 2014; Accepted: 15 January 2015

© FEMS 2015. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

letters A to F. Genotype A is usually found in psittacine birds, genotype B is most often associated with pigeons, but has also been reported in psittacines and turkeys, genotype C occurs in ducks and geese, genotype D has primarily been isolated from turkeys, genotype E occurs in pigeons and has also been isolated from sick ratites, ducks and turkeys, genotype F has been found in one turkey and a psittacine bird and genotype E/B has been reported in ducks, turkeys and pigeons.

Transmission to humans occurs through inhalation of aerosolized excretions (feces, ocular, nasal or respiratory secretions) (Smith et al., 2011). The infection, named psittacosis in humans, can lead to flu-like symptoms, such as fever, cough or headache, as well as severe respiratory problems. If undiagnosed and untreated, mortality can be as high as 15% (CFSPH 2009). Psittacosis is usually diagnosed using a combination of clinical signs and serology. The most commonly used criterion is a rising titer to *C. psittaci* in paired sera.

The risk of psittacosis is highest among individuals in direct contact with birds, e.g. poultry sector workers, veterinarians, pet shop employees and pet bird owners. Outbreaks of the disease are regularly reported (Tiong et al., 2007; Gaede et al., 2008; Petrovay and Balla 2008; Laroucau et al., 2009a; Rehn et al., 2013; Williams et al., 2013; Lagae et al., 2014).

Until recently, *C. psittaci* was considered to be the sole causative agent of avian chlamydiosis, but new evidence suggests that more chlamydial agents may be involved as two more avian chlamydiae, *C. avium* and *C. gallinacea* (Sachse et al., 2014), and one *Candidatus* taxon *C. ibidis* (Vorimore et al., 2013) were described. So far, *C. avium* has been encountered in pigeons and psittacine birds, whereas *C. gallinacea* has been most frequently found in chickens, guinea fowl and turkeys (Sachse et al., 2014).

In France, duck-related cases of psittacosis are regularly reported, but severe or fatal cases are rare (Laroucau et al., 2009a; Belchior et al., 2011; Carlier et al., 2014). The present study was prompted by two fatal cases among poultry slaughterhouse workers in 2008 and 2009 (Belchior et al., 2010). One of the slaughterhouses processed exclusively ducks, whereas the other handled various bird species, but no ducks. In both cases, genotype E/B of *C. psittaci*, a duck-associated genotype commonly identified in French duck flocks, had been detected by DNA sequencing in human samples. To characterize the epidemiological situation prevailing in 2013, a systematic survey was conducted in both slaughterhouses with the aim of examining poultry birds for the presence of *Chlamydiaceae*, identify the chlamydial species involved and assess the exposure of personnel to *C. psittaci* using PCR and serological testing.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Sampling

In February 2013, samples from all incoming flocks in two French slaughterhouses (A and B) were collected in the course of 1 week. In slaughterhouse B, additional rounds of sampling were conducted in November 2012, as well as in June and September 2013. Slaughterhouse A was handling only ducks, while B processed all types of poultry except ducks (chicken, turkey, guinea fowl, etc.). From each flock, 15 animals were randomly selected and subjected to cloacal swabbing just after plucking. Swabs were sent to the laboratory and stored dry at -80°C until processing.

Direct detection of *Chlamydiaceae* by real-time PCR

DNA extraction was performed on cloacal swabs using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). All DNA samples were analyzed as previously described using *Chlamydiaceae*-specific real-time PCR targeting the 23S rRNA gene (Ehrlich et al., 2006). All positive DNA samples were then tested with *C. psittaci*-specific real-time PCR targeting the *incA* gene (Menard et al., 2006) and with *C. gallinacea*-specific PCR targeting the 16S rRNA gene (Zocevic et al., 2012).

All samples with a quantification cycle (Cq) over 40 with the *Chlamydiaceae* PCR were considered as negatives. All flocks with at least one PCR-positive animal were classified as positives and those with at least 50% of positive animals and a mean Cq ≤ 35 were considered as moderately to highly positive flocks.

Partial sequencing of *ompA* and 16S rRNA gene loci

The *ompA* gene of *C. psittaci*-positive samples was amplified using CTU/CTL or Chomp191/371 primer sets as previously described (Laroucau et al., 2009b).

All samples testing *Chlamydiaceae* PCR positive, but *C. psittaci* and *C. gallinacea* PCR negative were subjected to partial amplification of the 16S rRNA gene using primers 16S1 (5'-CGGATCCTGAGAATTTGATC-3') (Pudjiasmoko et al., 1997) and rp2 (5'-CTACCTTGTTCAGACTTCAT-3') (Thomas, Casson and Greub 2006). Sequencing of the PCR products was carried out at MWG (Biotech France, Roissy, France). The GenBank accession numbers are as follows: LN626319 to LN626326 for *ompA* sequences and LN651093 for the 16S rRNA sequence.

Humans

Sampling

A total of 60 workers took part in this study, 28 from slaughterhouse A and 32 from slaughterhouse B. All participants provided informed consent. Further details are presented in Table 1. Participants provided a pharyngeal swab and a blood sample renewed after 30 days (D₀ and D₃₀). They also filled out a medical questionnaire giving years of experience, job activities, protective equipment worn, exposure to birds outside of their professional activities and possible history of psittacosis.

Direct detection of *Chlamydia* spp. from throat swabs

DNA was extracted from pharyngeal swabs using the automated MagNA Pure DNA extraction kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) (De Martino et al., 2006). All samples were tested with *Chlamydiaceae*-specific and *C. psittaci*-specific real-time PCRs as described above.

Serology

Immunofluorescence: A commercial immunofluorescence test (Chlamydia MIF, Focus, Eurobio, France) was used for detection of specific antibodies. This assay measures responses to IgM and IgG subclasses. Each well contains four spots, one yolk sac control and three individual antigen spots consisting of elementary bodies of *C. psittaci*, *C. trachomatis* and *C. pneumoniae* suspended in a yolk sac matrix. Each run included a positive (murine serum) and negative (human serum) control. The reciprocal of the highest serum dilution giving apple-green fluorescence was defined as serum endpoint titer for IgG. For IgM, one dilution was tested (1/16), and the result was assessed qualitatively, i.e. positive or negative. A 4-fold IgG rise was considered as evidence of an active infection.

Table 1. Description of the poultry worker panel that took part in the survey.

Slaughterhouse	Number of volunteers	Nb of men	Nb of women	Mean age	Number of new workers*	Working area							Non-occupational exposures to <i>C. psittaci</i>	Psittacosis history
						Transport	Maintenance	Slaughtering	Cutting/ packaging	Cleaning	Administration			
A	28	28	0	40	2	4	8	16	0	0	0	0	4	8
B	32	18	14	45	3	1	2	19	7	1	2	10	1	

*New worker = less than one year in the company.

Recombinant protein strip assay: Sera were also examined using the recomLine *Chlamydia* IgG strip assay (Mikrogen, Neuried, Germany), which carries purified recombinant antigens (MOMP, OMP2, TARP, CPAF, HSP60 and YwbM) of *C. psittaci*, *C. trachomatis* and *C. pneumoniae*. Analysis and interpretation were conducted as recommended by the manufacturer.

RESULTS

Examination of bird samples

In February 2013, a total of 38 flocks were sampled in slaughterhouse A in the course of 1 week, i.e. 23 flocks of fattening ducks and 15 flocks of thin ducks. The results of PCR testing are presented in Table 2. In 23/38 flocks (15 fat duck flocks and 8 thin duck flocks), at least one animal per flock was tested positive by *Chlamydiaceae*-specific PCR. The number of positive animals in these flocks was generally low, and the samples exhibited Cq values below 35. All samples with sufficient chlamydial DNA concentration proved *C. psittaci* positive, except for samples from the two fattening duck flocks of 13-532/34 and 13-532/35. Indeed, these samples from the same farm were diagnosed as *Chlamydiaceae* positive, but *C. psittaci* and *C. gallinacea* negative. Sequencing of 16S rRNA of one sample from each of the two flocks produced identical results. However, the dendrogram in Fig. 1 shows the distant position of this sequence (13-532/34.O012) in comparison with representatives of the established *Chlamydiaceae* spp. A BLAST search revealed that the sequence is closely related (95% identity) to an atypical strain of *Chlamydiaceae* that was found in Glaucous-winged gulls (*Larus glaucescens*) (GenBank accession no. GU068510) (Christerson et al., 2010).

In slaughterhouse B, all incoming poultry flocks on a given week were sampled quarterly for one year. Results are presented in Table 3. In summary, 31–33 flocks were analyzed in each sampling period, of which 9–21 flocks tested positive for *Chlamydiaceae*, with 3–5 flocks identified as moderately to highly positive for *C. gallinacea* in each sampling period.

In February 2013, a total of 33 flocks were sampled that included 20 chicken flocks (among them 13 *Chlamydiaceae* positive), 8 guinea fowl (5 *Chlamydiaceae* positive), 1 turkey (*Chlamydiaceae* negative), 1 cock (*Chlamydiaceae* negative), 2 hen flocks (both *Chlamydiaceae* positive) and a mixed flock (*Chlamydiaceae* positive). All the samples containing sufficient amounts of chlamydial DNA tested *C. gallinacea* positive. Most of these flocks were classified as low positive, and only three qualified as moderately to highly positive.

Taking all four sampling periods together, a single flock (13-2812/30, in September 2013) was found to harbor *C. psittaci*, which was genotyped E/B subtype 06-859 (data not shown). In all other positive flocks, *C. gallinacea* turned out to be the sole chlamydial agent. Table 3 also shows the results of *ompA* genotyping of samples from seven positive poultry flocks. Partial *ompA* sequences were almost identical within flocks, but differed between flocks in all cases (sequences arbitrarily designed S1 to S8).

Examination of human samples

Pharyngeal swabs

Among the 28 workers of slaughterhouse A that were examined, only two were positive by PCR, both in the first sampling period (Table 4). Pharyngeal swabs of all 32 workers of slaughterhouse B proved negative. The sample with the highest *Chlamydiaceae*-specific DNA content was from a 34-yr-old man (id.13), who

Table 2. Information and results on investigated duck flocks in slaughterhouse A on February 2013.

Period	Id	Duck breed	Number of birds	Chlamydiaceae PCR		C. psittaci PCR	C. gallinacea PCR	
				Nb pos/Nb tot	mean Cq			
February 2013	13-532/1	8144	Fattening duck	1269	1/15	39	0/1	0/1
	13-532/2	8145	Fattening duck	1118	0/15	-	-	-
	13-532/3	8146	Fattening duck	1303	1/15	39	1/1	0/1
	13-532/4	8147	Fattening duck	1116	0/15	-	-	-
	13-532/5	8148	Fattening duck	1331	0/15	-	-	-
	13-532/6	8149	Broiler duck	3084	1/15	40	0/1	0/1
	13-532/7	8150	Broiler duck	3353	0/15	-	-	-
	13-532/8	8151	Broiler duck	4202	0/15	-	0/1	0/1
	13-532/9	8152	Broiler duck	2782	0/15	-	-	-
	13-532/10	8157	Fattening duck	1291	0/15	-	-	-
	13-532/11	8158	Fattening duck	1310	1/15	40	0/1	0/1
	13-532/12	8159	Fattening duck	1014	2/15	38	1/2	0/2
	13-532/13	8161	Fattening duck	1043	4/15	39	1/4	0/4
	13-532/14	8162	Fattening duck	1334	2/15	39	1/2	0/2
	13-532/15	8163	Broiler duck	5826	1/15	39	0/1	0/1
	13-532/16	8164	Broiler duck	6600	0/15	-	-	-
	13-532/17	8169	Fattening duck	986	0/15	-	-	-
	13-532/18	8170	Fattening duck	1294	1/15	40	0/1	0/1
	13-532/19	8171	Fattening duck	1344	1/15	38	0/1	0/1
	13-532/20	8172	Fattening duck	765	0/15	-	-	-
	13-532/21	8174	Broiler duck	2960	1/15	39	0/1	0/1
	13-532/22	8175	Broiler duck	3372	0/15	-	-	-
	13-532/23	8176	Broiler duck	7350	0/15	-	-	-
	13-532/24	8181	Fattening duck	1069	5/15	38	3/5	0/5
	13-532/25	8182	Fattening duck	2215	5/15	38	5/5	0/5
	13-532/26	8183	Fattening duck	793	5/15	38	4/5	0/5
	13-532/27	8184	Fattening duck	1326	11/15	38	9/11	0/11
	13-532/28	8186	Broiler duck	5856	3/15	39	0/3	0/3
	13-532/29	8187	Broiler duck	6786	1/15	39	0/1	0/1
	13-532/30	8188	Broiler duck	2710	1/15	39	0/1	0/1
	13-532/31	8193	Fattening duck	1223	0/15	-	-	-
	13-532/32	8194	Fattening duck	1596	2/15	39	0/2	0/2
	13-532/33	8195	Fattening duck	837	0/15	-	-	-
	13-532/34	8196	Fattening duck	1063	5/15	35	0/5	0/5
	13-532/35	8197	Fattening duck	1329	10/15	33	1/10	0/10
	13-532/36	8198	Broiler duck	3010	7/15	38	0/7	0/7
	13-532/37	8199	Broiler duck	5322	4/15	37	0/4	0/4
	13-532/38	8200	Broiler duck	6684	0/15	-	-	-
Total	38 flocks				75/570 (13.2%)	26/75 (34.7%)	0/75 (0%)	

presented flu-like symptoms and had to be hospitalized. He had been hired less than a month before the time of sampling and was involved in different operations, such as hanging, plucking of carcasses as well as evisceration. In the swab sample, *C. psittaci* was clearly identified by real-time PCR, but there was not sufficient DNA to determine the *ompA* genotype. Also due to low DNA content, the other *Chlamydiaceae*-positive sample (Id_31, Cq 39) could not be further characterized using *C. psittaci*-specific PCR. This individual had no symptoms at the time of sampling and reported no history of psittacosis.

Sera

While during the first sampling period (D_0), none of the sera from slaughterhouse A were tested positive by immunofluorescence, positive responses against *C. psittaci* were observed for 10 persons 30 days later in the second sampling period at D_{30} (Table 4). Four of them had IgM titers (associated or not with

IgG) and seven showed an IgG titer increase (dilutions 1/32 to 1/256). Cough or flu-like symptoms were recorded at D_0 for four individuals. None of them was hospitalized. For the PCR-positive worker, only a single serum sample from the first sampling time was available, which turned out to be negative. In the serum of the second PCR-positive worker (Id_31), only IgM was detected at D_{30} . Among the 10 serologically positive workers, only one was a newly hired employee (less than 3 weeks in the company) and most of them had their workplace in the slaughtering area.

In sera of slaughterhouse B workers, no IgM titer against *C. psittaci* was detected by immunofluorescence throughout the sampling period. At D_0 , two volunteers presented IgG titers at 1/16 and 1/256 dilutions. At D_{30} , slightly positive responses (dilutions 1/16 to 1/32) were observed for five persons. Interestingly, one worker (Id_54) presented a high IgG response (dilution 1/256) at both sampling periods. All of them worked in the slaughtering area.

Table 3. Information and results of *Chlamydiaceae* detection in slaughterhouse B.

Id	Bird species	Number of birds	November 2012 <i>Chlamydiaceae</i> PCR				<i>ompA</i> genotype (Acc Number)
			Nb pos/Nb tot	Mean Cq	<i>C. psittaci</i> PCR	<i>C. gallinacea</i> PCR	
12-4102/1	Chicken	4750	0/15	–	–	–	
12-4102/2	Chicken	2450	0/14	–	–	–	
12-4102/3	Chicken	2000	1/15	38	0/1	0/1	
12-4102/4	Chicken	700	1/15	40	0/1	0/1	
12-4102/5	Chicken	900	7/15	36	0/7	7/7	
12-4102/6	Chicken	960	1/15	37	0/1	0/1	
12-4102/7	Chicken	na	0/15	–	–	–	
12-4102/8	Chicken	840	0/15	–	–	–	
12-4102/9	Guinea fowl	4950	0/15	–	–	–	
12-4102/10	Chicken	580	12/15	28	0/12	11/12	
12-4102/11	Chicken	1000	1/15	33	0/1	0/1	
12-4102/12	Turkey	240	11/15	31	0/11	9/11	
12-4102/13	Chicken	150	3/15	40	0/3	2/3	
12-4102/14	Chicken	720	4/15	39	0/4	2/4	
12-4102/15	Chicken	2000	0/15	–	–	–	
12-4102/16	Chicken	720	15/15	29	0/15	15/15	S1 (LN626319), S2 (LN626320)
12-4102/17	Guinea fowl	4002	4/15	40	0/4	3/4	
12-4102/18	Chicken + Guinea fowl	150	9/15	38	0/9	7/9	
12-4102/19	Chicken	1200	4/15	39	0/4	3/4	
12-4102/20	Chicken	720	4/15	39	0/4	2/4	
12-4102/21	Chicken	314	15/15	29	0/15	15/15	S3 (LN626321)
12-4102/22	Guinea fowl	1760	1/15	39	0/1	–	
12-4102/23	Guinea fowl	3024	1/15	39	0/1	0/1	
12-4102/24	Not specified	107	0/15	–	–	–	
12-4102/25	Chicken	720	0/15	–	–	–	
12-4102/26	Not specified	119	1/15	39	0/1	0/1	
12-4102/27	Chicken	1440	1/15	39	0/2	0/2	
12-4102/28	Chicken	960	0/15	–	–	–	
12-4102/29	Chicken	1500	5/15	38	0/5	5/5	
12-4102/30	Chicken	960	6/15	39	0/6	5/6	
12-4102/31	Chicken	480	1/15	38	0/1	1/1	
Total			108/464 (23.2%)		0/108	87/108	
Id	Bird species	Number of birds	February 2013 <i>Chlamydiaceae</i> PCR				<i>ompA</i> genotype (Acc Number)
			Nb pos/Nb tot	mean Cq	<i>C. psittaci</i> PCR	<i>C. gallinacea</i> PCR	
13-666/1	Chicken	960	3/15	39	0/3	2/3	
13-666/2	Chicken	1440	0/15	–	–	–	
13-666/3	Chicken	1680	15/15	34	0/15	15/15	
13-666/4	Chicken	1060	4/15	40	0/4	0/4	
13-666/5	Chicken	960	0/15	–	–	–	
13-666/6	Chicken	120	10/15	37	0/10	10/10	
13-666/7	Chicken	720	4/15	38	0/4	4/4	
13-666/8	Chicken	1700	5/15	39	0/5	3/5	
13-666/9	Guinea fowl	3372	4/15	39	0/4	4/4	
13-666/10	Guinea fowl	1388	2/15	38	0/2	1/2	
13-666/11	Turkey	240	0/15	–	–	–	
13-666/12	Chicken	120	0/15	–	–	–	
13-666/13	Chicken	720	0/15	–	–	–	
13-666/14	Guinea fowl	1584	0/15	–	–	–	
13-666/15	Guinea fowl	3500	1/15	39	0/1	0/1	
13-666/16	Guinea fowl	2016	0/15	–	–	–	
13-666/17	Chicken	384	1/15	40	0/1	0/1	
13-666/18	Chicken	2000	0/15	–	–	–	
13-666/19	Chicken + Guinea fowl	550	13/15	34	0/13	13/13	S4 (LN626322)
13-666/20	Chicken	120	1/15	36	0/1	1/1	

Table 3. Continued.

Id	Bird species	Number of birds	February 2013 Chlamydiaceae PCR		C. psittaci PCR	C. gallinacea PCR	ompA genotype (Acc Number)
			Nb pos/Nb tot	Mean Cq			
13-666/21	Chicken	960	0/15	–	–	–	
13-666/22	Chicken	1440	6/15	38	0/6	5/6	
13-666/23	Chicken	330	0/15	–	–	–	
13-666/24	Guinea fowl	2016	2/15	38	0/2	1/2	
13-666/25	Chicken	720	4/16	39	0/4	0/4	
13-666/26	Chicken	120	15/15	32	0/15	15/15	
13-666/27	Guinea fowl	4320	0/15	–	–	–	
13-666/28	Chicken	960	6/15	35	0/6	4/6	
13-666/29	Chicken	520	1/15	38	0/1	0/1	
13-666/30	Chicken	2500	4/15	39	0/4	1/4	
13-666/31	Chicken	480	0/15	–	–	–	
13-666/32	Guinea fowl	3696	4/15	39	0/4	2/4	
13-666/33	Chicken	480	5/15	38	0/5	3/5	
Total			109/496 (22.0%)		0/109	84/109	
Id	Bird species	Number of birds	June 2013 Chlamydiaceae PCR		C. psittaci PCR	C. gallinacea PCR	ompA genotype (Acc Number)
			Nb pos/Nb tot	Mean Cq			
13-1661/1	Chicken	1680	0/11	–	–	–	
13-1661/2	Chicken	840	0/14	–	–	–	
13-1661/3	Chicken	960	4/15	39	0/4	0/4	
13-1661/4	Chicken	1200	1/15	39	0/1	0/1	
13-1661/5	Chicken	440	1/15	38	0/1	0/1	
13-1661/6	Chicken	1680	0/15	–	–	–	
13-1661/7	Chicken	2500	0/15	–	–	–	
13-1661/8	Chicken	1440	0/15	–	–	–	
13-1661/9	Chicken	720	0/15	–	–	–	
13-1661/10	Guinea fowl	550	10/15	36	0/10	9/10	S5 (LN626323)
13-1661/11	Chicken	930	1/15	38	0/1	1/1	
13-1661/12	Guinea fowl	3700	0/15	–	–	–	
13-1661/13	Chicken	1680	0/17	–	–	–	
13-1661/14	Chicken	960	0/15	–	–	–	
13-1661/15	Chicken	212	0/15	–	–	–	
13-1661/16	Chicken	1200	0/15	–	–	–	
13-1661/17	Not specified	110	15/15	34	0/15	15/15	
13-1661/18	Guinea fowl	1152	0/15	–	–	–	
13-1661/19	Not specified	300	15/15	27	0/15	15/15	S6 (LN626324)
13-1661/20	Chicken	2000	0/15	–	–	–	
13-1661/21	Not specified	120	14/14	31	0/14	14/14	
13-1661/22	Chicken	1680	0/15	–	–	–	
13-1661/23	Chicken	960	0/15	–	–	–	
13-1661/24	Chicken	960	0/15	–	–	–	
13-1661/25	Not specified	800	1/15	40	0/1	1/1	
13-1661/26	Chicken	1070	0/15	–	–	–	
13-1661/27	Chicken	1280	0/15	–	–	–	
13-1661/28	Chicken	480	0/15	–	–	–	
13-1661/29	Chicken	1680	0/15	–	–	–	
13-1661/30	Guinea fowl	3024	0/15	–	–	–	
13-1661/31	Chicken	3000	0/14	–	–	–	
13-1661/32	Chicken	288	0/15	–	–	–	
Total			62/475 (13.0%)		0/62	55/62	

Table 3. Continued.

Id	Bird species	Number of birds	September 2013 Chlamydiae PCR				ompA genotype (Acc Number)
			Nb pos/Nb tot	Mean Cq	<i>C. psittaci</i> PCR	<i>C. gallinacea</i> PCR	
13-2812/1	Chicken	288	1/15	39	0/1	0/1	
13-2812/2	Guinea fowl	2080	0/15	–	–	–	
13-2812/3	Guinea fowl	864	0/15	–	–	–	
13-2812/4	Chicken	720	0/15	–	–	–	
13-2812/5	Chicken	480	5/15	39	0/5	3/5	
13-2812/6	Chicken	1728	13/15	38	0/13	8/13	
13-2812/7	Chicken	3400	6/15	39	0/6	2/6	
13-2812/8	Chicken	720	2/15	39	0/2	1/2	
13-2812/9	Not specified	550	14/15	34	0/14	14/14	S7 (LN626325)
13-2812/10	Chicken	96	15/15	27	0/15	15/15	S8 (LN626326)
13-2812/11	Chicken	1330	9/15	38	0/9	8/9	
13-2812/12	Chicken	720	3/15	38	0/3	2/3	
13-2812/13	Chicken + Guinea fowl	na	1/7	40	0/1	0/1	
13-2812/14	Chicken + Guinea fowl	na	2/8	38	0/2	1/2	
13-2812/15	Chicken	1200	0/15	–	–	–	
13-2812/16	Guinea fowl	1680	0/15	–	–	–	
13-2812/17	Chicken + Guinea fowl	130	11/15	31	0/11	8/11	
13-2812/18	Chicken	1670	1/15	38	0/1	1/1	
13-2812/19	Chicken	212	2/15	38	0/2	0/2	
13-2812/20	Chicken + Guinea fowl	468	0/15	–	–	–	
13-2812/21	Chicken	1040	0/15	–	0/1	0/1	
13-2812/22	Chicken	3024	0/15	–	–	–	
13-2812/23	Chicken	1380	3/15	35	0/3	2/3	
13-2812/24	Not specified	368	0/15	–	–	–	
13-2812/25	Guinea fowl	1000	0/15	–	–	–	
13-2812/26	Not specified	26	0/15	–	–	–	
13-2812/27	Chicken	720	0/15	–	–	–	
13-2812/28	Not specified	164	0/16	–	–	–	
13-2812/29	Not specified	52	5/15	34	0/5	5/5	
13-2812/30	Not specified	140	14/15	34	2/14	10/14	
13-2812/31	Chicken	1680	2/15	38	0/2	2/2	
13-2812/32	Guinea fowl	na	0/15	–	–	–	
13-2812/33	Chicken	480	14/15	32	0/14	13/14	
Total			122/481 (25.6%)		2/122	95/122	

na: not available.

scoters (Christerson et al., 2010). Contact between wild sea birds and mule ducks is possible in this case due to the proximity of farm and sea and since mule ducks are frequently bred in wet open ranges. Attempts to isolate the corresponding strain were unsuccessful, and additional samples taken 3 months later on the same farm and in two different duck flocks revealed only *C. psittaci*.

Although exposure to *C. psittaci* in slaughterhouses appears to be generally low in view of the diagnostic data, clinical cases among workers are regularly occurring. In 2008 and 2009, *C. psittaci* genotype E/B was identified in both fatal human cases in slaughterhouses A and B. This genotype is frequently detected in French duck flocks and has been associated with human cases of psittacosis (Laroucau et al., 2009a; Carlier et al., 2014; Vorimore et al., 2014). In slaughterhouse B, a unique and exceptional slaughter trial involving some ducks was conducted in 2008, before the onset of clinical signs in the fatal case. Human infection probably occurred during the handling of these ducks. But, on the other hand, identification of a *C. psittaci*-positive chicken flock in this study as well as in a recent psittacosis out-

break (Laroucau et al., 2014) suggests that this source should also be taken into account, even though the chicken is not a typical host of *C. psittaci*.

The diagnostic data obtained from staff of both slaughterhouses reflect the differences in exposure to chlamydial agents (Table 4). While in slaughterhouse A 6/11 individuals had elevated IgG titers for *C. psittaci* by immunofluorescence, with two of them having specific antibodies to *C. psittaci* (plus three with borderline titers) using the recomLine, and with two other workers shown to be carriers (one of them showing flu-like symptoms), the situation in the other slaughterhouse was different. The fact that only one of six workers was seropositive and no carrier was identified is in line with the preponderant absence of *C. psittaci* (minor exception see above), which we attribute to the handling of fowl-like birds and the absence of ducks in slaughterhouse B. Compared to the study by Dickx et al. (2010), we found a lower proportion of seropositive and/or PCR-positive workers, which we think is due to the lower prevalence of *C. psittaci* infection in the flocks of the present study.

Table 4. Summary of diagnostic data of slaughterhouse workers.

Slaughterhouse	Worker Id	Gender	Age (yr)	Experience	Working area	Non-occupational exposures	Psittacosis history	Clinical signs		Immunofluorescence				Strip-immunoassay		
								D ₀	D ₁₀	POR results	D ₀	D ₁₀	D ₀	D ₁₀	C. trachomatis	C. pneumoniae
A	3	M	46	Since 1998	Transport	No	Yes	Cough	/	-	<16	-	32	-	+	-
	13	M	34	Recent (20 days)	Slaughtering	No	No	Flu-like symp-toms	na	+	<16	nd	nd	nd	nd	nd
	16	M	43	Since 2010	Slaughtering	No	No	Cough	/	-	<16	-	128	-	-	+
	17	M	29	Since 2003	Maintenance	No	No	/	/	-	<16	+	256	-	+	Borderline
	18	M	49	Since 2000	Slaughtering	No	No	Fever, cough	/	-	<16	-	256	-	+	Borderline
	19	M	25	Since 2011	Maintenance	Yes	No	/	/	-	<16	+	<16	nd	nd	nd
	20	M	51	Since 1980	Slaughtering	Yes	Yes	/	/	-	<16	-	256	-	-	+
	23	M	35	Recent (3 weeks)	Transport	No	No	/	/	-	<16	+	<16	nd	nd	nd
	28	M	44	Since 1991	Slaughtering	No	No	Flu-like symp-toms	/	-	<16	-	256	-	Borderline	Borderline
	31	M	30	Since 2003 (other company)	Transport	No	No	/	/	+	<16	+	<16	nd	nd	nd
B	36	M	30	Since 2005	Slaughtering	No	No	/	/	-	<16	-	128	-	-	-
	40	M	47	Since 1982	Slaughtering	No	No	/	/	-	<16	-	16	+	+	-
	44	F	58	Since 2004	Slaughtering	Yes	No	/	/	-	<16	-	16	-	+	-
	45	M	52	Since 2000	Slaughtering	Yes	No	/	/	-	<16	-	16	-	-	-
	50	F	36	Recent (3 months)	Slaughtering	No	No	Fever	/	-	16	-	32	+	+	-
	51	M	35	Recent (2 months)	Slaughtering	No	No	/	Sore throat	-	<16	-	32	+	+	-
	54	M	38	Since 2001	Slaughtering	No	No	/	/	-	256	-	256	-	-	+

⁽¹⁾Qualitative result, ⁽²⁾last highest dilution for a positive result, nd: not done.

The recent description of *C. gallinacea* in poultry (Sachse et al., 2014) has raised the question of its etiological role and possible zoonotic potential. This study confirmed the high prevalence of *C. gallinacea* in fowl-like birds, such as chicken, guinea fowl and turkey. However, the lack of specific serological tools precluded the identification of any humoral immune response to this agent. We, therefore, emphasize the necessity to develop new species-specific serological assays for all *Chlamydia* spp. because these tests will be required to successfully address the unresolved issues.

Concerning occupational safety, regardless of the *Chlamydiaceae* species involved, slaughterhouse workers should take appropriate precautionary measures, i.e. wear masks and gloves when handling poultry, and inform their doctor of any previous contact with birds when flu-like symptoms appear. However, there is no guaranteed protection. In the slaughterhouses examined here, extractor fans were installed and protective equipment was made available to staff after the two fatal cases in 2008–2009. Nevertheless, the identification of an ongoing case of psittacosis during this study suggests that those measures have not been sufficient. Asymptomatic *C. psittaci* infection is highly prevalent in duck flocks (Vorimore et al., 2014). Since protective equipment is sometimes poorly tolerated by workers, particularly at work stations that require high physical activity, reducing excretion levels of birds might be a useful additional measure. Any change in workflow should be critically examined for its impact on pathogen transmission pathways. Avian chlamydiosis is an invisible disease, generally perceived as controllable, but its consequences can be severe.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the two slaughterhouses that opened their doors to us, as well as all the volunteers who agreed to participate to this study.

FUNDING

This work was supported by APR Environnement Santé Travail, Afsset (Airchlam - EST-11-110).

Conflict of interest statement. None of the authors has a financial or personal relationship with any other people or organizations that could inappropriately influence or bias this paper.

REFERENCES

- Belchior E, Barataud R, Ollivier I, et al. Psittacosis outbreak after participation in a bird fair, Western France, December 2008. *Epidemiol Infect* 2011;139:1637–41.
- Belchior E, Bradane G, Mercier AF, et al. Investigations de cas humains de psittacose dans deux abattoirs de volailles, Pays de la Loire, Mars-avril 2009. *Epidemiol et santé anim*, 2010;57:5–11.
- Carlier L, Kempf M, Aaziz R, et al. A severe case of pneumopathy in a duck breeder due to *Chlamydia psittaci* diagnosed by 16s rDNA sequencing. *JMM Case Rep* 2014 doi:10.1099/jmmcr.0.001537.
- Center for Food Security & Public Health Iowa state University, US. (<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/psittacosis.pdf>). Psittacosis / Avian Chlamydiosis. CFSPH, 2009.
- Christerson L, Blomqvist M, Grannas K, et al. A novel *Chlamydiaceae*-like bacterium found in faecal specimens from sea birds from the Bering Sea. *Environ Microbiol* 2010;2:605–10.
- De Martino SJ, De Barbeyrac B, Piemont Y, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* DNA using Magna Pure DNA extraction and Cobas Amplicor Ct/Ng amplification. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:576–9.
- Dickx V, Geens T, Deschuyffeleer T, et al. *Chlamydia psittaci* zoonotic risk assessment in a chicken and turkey slaughterhouse. *J Clin Microbiol* 2010;48:3244–50.
- Dickx V, Vanrompay D. Zoonotic transmission of *Chlamydia psittaci* in a chicken and turkey hatchery. *J Med Microbiol* 2011;60:775–9.
- Ehrich R, Slickers P, Goellner S, et al. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol Cell Probe* 2006;20:60–3.
- Gaede W, Reckling KF, Dresenkamp B, et al. *Chlamydia psittaci* infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany. *Zoonoses Public Hlth* 2008;55:184–8.
- Haas WH, Swaan CM, Meijer A, et al. A Dutch case of atypical pneumonia after culling of H5N1 positive ducks in Bavaria was found infected with *Chlamydia psittaci*. *Euro Surveill* 2007;12:E071129.3.
- Hinton DG, Shipley A, Galvin JW, et al. Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant. *Aust Vet J* 1993;70:174–6.
- Kaleta E F, Taday E M A. Avian host range of *Chlamydia* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol* 2003;32:435–62.
- Lagae S, Kalmar I, Laroucau K, et al. Emerging *Chlamydia psittaci* infections in chickens and examination of transmission to humans. *J Med Microbiol* 2014;63:399–407.
- Laroucau K, Aaziz R, Meurice L, et al. Outbreak of psittacosis in a group of women exposed to *Chlamydia psittaci* infected chickens. *Euro Surveill* 2014; (in press).
- Laroucau K, De Barbeyrac B, Vorimore F, et al. Chlamydial infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France. *Vet Microbiol* 2009a;135:82–9.
- Laroucau K, Vorimore F, Aaziz R, et al. Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France. *Infect Genet Evol* 2009b;9:1240–7.
- Léon O, Sraka B, Ballot A, et al. Evaluation du portage de *Chlamydia psittaci* au sein de la filière canards gras: implications pour la santé publique. In: *6ème Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à foie gras*. 2004.
- Menard A, Clerc M, Subtil A, et al. Development of a real-time PCR for the detection of *Chlamydia psittaci*. *J Med Microbiol* 2006;55:471–3.
- Petrovay F, Balla E. Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydia psittaci*. *J Med Microbiol* 2008;57:1296–8.
- Pudjiasmoko H, Fukushi Y, Ochiai Y, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Chlamydia* based on 16s rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:425–31.
- Rehn M, Ringberg H, Runehagen A, et al. Unusual increase of psittacosis in southern Sweden linked to wild bird exposure, January to April 2013. *Euro Surveill* 2013;18:20478.
- Sachse K, Laroucau K, Riege K, et al. Evidence for the existence of two new members of the family *Chlamydiaceae* and proposal of *Chlamydia avium* sp. Nov. And *Chlamydia gallinacea* sp. Nov. *Syst Appl Microbiol* 2014;37:79–88.
- Sachse K, Laroucau K, Vorimore F, et al. DNA microarray-based genotyping of *Chlamydia psittaci* strains from culture and clinical samples. *Vet Microbiol* 2009;135:22–30.

- Sachse K, Laroucau K. Avian chlamydiosis: two more bacterial players discovered. *Vet J* 2014;200:247–8.
- Smith KA, Campbell CT, Murphy J, et al. Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis), 2010 National Association of State Public Health Veterinarians. *Zoonot Dis* 2011;20:32–45.
- Thomas V, Casson N, Greub G. *Criblamydia sequanensis*, a new intracellular chlamydiales isolated from Seine river water using Amoebal co-culture. *Environ Microbiol* 2006;8: 2125–35.
- Tiong A, Vu T, Counahan M, et al. Multiple sites of exposure in an outbreak of ornitosis in workers at a poultry abattoir and farm. *Epidemiol Infect* 2007;135:1184–91.
- Vorimore F, Hsia RC, Huot-Creasy H, et al. Isolation of a new chlamydia species from the Feral sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *chlamydia ibidis*. *PLoS One* 2013;8:e74823.
- Vorimore F, Thébault A, Poisson S, et al. *Chlamydia psittaci* in ducks: a hidden health risk for poultry workers. *Pathog Dis* 2014; (in press).
- Williams CJ, Sillis M, Fearn V, et al. Risk exposures for human ornitosis in a poultry processing plant modified by use of personal protective equipment: an analytical outbreak study. *Epidemiol Infect* 2013;141:1965–74.
- Zocevic A, Vorimore F, Marhold C, et al. Molecular characterization of atypical chlamydia and evidence of their dissemination in different European and Asian chicken flocks by specific real-time PCR. *Environ Microbiol* 2012;14:2212–22.

**EXPOSITION DES PROFESSIONNELS AUX CHLAMYDIACEAE :
ENQUETE DANS DEUX ABATTOIRS DE VOLAILLES FRANÇAIS**

**Hulin Virginie¹, Oger Sabrina², Vorimore Fabien¹, Aaziz Rachid¹,
de Barbeyrac Bertille³, Berruchon Jacques², Sachse Konrad⁴, Laroucau Karine¹**

¹UNIVERSITE PARIS-EST - ANSES - UNITE DES ZONOSSES BACTERIENNES –
12 rue Pierre et Marie Curie - 94701 MAISONS-ALFORT,

²CENTRE HOSPITALIER REGIONAL - Les Oudairies - 85000 LA ROCHE-SUR-YON,

³CENTRE NATIONAL DE REFERENCE (CNR) CHLAMYDIA – 146 rue Léo Saignat -
33076 BORDEAUX,

⁴FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT – Naumburger Str. 96a - 07743 JENA (GERMANY)

Karine.laroucau@anses.fr

RÉSUMÉ

Chlamydia (C.) psittaci et *Chlamydia (C.) gallinacea* sont deux espèces de bactéries appartenant à la famille des *Chlamydiaceae* et pouvant infecter les volailles. Si *C. psittaci* est connue pour être responsable d'une zoonose nommée psittacose chez l'Homme, le pouvoir zoonotique de *C. gallinacea*, espèce récemment décrite, n'est pas clairement établi à ce jour. Des cas de psittacose étant régulièrement signalés dans les abattoirs de volailles français, et afin d'apprécier le niveau d'exposition aux *Chlamydiaceae* des professionnels de la filière, une étude a été mise en place dans deux abattoirs : le premier spécialisé dans l'abattage de canards (Abattoir A), le second traitant toutes sortes de volailles, excepté le canard (Abattoir B). En février 2013 et durant une semaine, tous les lots de volailles abattus dans ces deux abattoirs ont été analysés par PCR. Des suivis sérologiques et des écouvillons pharyngés ont également été réalisés sur les personnels volontaires entre avril et juin 2013. Alors que l'analyse des prélèvements sur les lots de volailles a permis de mettre en évidence quasi exclusivement l'espèce *C. psittaci* dans l'abattoir A, seule l'espèce *C. gallinacea* a été détectée dans l'abattoir B. De façon intéressante, l'analyse des prélèvements humains a mis en évidence un début de foyer de psittacose dans l'abattoir A, tandis que de faibles réponses sérologiques vis-à-vis de *C. psittaci* ont été détectées chez le personnel de l'abattoir B. Des outils de diagnostic sérologique spécifiques à *C. gallinacea* sont encore manquants. Au regard de la forte prévalence des *Chlamydiaceae* mise en évidence dans les lots de volailles analysés, il est fortement recommandé au personnel ayant à manipuler les volailles (canards et autres) de porter des équipements de protection adaptés.

ABSTRACT

Exposition to *Chlamydiaceae* in slaughterhouses: investigation in two French poultry slaughterhouses

Chlamydia (C.) psittaci and *Chlamydia (C.) gallinacea* are two species that can both infect poultry birds. Whereas *C. psittaci* is known to be responsible of a zoonotic disease called psittacosis for humans, the zoonotic potential of *C. gallinacea* has not been determined yet. As psittacosis cases are regularly reported in French slaughterhouses and in order to assess the exposition of professionals to these bacteria, a survey has been conducted in two French poultry slaughterhouses: one specialized in ducks exclusively (Slaughterhouse A), the second one processing different poultry species except ducks (Slaughterhouse B). Cloacal swabs were taken on all incoming poultry flocks during a given week in February 2013 and analyzed by real-time PCR. All voluntary slaughterhouse workers have also been subjected to blood samplings and a throat swabbing. The predominance of *C. psittaci* was highlighted in duck flocks (Slaughterhouse A), while only *C. gallinacea* was detected in the other poultry bird species (Slaughterhouse B). Interestingly, analyse of the human samples showed a current event of psittacosis in slaughterhouse A, while only very low serological responses were observed in slaughterhouse B. However, no serological test is currently available for the specific identification of a *C. gallinacea* exposure. Nevertheless, due to the high prevalence of both species in poultry birds, it's recommended to wear appropriate protective equipment during activities associated with live animals.

INTRODUCTION

La chlamydie aviaire, nommée également psittacose chez l'Homme, est une zoonose connue depuis des siècles et due à *C. psittaci*, une bactérie parasite intracellulaire obligatoire appartenant à la famille des *Chlamydiaceae*. Mondialement répandue, *C. psittaci* peut infecter plus de 450 espèces d'oiseaux parmi plus de 30 ordres différents (Kaleta et Taday, 2003). L'infection est le plus souvent asymptomatique chez les animaux. Cependant, en fonction de l'espèce aviaire, de l'âge de l'animal ou encore de la souche bactérienne impliquée, des signes cliniques variables peuvent être observés.

La transmission à l'Homme se fait par le biais d'aérosols contaminés. La psittacose entraîne alors des symptômes pseudo-grippaux peu spécifiques ainsi que des problèmes respiratoires sévères qui peuvent s'avérer fatals dans de rares cas. Le diagnostic, difficile à établir, repose classiquement sur la mise en évidence d'anticorps anti-*C. psittaci*.

Si *C. psittaci* a longtemps été considérée comme le principal agent de la chlamydie aviaire, de récentes études ont mis en évidence d'autres espèces : *C. avium* principalement détectée chez des pigeons, *C. gallinacea* identifiée chez les volailles, notamment des poulets et des dindes (Sachse et al., 2014) et *C. ibidis* uniquement mise en évidence à ce jour chez des ibis (Vorimore et al., 2013).

Le risque d'infection à *C. psittaci* est plus élevé chez les personnes en contact régulier avec des oiseaux, notamment dans un cadre professionnel (éleveurs, vétérinaires, personnel d'abattoir...). En France, des cas en lien avec une exposition à des canards mulards, espèce utilisée pour la production du foie gras, sont régulièrement recensés (Laroucau et al., 2009a; Belchior et al., 2011; Carlier et al., 2014).

Afin d'apprécier l'exposition des professionnels aux *Chlamydiaceae* en abattoir de volailles, une étude a été menée en 2013 dans deux abattoirs manipulant des espèces aviaires différentes. Cette étude a porté sur l'analyse des lots de volailles abattus, ainsi que sur le suivi du personnel volontaire.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Prélèvements animaux

En février 2013 et durant une semaine, des prélèvements ont été effectués sur tous les lots de volailles abattues dans deux abattoirs français. Le premier (Abattoir A) est spécialisé dans l'abattage de canards, tandis que le second (Abattoir B) abat toutes sortes de volailles, à l'exception du canard (poulets, dindes, coqs, pintades...). Pour chaque lot, 15 animaux sélectionnés arbitrairement ont été soumis à un écouvillonnage cloacal après la plumaison. Les prélèvements ont été stockés à -80°C en attendant d'être analysés.

1.1.1. Détection directe par PCR en temps réel

L'extraction d'ADN a été effectuée à l'aide du Qiamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Les ADN ont été analysés à l'aide d'une PCR en temps réel spécifique de la famille des *Chlamydiaceae* (Ehrlich et al., 2006). Les ADN positifs ont ensuite été re-testés à l'aide de PCR spécifiques des espèces *C. psittaci* (Ménard et al., 2006) et *C. gallinacea* (Zocevic et al., 2012).

Tous les échantillons dont le Cq (Quantification cycle) était supérieur à 40 ont été considérés comme négatifs. Les lots comportant au moins un animal positif par PCR ont été classés comme positifs, et ceux contenant au moins 50 % d'échantillons positifs avec une moyenne du Cq ≤ 35 ont été considérés comme moyennement à fortement positifs.

1.1.2. Caractérisation moléculaire

Le gène *ompA* des échantillons positifs vis-à-vis de *C. psittaci* ou *C. gallinacea* a été séquencé à l'aide des amorces CTU/CTL ou Chomp191/371 (Laroucau et al., 2009b; Denamur et al., 1991).

Pour les échantillons *Chlamydiaceae* positifs mais n'appartenant ni à l'espèce *C. psittaci*, ni à l'espèce *C. gallinacea*, le gène 16S rRNA a été partiellement amplifié à l'aide des amorces 16S1/rp2 (Thomas et al., 2006; Pudjiatmoko et al., 1997).

1.2. Prélèvements humains

Le personnel volontaire des deux abattoirs a été médicalement examiné entre avril et juin 2013. Les participants ont répondu à un questionnaire général portant sur leurs expériences professionnelles, les postes occupés, leurs antécédents médicaux et les éventuelles expositions extra-professionnelles à *C. psittaci*.

A l'occasion de cet entretien, un écouvillon pharyngé a été effectué, ainsi qu'une prise de sang, qui a été renouvelée au bout de 30 jours (J₀ et J₃₀).

1.2.1. Détection directe par PCR en temps réel

Les écouvillons pharyngés ont été soumis à une extraction d'ADN à l'aide du système MagNA Pure (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les ADN ont été analysés à l'aide de PCR en temps réel spécifiques ciblant les *Chlamydiaceae* ou *C. psittaci*, comme décrit précédemment.

1.2.2. Sérologie

Un test d'immunofluorescence commercialisé a été utilisé (Chlamydia MIF, Focus, Eurobio, France) pour la détection d'anticorps spécifiques. Cet essai mesure des réponses aux sous-classes IgM et IgG vis-à-vis de trois espèces de *Chlamydia* : *C. psittaci*, *C. trachomatis* et *C. pneumoniae*. Le résultat pour les IgG équivaut à la réciproque de la plus haute dilution du sérum donnant une fluorescence. Concernant les IgM, uniquement la dilution au 1/16^{ème} a été testée, donnant un résultat positif ou négatif. On considère

qu'une multiplication par quatre du taux d'IgG est la preuve d'une infection active.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Prélèvements animaux

Dans l'abattoir A, 23 des 38 lots de canards analysés se sont révélés positifs vis-à-vis des *Chlamydiaceae* (Tableau 1). Tous les lots positifs présentaient un Cq moyen faible, à l'exception de deux lots issus d'une même exploitation. Tandis que l'espèce *C. psittaci* a été identifiée dans l'ensemble des lots faiblement positifs pour lesquels une identification de l'espèce était possible, pour les deux lots frères les analyses moléculaires ont montré l'existence d'une souche n'appartenant ni à l'espèce *C. psittaci*, ni à l'espèce *C. gallinacea*. L'analyse de la séquence partielle du gène 16S rRNA a montré qu'il s'agissait d'une souche proche d'une *Chlamydiaceae* atypique (95 % d'homologie) détectée chez un oiseau marin (Christerson et al., 2010). Les prélèvements effectués dans ce même élevage par la suite n'ont malheureusement pas permis de détecter à nouveau cette souche particulière. Une contamination de ces canards via la faune sauvage pourrait être une explication à la présence ponctuelle de cette souche atypique.

Chez les canards, le portage asymptomatique de *C. psittaci* est très prévalent et, dans les élevages, différents schémas d'excrétion ont été mis en évidence à ce jour (Vorimore et al., 2014). D'une façon générale, les canards excrètent principalement alors qu'ils sont sur les parcours, l'excrétion tendant à diminuer dans le temps pour atteindre des niveaux résiduels en fin de chaîne. Les résultats obtenus dans le cadre du suivi mis en place dans l'abattoir A montrent qu'il est possible que des lots fortement excréteurs puissent être manipulés occasionnellement par le personnel.

Des *Chlamydiaceae* ont été détectées dans 21 des 33 lots de volailles analysés dans l'abattoir B, impliquant majoritairement des poulets et des pintades (Tableau 1). Tous les lots positifs présentaient un Cq moyen faible, à l'exception de trois lots pour lesquels une charge bactérienne plus importante a été mise en évidence. Seule l'espèce *C. gallinacea* était présente dans ces lots. Le typage des souches, basé sur le séquençage partiel du gène *ompA* a pu être réalisé dans deux des trois lots positifs. Au sein d'un même lot, des séquences identiques ont été obtenues mais les séquences étaient différentes d'un lot à l'autre, illustrant et confirmant la diversité des souches au sein de cette espèce. Il est intéressant de noter que l'espèce *C. psittaci* n'a été mise en évidence dans aucun des lots de poulets et de dindes analysés. Les travaux conduits jusqu'à présent dans les lots de volailles tendent à montrer que *C. psittaci* est très prévalente chez les canards tandis que *C. gallinacea* est l'espèce pré-dominante chez les poulets et les

pintades. Ces données diffèrent des travaux récemment publiés par une équipe belge qui avait montré que plus de 50 % des lots de poulets et de dindes analysés dans un abattoir étaient positifs vis-à-vis de *C. psittaci* (Dickx et al., 2010). Les résultats varient d'une étude à une autre et d'un pays à l'autre. Sur notre territoire, la mise en évidence de l'espèce *C. psittaci* chez des volailles autres que des canards est extrêmement rare. En mai 2013, suite à des cas groupés de psittacose, les investigations menées avaient permis d'incriminer des poulets. Le génotypage de la souche de *C. psittaci* impliquée, ainsi que l'analyse des lots de volailles présents sur l'exploitation et leur rotation, avait permis de suggérer que cette contamination accidentelle s'expliquait par le partage des parcours entre des poulets et des canards, chez lesquels ce même génotype avait été majoritairement mis en évidence (Laroucau et al., 2014).

2.2. Prélèvements humains

Dans l'abattoir A, 28 personnes ont participé à l'étude. Des résultats positifs ont été obtenus par PCR pour deux écouvillons pharyngés dont l'un provenant d'un homme de 34 ans, récemment embauché, qui présentait des symptômes grippaux au moment de l'examen et qui a dû être hospitalisé par la suite.

Alors que les résultats d'immunofluorescence étaient négatifs pour l'ensemble des volontaires à J₀, 10 personnes ont présenté une augmentation du taux d'IgM et/ou d'IgG à J₃₀. Ces séroconversions mettent en évidence une exposition à *C. psittaci*, illustrant la possibilité du passage occasionnel de lots plus excréteurs sur la chaîne d'abattage.

Dans l'abattoir B, 32 volontaires ont participé à l'étude, mais seules de faibles réponses sérologiques vis-à-vis de *C. psittaci* ont été détectées. Ces résultats sont en accord avec l'analyse des lots de volailles sur une semaine qui a montré la seule circulation de *C. gallinacea* dans ces lots. Cependant, il n'existe pas, à ce jour, de test sérologique permettant d'apprécier une exposition à cette nouvelle espèce de *Chlamydiaceae*.

CONCLUSION

Cette étude montre que les expositions aux *Chlamydiaceae* sont différentes en fonction des espèces aviaires considérées. En effet, *C. psittaci* est majoritairement détectée chez les canards, tandis que *C. gallinacea* est plus prévalente chez les poulets et les pintades. Le suivi sur une semaine a mis en évidence un nombre limité de lots de volailles très excréteurs, cependant des *Chlamydiaceae* ont été détectées dans la majorité des lots analysés. Tandis que le pouvoir zoonotique de *C. gallinacea* n'est pas clairement établi à ce jour, il est recommandé aux professionnels, par mesure de précaution, de porter des équipements de protection adéquats lors de la manipulation des volailles.

REMERCIEMENTS

les deux abattoirs participants ainsi que le personnel volontaire.

Cette étude a reçu le soutien financier de l'Afsset (Airclam EST-11-110), et nous remercions vivement

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Belchior E., Barataud D., Ollivier R., Capek I., Laroucau K., de Barbeyrac B., Hubert B., 2011. *Epidemiol. Infect.*, (139), 1637-1641.
2. Carlier L., Kempf M., Aaziz R., Jolivet-Gougeon A., Laroucau K., 2014. *JMM case reports*, (2014).
3. Christerson L., Blomqvist M., Grannas K., Thollesson M., Laroucau K., Waldenström J., Eliasson I., Olsen B., Herrmann B., 2010. *Environ. Microbiol. Rep.*, (2), 605-610.
4. Denamur E., Sayada C., Souriau A., Orfila J., Rodolakis A., Elion J., 1991. *J. Gen. Microbiol.*, (137), 2525-2530.
5. Dickx V., Geens T., Deschuyffeleer T., Tyberghien L., Harkinezhad T., Beeckman D. S. A., Braeckman L., Vanrompay D., 2010. *J. Clin. Microbiol.*, (48), 3244-3250.
6. Ehrlich R., Slickers P., Goellner S., Hotzel H., Sachse K., 2006. *Mol. Cell. Probe.*, (20), 60-63.
7. Kaleta E.F., Taday E.M., 2003. *Avian Pathol.*, (32), 435-461.
8. Laroucau K., Vorimore F., Aaziz R., Berndt A., Schubert E., Sachse K., 2009a. *Infect. Genet. Evol.*, (9), 1240-1247.
9. Laroucau K., de Barbeyrac B., Vorimore F., Clerc M., Bertin C., Harkinezhad T., Verminnen K., Obeniche F., Capek I., Bébéar C., Durand B., Zanella G., Vanrompay D., Garin-Bastuji B., Sachse K., 2009b. *Vet. Microbiol.*, (135), 82-89.
10. Laroucau K., Aaziz R., Meurice L., Servas V., Chossat I., Royer H., de Barbeyrac B., Vaillant V., Moyen J.-L., Meziani F., Sachse K., Rolland P., 2014. *Euro. Surveill.*, in press.
11. Ménard A., Clerc M., Subtil A., Mégraud F., Bébéar C., de Barbeyrac B., 2006. *J. Med. Microbiol.*, (55), 471-473.
12. Pudjiasmoko, Fukushi H., Ochiai Y., Yamaguchi T., Hirai K., 1997. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, (47), 425-431.
13. Sachse K., Laroucau K., Riege K., Wehner S., Dilcher M., Huot-Creasy H., Weidmann M., Myers G., Vorimore F., Vicari N., Magnino S., Liebler-Tenorio E., Ruettger A., Bavoil P.M., Hufert F.T., Rosseló-Móra R., Marz M., 2014. *Syst. Appl. Microbiol.*, (37), 79-88.
14. Thomas V., Casson N., Greub G., 2006. *Environ. Microbiol.*, (8), 2125-2135.
15. Vorimore F., Hsia R., Huot-Creasy H., Bastian S., Deruyter L., Passet A., Sachse K., Bavoil P., Myers G., Laroucau K., 2013. *Plos ONE*, (8), e74823.
16. Vorimore F., Thebault A., Poisson S., Cléva D., Robineau J., de Barbeyrac B., Durand B., Laroucau K., 2014. *Path. Dis.*, in press.
17. Zocovic A., Vorimore F., Marhold C., Horvatek D., Wang D., Slavec B., Prentza Z., Stavianis G., Prukner-Radovic E., Douc A., Siarkou V. I., Laroucau K., 2012. *Environ. Microbiol.*, (14), 2212-2222.

Tableau 1. Résultats de détection des *Chlamydiaceae* par PCR sur l'ensemble des lots abattus durant une semaine dans les abattoirs A et B

Abattoir	Espèce	Nombre de lots analysés	Lots négatifs par PCR	Lots positifs par PCR	Dont lots moyennement à fortement positifs par PCR
A	Canard gras	23	8	15 (65%)	2 (9%)
	Canard maigre	15	7	8 (53%)	-
B	Poulet	20	7	13 (65%)	2 (10%)
	Chapon	-	-	-	-
	Pintade	8	3	5 (63%)	-
	Dinde	1	1	-	-
	Coq	1	1	-	-
	Poule	2	-	2 (100%)	-
	Poulet + Pintade	1	-	1 (100%)	1 (100%)

Tableau 2. Résultats sérologiques et de détection des *Chlamydiaceae* par PCR sur le personnel volontaire des abattoirs A et B

Abattoir	Sexe	Âge (années)	Ancienneté	Zone de travail	Signes cliniques		Résultats PCR		Immunofluorescence			
					J ₀	J ₃₀	<i>Chlamydiaceae</i>	<i>C. psittaci</i>	J ₀		J ₃₀	
									IgM	IgG	IgM	IgG
A	M	46	1998	Transport	Toux	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	32
	M	34	Nouveau (20 jours)	Abattage	Symptômes grippaux	ND ¹	Pos (Cq=32)	Pos (Cq=33)	Neg	< 16	ND	ND
	M	43	2010	Abattage	Toux	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	128
	M	29	2003	Maintenance	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Pos	256
	M	49	2000	Abattage	Fièvre, toux	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	256
	M	25	2011	Maintenance	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Pos	< 16
	M	51	1980	Abattage	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	256
	M	35	Nouveau (3 semaines)	Transport	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Pos	< 16
	M	44	1991	Abattage	Symptômes grippaux	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	256
	M	30	10 ans (autre compagnie)	Transport	-	-	Pos (Cq=39)	Neg	Neg	< 16	Pos	< 16
B	M	30	2005	Abattage	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	128
	M	47	1982	Abattage	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	16
	F	58	2004	Abattage	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	16
	M	52	2000	Abattage	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	16
	F	36	Nouveau (3 mois)	Abattage	Fièvre	-	Neg	Neg	Neg	16	Neg	32
	M	35	Nouveau (2 mois)	Abattage	-	Mal de gorge	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	32

¹ ND : non réalisé

1.3 Suivi de sept lots de canards Mulard du couvoir à l'abattoir

Publication n°3 (publié en mars 2016)

Un suivi a été mis en place auprès de 7 lots de canards Mulard (A1, A2, B, C, D1, D2 et E) répartis dans cinq élevages du Nord-Ouest de la France (A, B, C, D et E). Ces lots ont été suivis du couvoir à l'abattoir. Des prélèvements animaux, d'air et environnementaux ont été réalisés lors de chaque action nécessitant la manipulation des animaux par l'Homme, cela dans le but d'évaluer non seulement l'excrétion des animaux, mais aussi l'exposition des professionnels aux *Chlamydia*. Les différents prélèvements effectués regroupent des écouillons cloacaux, des OBNE qui ont été autopsiés, des prélèvements d'air ainsi que des prélèvements environnementaux réalisés en élevages (eau, sol et poussières).

Les prélèvements effectués au couvoir (écouvillons, OBNE et prélèvements d'air) ont quasiment tous donné des résultats négatifs par PCR en temps réel, à l'exception de cinq organes très faiblement positifs provenant de cinq OBNE différents issus de trois lots (A1, C et E).

L'analyse par PCR des écouillons cloacaux effectués en élevages et lors du gavage a révélé l'excrétion de *C. psittaci* dans l'ensemble des lots suivis, et seul le génotype E/B a été détecté. Trois schémas d'excrétions différents ont été observés chez les canards : 1/ la détection d'une excrétion massive précoce vers l'âge de 4 semaines, 2/ une excrétion massive vers l'âge de 8 semaines correspondant au desserrage sur parcours et 3/ une excrétion tardive intervenant en fin d'élevage, lors du gavage et à l'abattage. Dans les trois cas, l'excrétion atteint un maximum puis décroît au cours du temps, avec parfois une faible excrétion d'un petit nombre d'animaux lors de l'abattage.

Les prélèvements d'air étaient positifs principalement lors des fortes excrétions des animaux, le plus souvent lors de la réalisation des vaccinations contre *Pasteurella*. Ces interventions se déroulent dans des bâtiments clos et les animaux sont particulièrement stressés. De même, les prélèvements environnementaux étaient principalement positifs lorsqu'une excrétion massive était détectée chez les animaux.

La présence du bactériophage Chp1 infectant *C. psittaci* a été recherchée tout d'abord par PCR en temps réel dans l'ensemble des prélèvements, puis par PCR classique sur les échantillons les plus positifs. Ce virus pourrait impacter la virulence de la bactérie sur l'hôte. Le bactériophage Chp1 a été détecté par PCR dans l'ensemble des lots suivis, particulièrement lorsque les animaux étaient les plus excréteurs de *C. psittaci*. Alors que les séquences du gène ORF 1 étaient toutes identiques, des mutations ponctuelles ont été observées dans le gène ORF 2 pour les sept échantillons séquencés. Au final, trois nouvelles séquences d'une portion du gène ORF 2 ont été identifiées.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude démontrent une exposition des professionnels à *C. psittaci* invisible (aucun animal n'a présenté de symptômes) et imprévisible (différents schémas d'excrétion ayant été observés), bien qu'aucun cas humain n'ait été recensé durant le suivi de ces lots. Dans ces conditions, la mise en place d'équipements de protection individuelle et collective est vivement recommandée, en particulier le port de masques pour l'ensemble des acteurs intervenant dans la filière. Les prélèvements environnementaux effectués en élevages se sont révélés positifs majoritairement lorsqu'une excrétion massive était détectée chez les animaux. Cependant, ces prélèvements environnementaux ont été effectués sur les lieux occupés par les animaux et non pas avant leur arrivée. Il n'est dès lors pas possible de conclure sur une origine de contamination environnementale. Des amibes ont été détectées par PCR classique dans la majorité des prélèvements environnementaux effectués dans le cadre de ce suivi. Ce protozoaire pourrait contribuer à la survie de *C. psittaci* dans l'environnement.

Publication n°3: Assessment of *Chlamydia psittaci* shedding and environmental contamination as potential sources of worker exposure throughout the mule duck breeding process.



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Applied and Environmental
Microbiology



Assessment of *Chlamydia psittaci* Shedding and Environmental Contamination as Potential Sources of Worker Exposure throughout the Mule Duck Breeding Process

V. Hulin,^a P. Bernard,^b F. Vorimore,^a R. Aaziz,^a D. Cléva,^c J. Robineau,^d B. Durand,^e L. Angelis,^f V. I. Siarkou,^g K. Laroucau^a

University Paris-Est, ANSES Animal Health Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, Maisons-Alfort, France^a; National Veterinary School, Oniris, Nantes, France^b; Veterinary Practice, L'Oie, France^c; SAS Breheret, La Potteville, France^d; University Paris-Est, ANSES Animal Health Laboratory, Epidemiology Unit, Maisons-Alfort, France^e; Department of Informatics, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece^f; Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece^g

Chlamydia psittaci is an obligate intracellular bacterium responsible for avian chlamydiosis, otherwise known as psittacosis, a zoonotic disease that may lead to severe atypical pneumonia. This study was conducted on seven mule duck flocks harboring asymptomatic birds to explore the circulation and persistence of *C. psittaci* during the entire breeding process and assess the potential sources of worker exposure. Cloacal swabs and air samples were taken on each occasion requiring humans to handle the birds. In parallel, environmental samples, including dust, water, and soil, were collected. Specific real-time PCR analyses revealed the presence of *C. psittaci* in all flocks but with three different shedding patterns involving ducks about the age of 4, 8, and 12 weeks with heavy, moderate, and low excretion levels, respectively. Air samples were only positive in flocks harboring heavy shedders. Dust in flocks with heavy or moderate shedders carried chlamydial loads strongly associated with the loads detected in avian and soil samples. Environmental contamination, significantly correlated with shedding dynamics, was considered to be the most probable source of exposure. The high prevalence of bacteriophage Chp1 in all flocks, mostly jointly present with chlamydia, suggests an important factor in *C. psittaci* persistence, thus creating a greater risk for humans. A survey conducted in these flocks regarding farming practices and activities showed that disinfection seems to be the most promising practice for reducing *C. psittaci* prevalence in ducks and that the place and the duration of action during operations seem to be potential risk factors. Strict adherence to good practices is strongly recommended.

Chlamydia psittaci, a member of the *Chlamydiaceae* family, is an obligate intracellular bacterium known worldwide to cause “psittacosis” (also called “ornithosis” or, more generally, “avian chlamydiosis”), which is the most important potentially zoonotic animal chlamydiosis. The disease mainly affects psittacine birds and domestic poultry and is usually systemic with clinical signs that vary greatly in severity depending on the species and age in weeks, as well as the virulence of the chlamydial strain involved (1, 2). Avian strains of *Chlamydia psittaci* are separated in 13 *ompA* genotypes named A to F, E/B, IV, 6N, Mat116, R54, YP84, and CPX308 (3). These avian genotypes present relative host specificity, and most of them have also been identified in cases of zoonotic transmission (4–7).

Transmission to humans occurs through inhalation of contaminated aerosols resulting from avian respiratory tract excretions and droppings and can cause a primarily respiratory disease complex, which may lead to severe atypical pneumonia and death in the most severe cases (8, 9). The risk of psittacosis is highest among individuals in direct contact with birds, e.g., poultry sector workers, veterinarians, pet shop employees, and pet bird owners. A number of recent reports suggest that numerous cases of psittacosis are linked to domestic poultry and that turkeys, ducks, and chickens could be important reservoirs of infection in humans, for example, in poultry farm, hatchery, slaughterhouse, and processing plant workers (6, 10–15). Because of the severity and potentially fatal outcome of human psittacosis and the serious hazard to workers, European Directive 2000/54/EC (16) and the Approved List of Biological Agents of the Advisory Committee on Dangerous Pathogens (17) have classified *C. psittaci* as a “hazard group 3”

human pathogen. This underlines the need for further awareness and efficient risk assessment and management.

Most of the human cases of psittacosis reported in France to the public health authorities are linked to ducks, and especially to mule ducks, a hybrid species related to the production of foie gras (6, 15). More recently, a study conducted in mule duck breeding farms revealed significant shedding of *C. psittaci*, in mostly asymptomatic birds, revealing a hidden risk for workers (18). The latter study also leads to a hypothesis about how ducks become contaminated: although some of the ducklings could inherit a low level of infection from their parents, the majority seems to arrive perfectly

Received 30 September 2015 Accepted 16 December 2015

Accepted manuscript posted online 28 December 2015

Citation Hulin V, Bernard P, Vorimore F, Aaziz R, Cléva D, Robineau J, Durand B, Angelis L, Siarkou V, Laroucau K. 2016. Assessment of *Chlamydia psittaci* shedding and environmental contamination as potential sources of worker exposure throughout the mule duck breeding process. *Appl Environ Microbiol* 82:1504–1518. doi:10.1128/AEM.03179-15.

Editor: H. Goodrich-Blair, University of Wisconsin—Madison

Address correspondence to K. Laroucau, karine.laroucau@anses.fr, or V. I. Siarkou, vickysi@vet.auth.gr.

V.H. and P.B. contributed equally to this article. V.I.S. and K.L. contributed equally to this article.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03179-15>.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

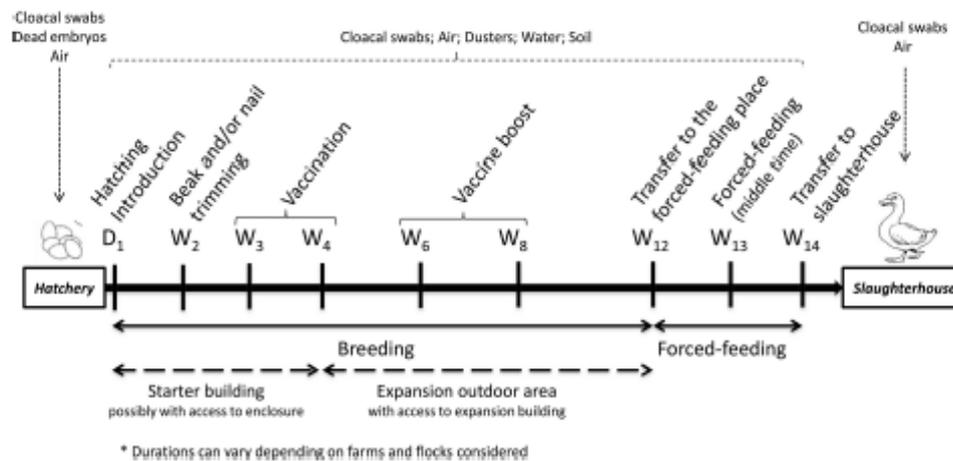


FIG 1 Interventions, samples, ages of ducks (in weeks), and living areas.

healthy on the breeding farm and become infected later, possibly by the environment.

Because within-flock *C. psittaci* circulation data are essential to implementing optimal management practices, we performed a field study on seven naturally infected but asymptomatic mule duck flocks. We sought to (i) describe *C. psittaci* shedding dynamics, (ii) determine environmental contamination, and (iii) identify circulating *C. psittaci* diversity. In order to assess the potential sources of worker exposure, cloacal swabs and air and environmental samples (dusters, water, and soil) were taken on each occasion on which humans were required to handle birds during the entire breeding process, i.e., from the hatchery to the slaughterhouse. *C. psittaci* bacteriophage Chp1 and amoebae were also screened for in order to understand their possible involvement in chlamydial persistence in the field, as previously suspected (19, 20). Furthermore, a questionnaire survey was conducted on duck farms to gather information on routine cleaning and disinfection practices and on farming activities in an attempt to explain the maintenance of the microorganism in its environment.

MATERIALS AND METHODS

Sampling. This study was conducted in seven mule duck flocks (A1, A2, B, C, D1, D2, and E) from five breeding farms (A to E) in western France. From January to July 2013, sampling was performed for each flock at each stage of the production process, from the hatchery to the slaughterhouse. A synthesis of the samples collected is presented in Fig. 1.

(i) **Avian samples.** In the hatchery, 15 randomly selected 1-day-old ducklings (per flock) were subjected to cloacal sampling and 15 dead embryos (unhatched eggs) were subjected to necropsy. Spleen, liver, lung, and intestine samples were taken during necropsy.

After the introduction of ducklings on farms (at the age of 1 day), 15 randomly selected ducks (per flock) were subjected to cloacal swab sampling whenever birds had to be handled by workers. Samples were taken during introduction, trimming of nails and beaks, vaccination against *Pasteurella multocida*, booster vaccination, transfer to the force-feeding room, force-feeding, transfer to the slaughterhouse, and slaughtering just after plucking (Fig. 1).

(ii) **Air samples.** Air samples ($n = 123$; Table 1) were collected using a microbial air sampler MAS-100 NT device (MBV, Switzerland). The device was placed as close as possible to the worker. Each sampling period lasted 10 min with the air pumped at a flow of 100 liters per min and

impacted a semiliquid agar as previously described (21). Two air samples were taken at each stage, except in the slaughterhouse where four samples were taken: two at the loading dock and two in the hanging area, which are two places where the birds are handled and in an agitated state.

(iii) **Environmental samples (dusters and water and soil samples).** In order to detect the presence of *C. psittaci* in the environment of the flocks, 196 environmental samples were obtained, in total, from the stages before transfer for force-feeding (Table 1). First of all, dusters ($n = 39$; Table 1) were used in farm buildings and runs. Pairs of foot-dusters ($n = 34$) were worn to cover the entire building area or the areas surrounding bird feeders and watering places in fields and were used for all stages except for the transfer to force-feeding, where a wall-duster ($n = 5$) was wiped on the building walls. The wall-duster was not used on flocks A2 (because of early slaughtering owing to a herpesvirus infection) and E (because the building had not been occupied for a long time and had already been cleaned). Two water samples from the watering places were obtained at each sampling time from introduction until the booster vaccination stage ($n = 52$; Table 1). Finally, soil samples (straw, droppings, or soil obtained from five different places frequented by the birds) were taken during the introduction, vaccination, and booster vaccination stages ($n = 105$; Table 1).

DNA extraction. Cloacal swabs were subjected to DNA extraction using a QIAamp DNA minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer-recommended "buccal swab spin" protocol. DNA was eluted with 150 μ l of elution buffer and stored at -20°C before analysis. Air samples were centrifuged at $32,000 \times g$ for 1 h at 10°C , the sediments were suspended in 400 μ l of phosphate-buffered saline (PBS). Dusters were placed in plastic bags with 30 ml of PBS and kneaded until the dusts were well mixed, and then 400 μ l of supernatant was collected. Both air and dust suspensions were then subjected to the same DNA extraction protocol as the cloacal swabs.

Water and soil samples were subjected to supplementary extraction steps in order to also collect DNA from possibly encysted amoebae. Briefly, for the water samples, 35 ml was centrifuged at $26,500 \times g$ for 1 h, and the sediment was then collected in 500 μ l of PBS. For the soil samples, approximately 5 g of sample was mixed with 10 ml of PBS and allowed to sediment, and then 500 μ l of supernatant was collected. Subsequently, both water and soil suspensions were subjected to five consecutive thermal shocks (2 min at -80°C in an ethanol bath and 1 min 30 at 99°C in a dry bath) and then ribolyzed, and 200 μ l of supernatant was collected and subjected to the same extraction protocol as the other samples.

Tissue samples (spleen, liver, intestine, and lung) collected from the unhatched eggs were submitted to DNA extraction using the QIAamp

TABLE 1 Results of chlamydia detection in avian and environmental samples from five duck farms^a

Flock and sample	Action	Date (day/mo/yr)	Place	Age (days)	Chlamydiae detection														
					Cloacal swabs					Air samples		Dusts		Water samples		Soil samples			
					23S-rPCR		IncA-rPCR		Genotype	No. pos/total	Cq	No. pos/total	Cq						
					No. pos/total	Mean Cq	No. pos/total ^b	Mean Cq											
A1																			
13-0273/1	Implementation	24/01/13	Starter building	1	0/15	NA				0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	2/5	37.7		
13-0458/1	Nail trimming	06/02/13	Starter building	14	1/15	35.9	0/1	NA		0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	ND	ND		
13-0550/1	Vaccination	19/02/13	Starter building + enclosures	27	15/15	24.2	15/15	28.9	E/B_06-859	1/2	35.7	1/1	28.0	0/2	NA	5/5	28.3		
13-0904/1	Vaccination boost	21/03/13	Outdoor area	57	13/15	34.6	13/13	34.1		0/2	NA	2/2	36.8	0/2	NA	1/5	40.0		
13-1159/1	Transfer	16/04/13	Outdoor area	83	10/15	32.2	10/10	33.2		0/2	NA	0/1	NA	ND	ND	ND	ND		
13-1159/2	Start of force-feeding	16/04/13								0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1328/1	Force-feeding	23/04/13		90	6/15	37.0	5/6	36.4		0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1328/2	Transfer	29/04/13		96	1/15	35.9	1/1	35.6		0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1328/3	Slaughtering	29/04/13			1/15	39.3	1/1	38.9		0/4	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
A2																			
13-0749/1	Implementation	07/03/13	Starter building	1	0/15	NA				0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	2/5	38.9		
13-0904/2	Nail and beak trimming	18/03/13	Starter building	12	0/15	NA				0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	ND	ND		
13-1030/1	Vaccination	04/04/13	Starter building + enclosures	29	15/15	26.9	15/15	26.9	E/B_06-859	1/2	37.8	2/2	31.3	2/2	32.0	5/5	31.6		
13-1376/1	Vaccination boost	02/05/13	Outdoor area	57	7/15	33.8	6/7	32.9		0/2	NA	0/2	NA	0/2	NA	2/5	38.6		
13-1598/1	Slaughtering	03/06/13		89	3/15	37.7	3/3	37.6		0/4	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
B																			
13-0273/2	Implementation	31/01/13	Starter building	1	0/15	NA				0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	0/5	NA		
13-0458/2	Nail trimming	14/02/13	Starter building	15	0/15	NA				0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	ND	ND		
13-0550/2	Vaccination	25/02/13	Starter building + enclosures	26	6/15	32.9	3/6	32.7	E/B_06-859	0/2	NA	1/1	36.2	0/2	NA	0/5	NA		
13-1030/2	Vaccination boost	28/03/13	Outdoor area	57	11/15	35.1	10/11	34.4	E/B_06-859	0/2	NA	0/2	NA	0/2	NA	3/5	37.1		
13-1328/4	Transfer	23/04/13	Outdoor area	83	5/15	33.0	5/5	33.0		0/2	NA	0/1	NA	ND	ND	ND	ND		
13-1328/5	Start of force-feeding	23/04/13								0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1328/6	Force-feeding	30/04/13		90	1/15	38.0	1/1	37.8		0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1376/2	Transfer	06/05/13		96	5/15	39.1	1/5	37.2		0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1376/3	Slaughtering	06/05/13			1/15	39.7	0/1	NA		0/4	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
C																			
13-0458/3	Implementation	14/02/13	Starter building	1	2/15	35.8	0/2	NA		0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	0/5	NA		
13-0749/2	Nail trimming	26/02/13	Starter building	13	0/15	NA				0/1	NA	0/1	NA	0/2	NA	ND	ND		
13-0749/3	Vaccination	07/03/13	Starter building	22	15/15	25.4	15/15	25.5	E/B_E30	1/2	36.6	1/1	28.7	2/2	27.9	5/5	28.8		
13-1030/3	Vaccination boost	28/03/13	Outdoor area	43	14/15	33.7	14/14	33.4		0/2	NA	2/2	35.0	2/2	38.2	4/5	36.0		
13-1376/4	Transfer	07/05/13	Outdoor area	83	5/15	36.9	4/5	37.1		0/2	NA	0/1	NA	ND	ND	ND	ND		
13-1376/5	Start of force-feeding	07/05/13								0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1458/1	Force-feeding	13/05/13		89	1/15	37.6	0/1	NA		0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1458/2	Transfer	21/05/13		97	3/15	37.0	2/3	37.0		0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1458/3	Slaughtering	21/05/13			1/15	39.9	0/1	NA		0/4	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
D1																			
13-0458/4	Implementation	14/02/13	Starter building	1	2/15	36.8	0/2	NA		0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	0/5	NA		
13-0749/4	Vaccination	07/03/13	Starter building	22	0/15	NA				0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	0/5	NA		
13-1030/4	Vaccination boost	04/04/13	Outdoor area	50	0/15	NA				0/2	NA	0/2	NA	0/2	NA	0/5	NA		
13-1376/6	Transfer	10/05/13	Outdoor area	86	7/15	37.0	5/7	37.0		0/2	NA	0/1	NA	ND	ND	ND	ND		
13-1376/7	Start of force-feeding	10/05/13								0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1458/4	Force-feeding	15/05/13		91	4/15	37.4	3/4	37.5		0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1458/5	Transfer	22/05/13		98	5/15	37.7	4/5	36.5		0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13/1458/6	Slaughtering	22/05/13			1/15	39.0	1/1	39.0		0/4	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
D2																			
13-1159/3	Implementation	11/04/13	Starter building	1	0/15	NA				0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	0/5	NA		
13-1376/8	Vaccination	06/05/13	Starter building + enclosures	26	0/15	NA				0/1	NA	0/1	NA	0/2	NA	0/5	NA		
13-1598/2	Vaccination boost	03/06/13	Outdoor area	55	14/15	32.8	13/14	32.1	E/B_06-859	0/2	NA	0/2	NA	2/2	39.4	1/5	37.9		
13-2060/1	Transfer	05/07/13	Outdoor area	86	4/15	36.7	3/4	37.1		0/2	NA	1/1	39.7	ND	ND	ND	ND		
13-2060/2	Start of force-feeding	05/07/13								0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-2060/3	Force-feeding	08/07/13		89	2/15	37.3	2/2	37.4		0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-2060/4	Transfer	18/07/13		99	2/15	35.3	2/2	35.7		0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-2060/5	Slaughtering	18/07/13			1/15	34.5	1/1	35.5		0/4	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
E																			
13-0749/5	Implementation	28/02/13	Starter building	1	0/15	NA				0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	0/5	NA		
13-0904/3	Nail trimming	08/03/13	Starter building + enclosures	9	0/15	NA				0/1	NA	0/1	NA	0/2	NA	ND	ND		
13-0904/4	Vaccination	21/03/13	Outdoor area	22	0/15	NA				0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	0/5	NA		
13-1159/4	Vaccination boost	11/04/13	Outdoor area	43	0/15	NA				0/2	NA	0/2	NA	2/2	38.7	1/5	37.6		
13-1458/7	Transfer	17/05/13	Outdoor area	79	15/15	32.3	15/15	32.7	E/B_06-859	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1458/8	Start of force-feeding	17/05/13								0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1598/3	Force-feeding	22/05/13		84	12/15	35.6	10/12	34.7	E/B_06-859	0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1598/4	Transfer	29/05/13		91	6/15	36.9	5/6	36.4		0/2	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
13-1598/5	Slaughtering	29/05/13			7/15	38.0	7/7	38.0		0/4	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND		

^a ND, not done; NA, not applicable. No. pos/total = number of positive swabs/total number of tested swabs (except as noted in footnote b).^b No. pos/total = number of positive swabs/number of Chlamydiae PCR-positive swabs.^c -, no amplification on electrophoresis; +, amplification on electrophoresis.

TABLE 1 (Continued)

Bacteriophage detection										Amoeba detection ^a			
Cloacal swabs		Air samples		Dustiers		Water samples		Soil samples		Water		Soil	
No. pos/total	Mean Cq	No. pos/total	Cq	No. pos/total	Mean Cq	No. pos/total	Mean Cq	No. pos/total	Mean Cq	Amo	Vahl	Amo	Vahl
0/15	NA	0/2	NA	1/1	35.4	0/2	NA	3/5	34.6	+	-	+	+
3/15	38.5	1/2	38.2	1/1	36.8	0/2	NA	ND		+	-		
14/15	35.5	2/2	37.3	1/1	30.2	0/2	NA	5/5	33.7	+	+	-	-
14/15	35.3	0/2	NA	2/2	35.2	0/2	NA	1/5	37.4	+	+	+	-
13/15	35.7	0/2	NA	1/1	36.8	ND	ND	ND					
		0/2	NA	ND		ND	ND	ND					
6/15	35.7	0/2	NA	ND		ND	ND	ND					
4/15	34.5	0/2	NA	ND		ND	ND	ND					
4/15	35.8	0/4	NA	ND		ND	ND	ND					
0/15	NA	0/2	NA	1/1	37.4	0/2	NA	2/5	38.4	-	-	+	+
2/15	38.3	1/2	39.3	0/1	NA	0/2	NA	ND		+	-		
12/15	37.2	2/2	36.2	2/2	34.7	0/2	NA	5/5	35.2	+	+	-	-
10/15	35.6	1/2	37.2	0/2	NA	0/2	NA	2/5	38.5	+	+	+	-
4/15	36.3	1/4	39.5	ND		ND	ND	ND					
0/15	NA	0/2	NA	1/1	33.2	0/2	NA	0/5	NA	+	-	+	+
0/15	NA	0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	ND		+	-		
10/15	38.0	0/2	NA	1/1	32.8	0/2	NA	0/5	NA	-	-	+	-
15/15	33.7	0/2	NA	2/2	33.3	0/2	NA	5/5	36.9	+	-	+	+
8/15	33.7	1/2	38.0	1/1	36.7	ND	ND	ND					
		1/2	38.1	ND		ND	ND	ND					
5/15	32.8	0/2	NA	ND		ND	ND	ND					
5/15	33.7	0/2	NA	ND		ND	ND	ND					
3/15	35.7	0/4	NA	ND		ND	ND	ND					
1/15	39.9	0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	1/5	35.6	+	-	+	-
2/15	39.1	0/1	NA	1/1	39.1	0/2	NA	ND		+	-		
15/15	28.9	2/2	34.4	1/1	26.4	2/2	35.5	5/5	31.4	+	-	-	+
15/15	31.3	2/2	36.1	2/2	34.9	0/2	NA	3/5	38.4	+	-	+	-
11/15	34.4	0/2	NA	1/1	28.5	ND	ND	ND					
		1/2	38.9	ND		ND	ND	ND					
7/15	35.5	0/2	NA	ND		ND	ND	ND					
7/15	34.2	0/2	NA	ND		ND	ND	ND					
6/15	37.5	0/4	NA	ND		ND	ND	ND					
0/15	NA	0/2	NA	0/1	NA	0/2	NA	0/5	NA	+	+	+	+
0/15	NA	1/2	38.1	1/1	36.9	0/2	NA	1/5	36.0	+	+	+	+
3/15	39.2	0/2	NA	1/2	35.5	0/2	NA	0/5	NA	+	+	+	+
11/15	32.1	2/2	34.8	1/1	30.9	ND	ND	ND					
		1/2	33.8	ND		ND	ND	ND					
14/15	32.6	1/2	35.6	ND		ND	ND	ND					
13/15	34.2	2/2	38.7	ND		ND	ND	ND					
14/15	34.3	2/4	39.4	ND		ND	ND	ND					
0/15	NA	0/2	NA	1/1	39.7	0/2	NA	0/5	NA	+	+	-	+
2/15	39.6	0/1	NA	1/1	38.8	0/2	NA	0/5	NA	+	-	+	+
14/15	34.5	2/2	36.8	2/2	34.8	0/2	NA	1/5	35.1	+	+	+	+
5/15	32.7	1/2	38.9	1/1	33.9	ND	ND	ND					
		0/2	NA	ND		ND	ND	ND					
4/15	35.9	0/2	NA	ND		ND	ND	ND					
2/15	37.1	0/2	NA	ND		ND	ND	ND					
2/15	36.1	0/4	NA	ND		ND	ND	ND					
0/15	NA	0/2	NA	1/1	37.8	0/2	NA	1/5	35.8	+	-	-	+
1/15	39.9	0/1	NA	1/1	36.5	0/2	NA	ND		-	-		
0/15	NA	0/2	NA	1/1	36.0	0/2	NA	0/5	NA	+	-	-	-
9/15	39.1	0/2	NA	2/2	35.9	2/2	38.3	1/5	37.1	+	+	+	-
14/15	28.5	ND	ND	ND		ND	ND	ND					
		2/2	33.5	ND		ND	ND	ND					
15/15	29.5	2/2	37.2	ND		ND	ND	ND					
14/15	32.1	2/2	35.9	ND		ND	ND	ND					
15/15	33.0	3/4	37.9	ND		ND	ND	ND					

DNA minikit according to the manufacturer's "tissue protocol." DNA was eluted with 200 μ l of elution buffer and stored at -20°C before analysis.

Direct detection of chlamydiae from DNA samples. For all DNA samples, a first screening was performed using a *Chlamydiaceae*-specific real-time PCR targeting the 23S rRNA gene (23S-rtPCR) (22). Each reaction mix contained 2 μ l of sample DNA template, 10 μ l of 2 \times Universal Mastermix (Applied Biosystems), 0.5 μ l of each primer (25 mM) and 2 μ l of the probe (1 mM), and 5 μ l of deionized water. DNA samples found to be positive in the 23S-rtPCR were further analyzed by a *C. psittaci*-specific real-time PCR targeting the *incA* gene (23). A positive control (*C. psittaci* Loth strain) was systematically included, and an internal control for potential PCR inhibition (TaqMan exogenous internal positive control; Applied Biosystems) was used for the environmental samples (dusters, water, and soil). All samples with a quantification cycle (Cq) over 40 were considered as negatives. A sample with a $20 < \text{Cq} \leq 30$ value was regarded as highly positive, while $30 < \text{Cq} \leq 35$ was regarded as moderate, and $\text{Cq} > 35$ was regarded as low positive.

Genotyping. The most concentrated *C. psittaci*-positive DNA samples ($\text{Cq} < 30$), obtained from cloacal swabs and environmental DNA samples, were further analyzed to determine the genotypes involved. The *ompA* gene taken from positive samples was amplified using the 3GPF/5GPB primer set as previously described (24). The PCR products were sequenced at MWG (Biotech France, Roissy, France).

Detection of *C. psittaci* bacteriophage Chp1. All DNA samples were screened for the presence of the bacteriophage Chp1. Initially, a real-time PCR assay targeting a 168-pb fragment of the gene encoding the major capsid protein VP1 (ORF 1) was performed with the primers VP1_Chp1_forw (5'-CCGCCTTTTGTAAAGGGTGA-3') and VP1_Chp1_rev (5'-ATGAACGCCAAAATGACCTTG-3') and the VP1_Chp1_probe (5'-FAM-GTTTATGTTGATTAGCGGCTTCA-TAM-3'). Sequencing of both strands of fragments of ORF 1 gene (521 pb), as well as the ORF 2 gene encoding the minor spike protein VP2 (433 pb), was performed on the most Chp1-concentrated DNA samples using the primer pairs VP1_forw (5'-TGGTACGACTGTTGCCAAA-3')/VP1_rev (5'-CAGGCTGCTCTCCAAATGA-3') and VP2_forw (5'-TTTGGCGGCTTGC TTCAGG-3')/VP2_rev (5'-CAGGCAACAACCTTGCCAGC-3'), respectively, to confirm the presence of the *C. psittaci*-specific bacteriophage (Chp1) in the samples. Amplification conditions consisted in an initial denaturation step at 95°C for 10 min followed by 30 cycles of amplification consisting of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 58°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min. This was followed by incubation at 72°C for 10 min.

Detection of amoebae. All DNA samples from water and soil were also screened for the presence of free-living amoebae. PCR analyses were performed by amplification of the 18S rRNA gene with primers specific for *Amoebozoan* (Amo_1400_F/Amo-1540-R) and *Vahlkampfiidae* (Vahl_560_F/Vahl_730_R), as described previously (25).

Survey on farming practices and activities. Appropriate information regarding the management, the feeding and watering practices, the cleaning and disinfection procedures (in the different buildings and fields and of the equipment used on the breeding farms), the health status of birds, and the infection-limiting precautions and antimicrobial treatments were collected by filling in a questionnaire during farm visits (Table 2). Farmers were also asked about the proximity of other breeding farms and the presence of other avian species (wild or farm birds).

Statistical analysis. The correlation among dependent variables of interest: the prevalence of *C. psittaci* shedders and the *C. psittaci* excretion level (shedding), the *C. psittaci* contamination and load in air and environmental samples, the prevalence and excretion level of bacteriophage Chp1, and the independent variables expressing the ducks' ages, management practices (feeding and watering practices, cleaning and disinfection practices), and worker activities were tested with the use of the nonparametric Spearman's correlation coefficient (Spearman's rho) test. Mann-Whitney and Kruskal-Wallis nonparametric tests were carried out to investigate the effect of the breeding space, as a two-level (indoors and

outdoors) or three-level (indoors, enclosure, and outdoor expansion area) factor, respectively, on *C. psittaci* shedding patterns, as dependent variables of interest. A series of nonparametric Mann-Whitney tests was also performed in order to determine whether the *C. psittaci* contamination of environmental samples (water and soil) differed based on the occurrence of amoebae in the respective samples. Moreover, the impact of the intervention, as a multilevel factor, on *C. psittaci* prevalence and shedding was explored using the Kruskal-Wallis nonparametric test accompanied by a post hoc homogeneous subsets stepwise procedure, which is able to find specific significant differences among factor levels. The impact of the month of the year on *C. psittaci* shedding, also as a multilevel factor, was explored using the Kruskal-Wallis nonparametric test. The significance level of all tests was 0.05. Nonparametric tests were used for all analyses due to the lack of normality in their distribution. Graphical methods such as scatterplots and box plots were used in order to visualize correlation and differences. Statistical analysis was performed using SPSS (Statistical Package for Social Science) software (version 22; IBM Co, New York, NY).

RESULTS

C. psittaci was detected in each of the seven mule duck flocks studied, although none of the birds sampled during this study presented clinical signs of avian chlamydiosis. Flock A2 was slaughtered early, before the force-feeding process, due to a suspicion of a herpesvirus infection causing high mortality in the flock.

Prevalence of *C. psittaci* shedders and excretion level during the whole breeding process. In the hatchery, all cloacal swabs obtained from 1-day-old ducklings were negative for chlamydiae when tested with the 23S-rtPCR. Moreover, only five organs taken from five different dead embryos (unhatched eggs) from flocks A1, C, and E were weakly positive (respectively, a lung [Cq 38.8] and an intestine [Cq 39.1], a spleen [Cq 39.5] and a lung [Cq 39.5], and a liver [Cq 38.9]).

In the farms, all flocks presented *C. psittaci*-positive birds (shedders) during the breeding process, with the prevalence of shedders reaching up to 100% (15/15) and decreasing to 6.7% (1/15), until reaching the slaughterhouse (Table 1). The higher levels of *C. psittaci* shedding (lower Cq values) occurred at the peak of shedder prevalence (statistically significant negative correlation between positive birds and mean Cq values; Spearman's rho = -0.636 , $P < 0.001$; see Fig. S1 in the supplemental material). Three different shedding patterns were observed (Fig. 2). The first pattern was observed in flocks A1, A2, and C harboring birds with heavy shedding (mean Cq of 25) about the age of 4 weeks, which for flocks A1 and A2 coincided with the first access of the ducks to a small outdoor enclosure near the livestock building. A second pattern was observed in flocks B and D2 with a moderate shedding (mean Cq values of 32.8 and 35.1) around 8 weeks of age, which coincided with a period when the birds were in the outdoor expansion area. Finally, a third pattern observed in flocks D1 and E was characterized by a low (mean Cq values up to 37) and late shedding detected during the force-feeding process at around 12 weeks of age. A statistically significant positive correlation was observed between mean Cq values and age (Spearman's rho = 0.654 , $P < 0.001$), whereas there was no statistical correlation between *C. psittaci* prevalence or shedding and months of the year ($P > 0.05$). Only the E/B genotype of *C. psittaci* was detected, with the subgenotype E/B_06-859 identified in most of the flocks tested (A1, A2, B, D1, and E) and the subgenotype E/B_E30 in flock C. At the slaughterhouse, in most cases, in addition to the low preva-

TABLE 2 Survey on farming practices and activities in farms A, B, C, D, and E

Item	Observed practices	Farm				
		A	B	C	D	E
Interactions between two batches						
No. of different ages on site	Two different ages present concurrently on site	x	x	x	x	x
	Only one age					
Interval between new batches	One new batch every 7 to 8 wks	x	x	x	x	x
Management of enclosure (outdoor area adjacent to starter building) ^a						
Use of lime: depending on the breeder, spreading of lime for each depopulation period or once a year, over the whole enclosure or only in part (immediate surroundings, around hatches, etc.); spreading takes place on a moist surface with about 0.5 to 1 kg of lime per m ²	No					
	Yes, whole enclosure for each batch		x			
	Yes, in part for each batch				x	
	Yes, whole enclosure once a year					x
	Yes, in part (surrounds and entrances) once a year	x				
Surface scraping of enclosure	Yes, once a year in spring		x		x	
	No	x				x
Depopulation	5 wks	x	x		x	
	3 to 5 wks					x
Management of outdoor expansion area ^b						
Use of lime	Yes, whole run once a year	x	x			
	No			x	x	x
Surface scraping of run	Yes, once a year in spring		x	x	x	
	No	x				x
Depopulation: more than 3 wks on most breeder farms, but highly variable (from 0 days to 8 wks)	7 to 8 wks		x			
	6 to 7 wks				x	
	3 to 6 wks	x				x
	None			x		
Cleaning and disinfection of starter building						
Cleaning with a high-pressure cold water pump using an alkaline foam detergent, Agromousse, applied to partitions and ceilings	Application of a foam detergent with a contact time of 6 h, then action with high-pressure cold water pump	x				
	Application of a foam detergent with a contact time of 15 min, then action with high-pressure cold water pump		x	x	x	x
Disinfection using a disinfectant containing quaternary ammonium and glutaraldehyde at a dilution of 1% (a bactericide by contact in 5 min, a virucide in 15 min)	Yes, two disinfections, one after washing and one before arrival of next ducklings					x
	Yes, one disinfection after washing, followed by one fumigation (Fumagri, orthophenylphenol)		x			
	Yes, 1 disinfection after washing	x		x		x
Use of lime (all or part, frequency).	Yes, throughout for each batch		x	x	x	x
	Not systematically	x				
Cleaning of starter equipment product recommended by professional agricultural body (0.5% sodium hypochlorite)	Washing with water and disinfection by soaking 24 h with sodium hypochlorite		x			
	Washing with water and disinfection by soaking a few hours with sodium hypochlorite					x
	Washing with water and disinfection by soaking 24 h with acid descaler-detergent	x				
	Washing with water and disinfection (quaternary ammonium and glutaraldehyde) by spraying with all-round disinfectant					x
	Washing with water and disinfection by spraying with sodium hypochlorite			x		
Cleaning of piping	Use of an alkaline (sodium hypochlorite) 30 min, then rinsing, then an acid descaler-detergent for 30 min					x
	Use of an alkaline (sodium hypochlorite) 30 min to 1 h	x				
	Rinsing with water		x	x		x
Depopulation of starter building	1 wk	x	x	x		
	2 wks					x
	Up to 3 wks					x
Cleaning and disinfection of expansion facility						
Removal of litter	Yes		x		x	x
	Not systematically after each batch, but regularly (more than twice a year)	x				
	Twice a year			x		

(Continued on following page)

TABLE 2 (Continued)

Item	Observed practices	Farm				
		A	B	C	D	E
Washing with high-pressure cold water pump	Yes, all surfaces				x	x
	Not systematically: only all partitions		x			
	Not systematically: only base of partitions	x				
Application of an alkaline foam detergent (Agromousse) applied to partitions and ceiling	Carried out once a year in full			x		
	Yes, contact time > 15 min		x		x	x
	No	x		x		
	Yes, two disinfections, one after washing and one before arrival of ducks					x
Disinfection using a disinfectant containing quaternary ammonium and glutaraldehyde	Yes, one disinfection after washing					x
	Carried out once a year			x		
	Never	x	x			
	Yes, throughout for each batch		x		x	
Spreading of lime (all or part, frequency); spreading was carried out on a moist surface with about 0.5 to 1 kg of lime per m ²	Yes, throughout for each batch except if depopulation interval is too short (in winter)					x
	No	x		x		
Cleaning of expansion facility equipment	Systematic cleaning with cold water without disinfection				x	
	Washing with cold water without disinfection not systematic	x	x			x
	Washing once a year with water, then disinfection with sodium hypochlorite by soaking 1/2 day			x		
Cleaning of piping	Use of an alkaline (sodium hypochlorite) 30 min, then rinsing, then an acid descaler-detergent 30 min				x	
	Rinsing with water, no use of products	x	x	x		x
Depopulation of expansion facility	3 to 4 wks	x				
	1 wk					x
	A few days		x		x	
	None			x		
Interactions between animals of the same batch						
Access to building throughout rearing phase (summer)	No, no shelter beyond 3 wks of age			x		x
	No, no shelter beyond 5 wks of age				x	
	Sometimes no	x				
Access to building throughout rearing phase (winter)	Always yes		x			
	No, no shelter beyond 6 wks of age					x
Startup density (ducks/m ²)	Always yes	x	x	x	x	
	12 ducks/m ²	x	x			
	14 ducks/m ²			x		
	19 ducks/m ²				x	x
No. of drinkers available at introduction (one drinker available per no. of ducklings)	One drinker for less than 100 ducklings or drinking nipples available					x
	One drinker for more than 100 but less than 150 ducklings		x			
	One drinker for more than 150 ducklings	x		x		x
Feeders available at introduction (1 feeder available per no. of ducklings)	One feeder for less than 50 ducklings or chain feeders	x			x	
	One feeder for more than 50 but less than 70 ducklings		x			
	One feeder for more than 70 ducklings			x		x
Management of straw in starter building	Straw added every day	x	x	x	x	x
Mortality over first 4 days (%)	≤0.1	x	x	x		
	≤0.2					x
	0.2 to 0.5				x	
Density of animals in enclosure adjacent to expansion building (ducks/m ²)	2 ducks/m ²	x				
	5 ducks/m ²					x
	10 ducks/m ²		x		x	
Time in enclosure adjacent to expansion building (weeks)	1 week		x			x
	2 weeks	x			x	
	3 weeks					
Surface of outdoor run area available per duck (m ² /duck)	30 m ² /duck	x				
	15 m ² /duck			x		
	5 m ² /duck				x	x
			x		x	x

(Continued on following page)

TABLE 2 (Continued)

Item	Observed practices	Farm					
		A	B	C	D	E	
Time on outdoor run area (wks)	7	x			x		
	8		x				
	9			x		x	
Drinking troughs available for 2,000 ducks	Three drinking troughs				x		
	Four drinking troughs	x		x			
	Five drinking troughs		x			x	
Feeding troughs available for 2,000 ducks	Three feeding troughs				x		
	Five feeding troughs	x	x	x			
	Eight feeding troughs					x	
Density in expansion building (ducks/m ²)	7 ducks/m ²	x		x	x		
	14 ducks/m ²		x				
	15 ducks/m ²					x	
Management of straw in outdoor run facility	Every day	x		x	x	x	
	Every second day		x				
Interactions between humans and animals							
Setup							
No. of persons present when animals are handled	1	x				x	
	2		x	x	x		
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	10						
	Origin of persons (private company, neighbors, other breeders)	Farm's own personnel	x	x	x	x	x
		Personnel from neighboring ready-for-gavage farms					
Workers from a private company specializing in the handling of poultry and rabbits							
Duration of operations	1 to 2 h	x	x	x	x	x	
	1/2 day						
	1 day or several 1/2 days						
Place of operation (open-air vs indoor facility)	More than 1 day						
	Closed building	x	x	x	x	x	
	Building with wide-open doors						
	Open-air facility						
Debeaking (only for farm C)							
No. of persons present when animals are handled	1			x			
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	10						
	Origin of persons (private company, neighbors, other breeders)	Farm's own personnel			x		
		Personnel from neighboring ready-for-gavage farms					
Workers from a private company specializing in the handling of poultry and rabbits							
Duration of operations	1 to 2 h						
	1/2 day						
	1 day or several 1/2 days						
Place of operation (open air vs indoor facility)	More than 1 day				x		
	Closed building				x		
	Building with wide-open doors						
	Open air						
Declawing/debeaking							
No. of persons present when animals are handled	1						
	2		x	x			
	3						

(Continued on following page)

TABLE 2 (Continued)

Item	Observed practices	Farm				
		A	B	C	D	E
	4					
	5					
	6	x				x
	7					
	10					
Origin of persons (private company, neighbors, other breeders)	Farm's own personnel		x	x		
	Personnel from neighboring ready-for-gavage farms	x				
	Workers from a private company specializing in the handling of poultry and rabbits					x
Duration of operations	1 to 2 h					
	1/2 day	x	x	x		x
	1 day or several 1/2 days					
Place of operation (open-air vs indoor facility)	More than 1 day					
	Closed building	x	x	x		x
	Building with wide-open doors					
Open air						
Primary vaccination						
No. of persons present when animals are handled	1	x		x		
	2		x			
	3					
	4					x
	5					
	6					x
	7					
	10					
Origin of persons (private company, neighbors, other breeders)	Farm's own personnel	x	x	x		
	Personnel from neighboring ready-for-gavage farms					
	Workers from a private company specializing in the handling of poultry and rabbits				x	x
Duration of operations	1 to 2 h					
	1/2 day		x		x	x
	1 day or several 1/2 days	x				
Place of operation (open-air vs indoor facility)	More than 1 day			x		
	Closed building		x	x	x	x
	Building with wide-open doors	x				
Open air						
Booster vaccination						
No. of persons present when animals are handled	1	x		x		
	2		x			
	3					
	4					x
	5					
	6					x
	7					
	10					
Origin of persons (private company, neighbors, other breeders)	Farm's own personnel	x	x	x		
	Personnel from neighboring ready-for-gavage farms					
	Workers from a private company specializing in the handling of poultry and rabbits				x	x
Duration of operations	1 to 2 h					
	1/2 day		x		x	x
	1 day or several 1/2 days	x				
Place of operation (open-air vs indoor facility)	More than 1 day			x		
	Closed building					x
	Building with wide-open doors			x		x
Open air	x	x				
Transfer to force-feeding						
No. of persons present when animals are handled	1					
	2					
	3					

(Continued on following page)

TABLE 2 (Continued)

Item	Observed practices	Farm				
		A	B	C	D	E
	4					
	5					
	6	x			x	x
	7					
	10		x	x		
Origin of persons (private company, neighbors, other breeders)	Farm's own personnel					
	Personnel from neighboring ready-for-gavage farms	x				
	Workers from a private company specializing in the handling of poultry and rabbits		x	x	x	x
Duration of operations	1 to 2 h	x	x	x	x	x
	1/2 day					
	1 day or several 1/2 days					
Place of operation (open-air vs indoor facility)	More than 1 day					
	Closed building					
	Building with wide-open doors	x			x	
	Open air		x	x		x

^a Use for 1 to 3 weeks starting from day 15 or 4 weeks depending on weather conditions.

^b Use for 8 weeks from age 4 weeks with rotation of two or three runs of 1 Ha each (highly variable depending on available surface area).

lence of shedders, the level of *C. psittaci* shedding was particularly low (mean Cq of 39) (Table 1).

Air and environmental contamination by *C. psittaci*. All air samples collected at the hatchery and the slaughterhouse were found to be negative. Positive air samples with a generally low load of *C. psittaci* (Cq of 35.7 to 37.7) were detected in three flocks (A1, A2, and C) (Table 1), when the birds were heavy shedders (low mean Cq of 25) (statistically significant negative correlation between Cq values of shedders and positive air samples; Spearman's rho = -0.479, $P = 0.003$). Dusters were detected positive (Cq values ranging from 28 to 39.7) in flocks A1, A2, and C, as well as in flocks B and D2 harboring the heavy and moderate shedders, respectively (Table 1). The dusters were not taken at the transfer-to-slaughterhouse step for either flock A2 (because of the herpesvirus outbreak) or flock E (because the building was already cleaned and had been empty for 6 weeks). Similarly, the soil samples originating from flocks A1, A2, B, C, and D2 were positive (Cq values ranging from 28.9 to 40). Chlamydia was detected in water samples (Cq values ranging from 27.9 to 39.4) obtained from flocks A2, C, D2, and E, whereas none of the environmental samples obtained from flock D1 were positive (Table 1). A statistically significant positive correlation was observed between the prevalence of shedders and the positive environmental samples: dusters (Spearman's rho = 0.639, $P < 0.001$), water samples (Spearman's rho = 0.496, $P = 0.010$), and soil samples (Spearman's rho = 0.818, $P < 0.001$). As expected, the soil samples were mainly positive when the birds were heavy shedders (statistically significant negative correlation between Cq values of shedders and positive soil samples; Spearman's rho = -0.726 with $P = 0.011$). Moreover, there was a strong relationship between *C. psittaci* load in soil samples and those in dusters and water samples; in fact, there was a perfect match between the orderings of the corresponding Cq values, yielding a Spearman's rho equal to 1. Sequencing of the *ompA* gene confirmed the presence of an E/B genotype of *C. psittaci* in the environmental samples harboring the same subgenotypes as those identified in the birds (E/B_06-859 or E/B_E30) (Table 1).

Presence of bacteriophage Chp1 and amoebae in avian and environmental samples. The bacteriophage Chp1 was detected in all flocks, based on the real-time PCR assay targeting the ORF 1 gene. The bacteriophage was mostly detected (with Cq values ranging from 30 to 40) when birds were heavy chlamydial shedders. Specifically, the higher levels of *C. psittaci* shedding (lower Cq values) occurred at the peak of prevalence of Chp1 shedders (statistically significant negative correlation between Cq values of *C. psittaci* shedders and cloacal swabs positive for Chp1; Spearman's rho = -0.329 with $P = 0.047$). Also, there was statistically significant positive correlation between the prevalence of *C. psittaci* and Chp1 shedders (Spearman's rho = 0.846 with $P < 0.001$). However, though some *Chlamydiaceae*-positive DNA samples were negative for Chp1, this phage was also detected on *Chlamydiaceae*-negative samples. Sequencing of the ORF 1 and ORF 2 genes was performed on DNA collected on swabs from six of the seven flocks (A1, B, C, D1, D2, and E). Sequences were aligned and compared to the corresponding Chp1 sequence (accession number NC_001741). All ORF 1 fragments were identical to the ORF 1 sequence of Chp1, but three different sequences with three point mutations were obtained for the ORF 2 gene (detected in flock B for the first, in flock C for the second, and in flocks A1, D1, D2, and E for the third) compared to the ORF 2 sequence of Chp1 (see Fig. S2 in the supplemental material). The three new sequences of ORF 2 were submitted to the European Nucleotide Archive (accession numbers LN906837 to LN906839).

Free-living amoebae were detected in DNA samples from both water and soil, with a higher prevalence for *Amoebozoan* (38/52 and 41/105 water and soil samples tested, respectively) than for *Vahlkampfiidae* (16/52 and 27/105). However, no significant difference was found between the values of *C. psittaci* contamination in the environmental samples and the occurrence of amoebae (*Amoebozoan* and *Vahlkampfiidae*) in the corresponding samples ($P > 0.05$ in all nonparametric Mann-Whitney tests performed).

Evaluation of farming practices and activities. Questions concerning the management practices routinely applied in each breeding farm or flock were grouped according to the interactions

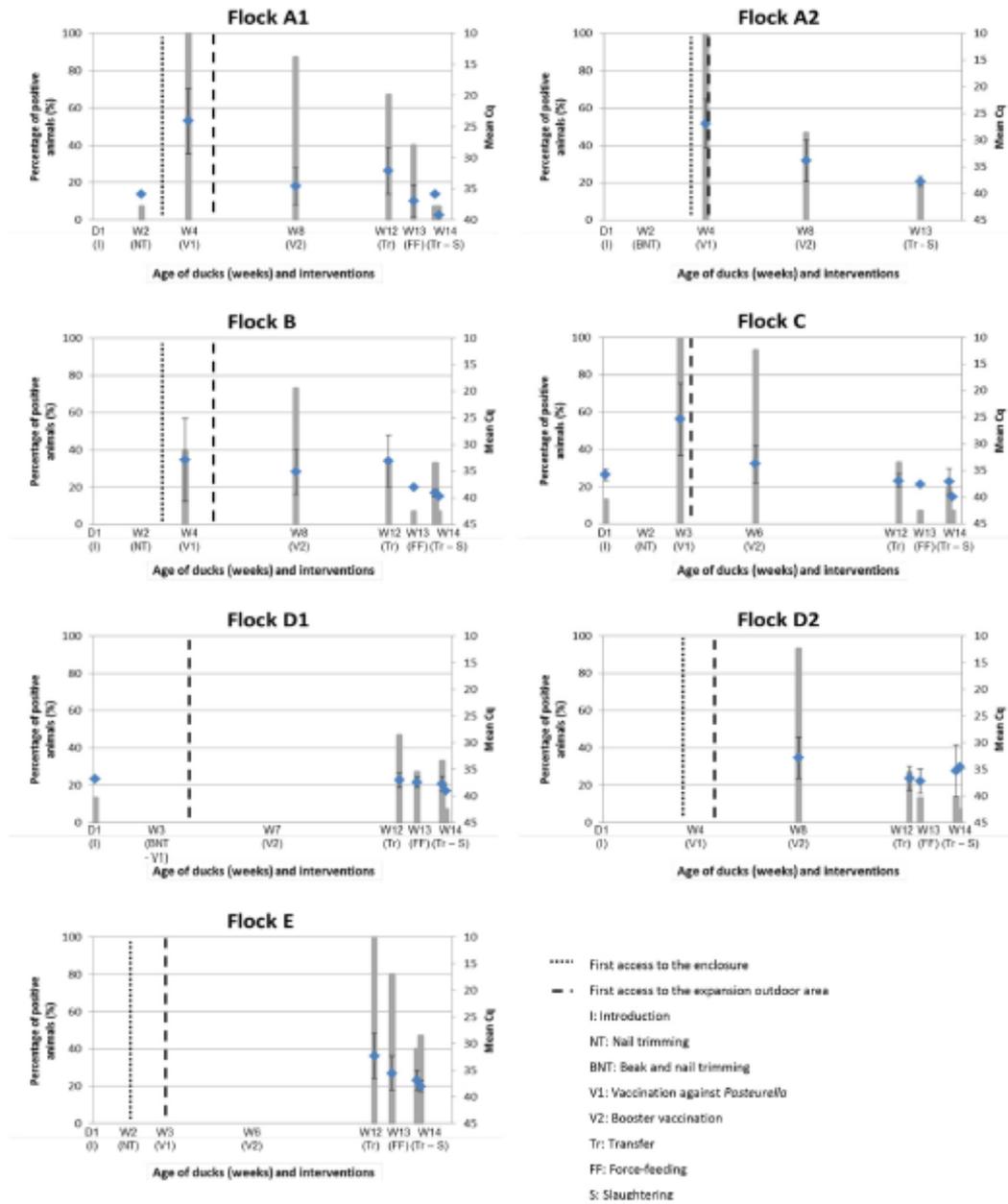


FIG 2 Levels of shedding in flocks A1, A2, B, C, D1, D2, and E. The percentages of positive animals are represented by histograms, and the mean Cq of each sampling time is indicated by a mark with the associated standard deviation.

between two batches (cleaning and disinfection practices) or between birds of the same batch (feeding and watering, as well as bird density), while the interactions between humans and birds were additionally categorized according to the farming activities (interventions) (Table 2). In order to conduct statistical analysis, numerical scores were given for each practice or activity, which were correlated with the prevalence and level of *C. psittaci* shedding (Table 1) and were evaluated for all spaces separately (outdoors or indoors) or overall (outdoors and indoors). In each farm,

none of the outdoor areas were adjacent to the outdoor areas of another farm. Only farm D raised another avian species in parallel (pheasants), whereas measures against wild animals or birds were taken in all cases but without real efficiency. Water came from public networks and occasionally from wells, except for farm C, where it came only from a well. The water network was acid-treated regularly, except in farm B. All farmers used the same cleaning and/or disinfection products supplied by the same company but applied them in different ways and at different frequen-

cies. The analysis showed that the prevalence of *C. psittaci* shedders was inversely related to the level of disinfection. Lower percentages of *C. psittaci* shedders were generally associated with high levels of disinfection applied to starter-building facilities; a negative correlation (Spearman's $\rho = -0.352$, $P = 0.048$), significant with respect to the significance level of 0.05, was detected (see Fig. S3 in the supplemental material). The practice of using an alkaline detergent for cleaning in the expansion building was not followed by farms A and C harboring the heavy *C. psittaci* shedders (Table 2). Expansion buildings were regularly limed, again with the exception of farms A and C. The manure was removed from the building after each flock except in farm C, where it was removed only twice a year. Furthermore, every farm except farm C underwent a depopulation period of varying durations. Finally, regarding worker activities, a significant correlation (Spearman's $\rho = -0.629$, $P < 0.001$) was found between the place of interventions (open air versus closed building) and the prevalence of *C. psittaci* shedders; the prevalence was higher when the corresponding operations took place in the open air (see Fig. S4 in the supplemental material). Moreover, a negative correlation was observed between the duration of operations and Cq values of *C. psittaci* shedding (Spearman's $\rho = -0.498$, $P = 0.035$); the load of shedding was higher (low Cq values) when the operation lasted for one or more than 1 day (see Fig. S5 in the supplemental material).

DISCUSSION

This study was carried out on seven mule duck flocks to explore *C. psittaci* circulation from the hatchery to the slaughterhouse and to identify and evaluate possible zoonotic pathways and means of *C. psittaci* persistence in these environments. All flocks explored in this study harbored positive birds at different moments during the breeding process, confirming the high prevalence of *C. psittaci* in mule ducks in France. We chose to analyze cloacal swabs in order to describe *C. psittaci* shedding dynamics in infected birds since chlamydiae may survive as commensals in the gastrointestinal tracts of virtually all natural hosts and persist for long periods without any overt inflammation or pathology (26). It is worth mentioning that quite similar shedding levels were obtained from cloacal and pharyngeal swabs collected and analyzed in parallel in a previous survey conducted on ducks (6). Only the E/B genotype was detected in these flocks. This genotype has been found to be common in duck farms and has already been implicated in duck-associated human cases of psittacosis in France (6).

In this study, three different patterns of *C. psittaci* shedding were highlighted involving birds about the age of 4, 8, and 12 weeks with heavy, moderate, and low excretion levels, respectively. The pattern corresponding to the heavy and early shedding detected in 4-week-old birds was novel compared to those identified in a previous study conducted on other duck breeding farms from the same geographical area (18). The latter study raised many questions as to whether the environment could play an important role in maintaining infection in duck farms. In most of the cases in the present study, the peak of *C. psittaci* shedding was detected in ducks that concomitantly had access to an outdoor run (from 1 to 4 weeks, depending on flocks). In birds of flocks A1 and A2, the heavy shedding coincided with their first access to a small outdoor field (enclosure) near the livestock building, whereas the moderate shedding presented by the birds of flocks B and D2 coincided with the period when they were on the outdoor run

(outdoor expansion area). The exception to this rule was flock C, which harbored birds with heavy shedding before access to an outdoor run, but applied the most incomplete cleaning and disinfection practices (further discussed below). Other exceptions were flocks D1 and E, where the peak of shedding occurred later. In farm E, a doxycycline-based treatment had been administered in the birds' drinking water due to severe dyspnea at 4 weeks without any chlamydia being detected in bird samples collected before this age. This antibiotic is active against chlamydiae, and this probably delayed the bacterial replication and the shedding once the birds were exposed to chlamydiae. Concerning flock D1, it is noteworthy that, in contrast to all other flocks, including flock D2, *C. psittaci* was not detected in any environmental sample collected outdoors (Table 1). The different environmental exposure of flocks D1 and D2, since they were on separate outside fields, could explain their different shedding patterns (middle and late). In any case, variables, i.e., the prevalence and level of *C. psittaci* shedding, analyzed and evaluated for all breeding spaces, showed significant differences between indoors and outdoors ($P = 0.018$ for the prevalence and $P < 0.001$ for the Cq values) (see Fig. S6A and B in the supplemental material). Specifically, significant differences were found between indoors, enclosures, and outdoor expansion areas concerning the level of *C. psittaci* shedding ($P < 0.001$) with the higher levels (lower Cq values) corresponding to enclosures (see Fig. S6C in the supplemental material). Moreover, a significant effect of the "intervention" factor was also found on the prevalence ($P = 0.008$) and level ($P = 0.001$) of *C. psittaci* shedding (see Fig. S7 in the supplemental material). It is probable that some interventions may induce more stress for birds and lead to heavier shedding, but this cannot explain all the differences in the prevalence or the excretion level in birds and other factors, such as the "outdoor" factor, that seem to critically impact shedding (Table 1). As has been previously reported, the presence of coinfections could exacerbate chlamydial shedding (27–30). Unlike the cases described in these latter studies, it is interesting that the herpesvirus infection that emerged in flock A2 (resulting in premature slaughtering) did not increase the level of *C. psittaci* shedding from ducks, which therefore had the same shedding pattern as those of flock A1.

Vertical transmission of *C. psittaci* was already reported in chickens and turkeys (9, 31, 32). In our study, only five samples from dead embryos (unhatched eggs) were found positive, whereas all cloacal swabs ($n = 105$) obtained from 1-day-old ducklings at the hatchery were negative for chlamydiae. Moreover, only a few (5 of 105; Table 1) cloacal swabs recovered at introduction and at the nail-trimming stages were positive, suggesting a limited role of both vertical and horizontal (possibly by inhalation) transmission pathways between duck flocks. Taking into account all the above-mentioned findings and keeping in mind that chlamydiae are able to persist within the gastrointestinal tract in a commensal relationship (26), environmental contamination and transmission seemed to constitute the most probable main pathway in duck flocks. In this study, environmental samples such as soil and water obtained from different places frequented by the birds during the first four breeding stages were mostly positively correlated with the occurrence and prevalence of *C. psittaci* shedders at the respective stages. The strong association between positive soil samples and high shedding level, as well as the perfect relationship shown between the chlamydial load in soil samples and the loads in dusts and water samples, indicate that

the contaminated soil may be the most significant source of transmission, even after the shedder birds have been removed from the breeding facilities. Clearly, we can assume that infected birds, possibly infected ducklings from heavily shedding laying flocks (18), introduce chlamydiae into a farm, contaminating its environment. In the hypothesis where chlamydiae are able to survive long enough in the farm environment, uninfected flocks arriving at the same places (indoors and especially outdoors) could then become infected.

In our survey, none of the *C. psittaci*-infected ducks presented symptoms. The absence of clinical signs coupled with the existence of various *C. psittaci* shedding patterns in birds could make the exposure to *C. psittaci* for workers unpredictable, increasing the risk since ducks are frequently handled during the breeding process. Therefore, in order to assess the exposure risks and identify the sources of contamination, it was interesting to analyze environmental samples from flocks at each occasion requiring workers to handle the birds. Among other sources, air samples and dusters from these specific stages were analyzed, since zoonotic transfer mostly occurs through inhalation of contaminated aerosols or contaminated dust particles created from avian excretion (33). Air samples were positive in three flocks (A1, A2, and C) harboring early and heavy shedders. Sampling was carried out during the primary vaccination conducted in closed buildings. Consequently, *C. psittaci* exposure via aerosols for workers at these farms is real, and the wearing of personal protective equipment appears to be essential. The exposure seems to be higher in breeding farms than at hatcheries and slaughterhouses, since no positive air samples were found at the latter. However, human cases have already been reported in duck hatcheries and slaughterhouses (34, 35). In our study, only a few birds were positive with a low level of shedding at the slaughterhouse, which concurs with findings obtained in this same slaughterhouse in 2013 (36). Confirmed or regularly suspected cases of psittacosis among workers in this slaughterhouse could be explained by the occurrence of heavily shedding ducks not detected in these two independent surveys, even if two duck flocks highly positive for *Chlamydiaceae* but not for *C. psittaci* were identified in a previous study (36), or by the fact that exposure to a small number of chlamydiae is enough for active infection in workers. Regarding the hatchery, the differences could possibly be explained by the different prevalences of vertical contamination from parental flocks. Meanwhile, contaminated dust is known to play an important role in worker exposure. A lot of dust is raised during several activities (handling birds during vaccinations, bird transfers, etc.) which could be a source of aerial contamination. In our study, dusters detected positive in the flocks with the heavy (A1, A2, and C) and also the moderate (B and D2) shedders (Table 1) were carrying a chlamydial load strongly associated with the loads detected in avian and soil samples. It is worth mentioning that, in a retrospective investigation conducted on a duck farm, 6 months after the clinical onset in birds and in a duck farmer who presented with a particularly severe pneumonia due to *C. psittaci*, dust was found to be the only positive among other environmental and avian samples (15).

Since chlamydiae are obligate intracellular bacteria, they could either survive in the cellular structures in which they have been excreted (8) or with the assistance of a host, for example, amoebae. It has indeed been observed that some *Chlamydia* species are able to survive and even multiply in free-living amoebae (37–39). It is

thus possible that *C. psittaci* could also survive in this host. Environmental samples taken for this study (water and soil samples; Table 1) were also tested for the presence of amoebae, and higher prevalence rates were found for *Amoebozoan* than for *Vahlkampfiidae*. However, the link between chlamydial contamination and the presence of amoebae was less evident, obviously owing to the ubiquitous nature of the amoebae. Further *in vitro* studies on chlamydial survival in the presence of amoebae could validate or refute the hypothesis concerning the role of amoebae as reservoirs for *C. psittaci* in the environment. Furthermore, it has also been suggested that naturally occurring bacteriophage infection may be yet another persistence induction mechanism (20). In this context, chlamydial infection might be kept at a very low level for prolonged periods (e.g., in the gut) and could be triggered once the phage population was greatly reduced and after the immune response in the local site has abated. Such a scenario would be consistent with long-suspected latent or inapparent *in vivo* chlamydial infections (40). In our study, the *C. psittaci* bacteriophage Chp1 was identified in all flocks, mostly in the joint presence of chlamydia. Interestingly, the higher levels of *C. psittaci* shedding occurred at the peak of prevalence of bacteriophage shedders, implying that Chp1 infection may be a nonnegligible factor in *C. psittaci* biology and pathogenesis in ducks. However, the phage was not detected in duck *C. psittaci* strain suspensions available in our laboratory (data not shown), in line with previous observations under which the presence of phage may go undetected in *in vitro* cultures for long periods of time (41). Chp1 was also detected in 82% of DNA taken from dusters, 29% of DNA from air, 7% from water and 34% from soil recovered from farm environments (Table 1). Chp1 infection, although often “cryptic,” is probably an integral part of duck chlamydiosis in some countries, e.g., the United Kingdom (42). Remarkably, infection with *C. psittaci* bacteriophage Chp1 was reported for the first time in 1982 in the context of a severe outbreak of human psittacosis at a duck-processing plant in East Anglia (United Kingdom), with the Chp1 being suspected of amplifying the virulence of *C. psittaci* strains involved (43). The high prevalence of this bacteriophage in the mule duck breeding process could thus generate a greater risk of human contamination.

Intraflock contamination could occur at any time, thus explaining the different shedding patterns observed. This probably depends, in addition to the birds’ immune status, partly on antimicrobials periodically administered, as seems to have happened at farm E, where late shedding occurred after a doxycycline-based treatment, but mainly on the cleaning and disinfection procedures implemented. The survey conducted at these farms regarding the management practices routinely applied showed that farms that apply the most incomplete cleaning and disinfection protocols were usually those with the heavy shedders, such as farms A and C. Interestingly, whereas the use of alkaline detergent and lime for cleaning could affect environmental contamination, the application of disinfectant containing quaternary ammonium and glutaraldehyde seems to be the main practice that could reduce the prevalence of *C. psittaci* in ducks. These findings were expected, since chlamydiae, although remaining infectious in organic material for many months, seem to be susceptible to disinfectants (8). However, it would have been interesting to further examine environmental samples recovered from farm facilities after the removal of birds and before the arrival of new flocks in order to evaluate the efficiency of different disinfection protocols. Finally,

regarding worker activities, the place (open air versus closed building) and the duration of operations seem to be potential risk factors. The need to handle birds in closed buildings and the risk associated with this practice should dictate the obligatory use of personal protective equipment (e.g., clothing that does not retain dust, gloves, and face shields). Besides, the knowledge of the risk arising from prolonged exposure emphasizes the need for modification and adaptation of such work protocols and the strict observance of good practices proposed (44). Future research should focus on these topics.

Conclusion. This study allowed a precise monitoring of mule duck flocks with a closeup on activities implying the interaction of humans with birds in order to assess the potential sources of worker exposure. It confirms the high prevalence of *C. psittaci* in mule duck flocks in France. The absence of clinical signs, along with the existence of various *C. psittaci* shedding patterns in ducks, together mean that exposure to *C. psittaci* for workers is unpredictable and yet considerable. Environmental contamination significantly correlated with shedding dynamics seems to be the most probable main pathway transmission. The high prevalence of Chp1 bacteriophage in mule ducks could be an important factor in *C. psittaci* persistence, thus creating a greater risk of human contamination. Cleaning and disinfection procedures could have an important impact on persistence and on environmental contamination. The obligatory use of personal protective equipment and the strict observance of good practices are essential to protect workers from exposure during the mule duck breeding process.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by AFSSET (Airclam-EST-11-110).

We thank the hatchery, the breeders, and the slaughterhouse that opened their doors to us and P. Fortomaris (Laboratory of Animal Husbandry, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece) for sharing views related to husbandry issues. We also thank John Kerr for help in editing the manuscript.

REFERENCES

- Andersen AA, Vanrompay D. 2000. Avian chlamydiosis. *Rev Sci Tech* 19:396–404.
- Kaleta EF, Taday EM. 2003. Avian host range of *Chlamydomphila* spp. based on isolation, antigen detection, and serology. *Avian Pathol* 32:435–461. <http://dx.doi.org/10.1080/03079450310001593613>.
- Sachse K, Laroucau K, Vortmore F, Magnino S, Felge J, Muller W, Kube S, Hotzel H, Schubert E, Slickers P, Ehrlich R. 2009. DNA microarray-based genotyping of *Chlamydomphila psittaci* strains from culture and clinical samples. *Vet Microbiol* 135:22–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.041>.
- Heddema ER, van Hannen EJ, Dutm B, Vandenbroucke-Grauls CM, Pannekoek Y. 2006. Genotyping of *Chlamydomphila psittaci* in human samples. *Emerg Infect Dis* 12:1989–1990. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1212.051633>.
- Vanrompay D, Harkinezhad T, van de Walle M, Beekman D, van Droogenbroeck C, Verminnen K, Leten R, Martel A, Cauwerts K. 2007. *Chlamydomphila psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerg Infect Dis* 13:1108–1110. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1307.070074>.
- Laroucau K, de Barbeyrac B, Vortmore F, Clerc M, Bertin C, Harkinezhad T, Verminnen K, Obentche F, Capek I, Bebear C, Durand B, Zanella G, Vanrompay D, Gartin-Bastuji B, Sachse K. 2009. Chlamydial infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France. *Vet Microbiol* 135:82–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.048>.
- Yin L, Kalmar ID, Lagae S, Vandendriessche S, Vanderhaeghen W, Butaye P, Cox E, Vanrompay D. 2013. Emerging *Chlamydomphila psittaci* infections in the chicken industry and pathology of *Chlamydomphila psittaci* genotype B and D strains in specific pathogen free chickens. *Vet Microbiol* 162:740–749. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.09.026>.
- Longbottom D, Coulter LJ. 2003. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J Comp Pathol* 128:217–244. <http://dx.doi.org/10.1053/jcpa.2002.0629>.
- Harkinezhad T, Geens T, Vanrompay D. 2009. *Chlamydomphila psittaci* infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. *Vet Microbiol* 135:68–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.046>.
- Lagae S, Kalmar I, Laroucau K, Vortmore F, Vanrompay D. 2014. Emerging *Chlamydomphila psittaci* infections in chickens and examination of transmission to humans. *J Med Microbiol* 63:399–407. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.064675-0>.
- Williams CJ, Stills M, Fearn V, Pezzoli L, Beasley G, Bracebridge S, Reacher M, Nafr P. 2013. Risk exposures for human ornithosis in a poultry processing plant modified by use of personal protective equipment: an analytical outbreak study. *Epidemiol Infect* 141:1965–1974. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268812002440>.
- Petrovay F, Balla E. 2008. Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydomphila psittaci*. *J Med Microbiol* 57:1296–1298. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.2008/001578-0>.
- Tiong A, Vu T, Counahan M, Leydon J, Tallis G, Lambert S. 2007. Multiple sites of exposure in an outbreak of ornithosis in workers at a poultry abattoir and farm. *Epidemiol Infect* 135:1184–1191.
- Gaede W, Reckling KF, Dresenkamp B, Kenkies S, Schubert E, Noack U, Irmischer HM, Ludwig C, Hotzel H, Sachse K. 2008. *Chlamydomphila psittaci* infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany. *Zoonoses Public Health* 55:184–188. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01108.x>.
- Carlier L, Kempf M, Aaziz R, Jollivet-Gougeon A, Laroucau K. 2014. A severe case of pneumopathy in a duck breeder due to *Chlamydomphila psittaci* diagnosed by 16S rDNA sequencing. *JMM Case Rep* <http://dx.doi.org/10.1099/jmmcr.0.001537>.
- EU. 2000. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents to work. Official Journal of the European Communities L262/21. EU-OSHA, Bilbao, Spain. <https://osha.europa.eu/en/legislation/directives/exposure-to-biological-agents/77>.
- ACDP. 2013. Approved list of biological agents of the Advisory Committee on Dangerous Pathogens. ACDP/HSE, London, United Kingdom. <http://www.hse.gov.uk/pubns/misc208.pdf>.
- Vortmore F, Thébault A, Poisson S, Cléva D, Robineau J, de Barbeyrac B, Durand B, Laroucau K. 2015. *Chlamydomphila psittaci* in ducks a hidden health risk for poultry workers. *Pathog Dis* 73:1–9. <http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftv007>.
- Amann R, Springer N, Schonhuber W, Ludwig W, Schmid EN, Muller KD, Michel R. 1997. Obligate intracellular bacterial parasites of *acanthamoebae* related to *Chlamydomphila* spp. *Appl Environ Microbiol* 63:115–121.
- Hogan RJ, Mathews SA, Mukhopadhyay S, Summersgill JT, Timms P. 2004. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun* 72:1843–1855. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.4.1843-1855.2004>.
- Van Droogenbroeck C, Van Risseghem M, Braeckman L, Vanrompay D. 2009. Evaluation of bioaerosol sampling techniques for the detection of *Chlamydomphila psittaci* in contaminated air. *Vet Microbiol* 135:31–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.042>.
- Ehrlich R, Slickers P, Goellner S, Hotzel H, Sachse K. 2006. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol Cell Probes* 20:60–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2005.09.003>.
- Menard A, Clerc M, Subtil A, Megraud F, Bebear C, de Barbeyrac B. 2006. Development of a real-time PCR for the detection of *Chlamydomphila psittaci*. *J Med Microbiol* 55:471–473. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46335-0>.
- Kaltenboeck B, Kousoulas KG, Storz J. 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.
- Le Calvez T, Trouillhe MC, Humeau P, Moletta-Denat M, Frere J, Hechard Y. 2012. Detection of free-living amoebae by using multiplex quantitative PCR. *Mol Cell Probes* 26:116–120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2012.03.003>.
- Rank RG, Yeruva L. 2014. Hidden in plain sight: chlamydial gastrointestinal infection and its relevance to persistence in human genital infection. *Infect Immun* 82:1362–1371. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01244-13>.
- Karpińska TA, Kozaczynski W, Niemczuk K, Jaski A, Kycko A, Retchert M. 2013. Mixed infection by fowlpox virus and *Chlamydomphila psittaci* in a commercial laying hen flock. *Acta Vet Hung* 16:1–10.

28. Van Loock M, Loots K, Van Heerden M, Vanrompay D, Goddeeris BM. 2006. Exacerbation of *Chlamydophila psittaci* pathogenicity in turkeys superinfected by *Escherichia coli*. *Vet Res* 37:745–755. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres/2006033>.
29. Van Loock M, Geens T, De Smit L, Nauwynck H, Van Empel P, Naylor C, Hafez HM, Goddeeris BM, Vanrompay D. 2005. Key role of *Chlamydophila psittaci* on Belgian turkey farms in association with other respiratory pathogens. *Vet Microbiol* 107:91–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.009>.
30. To KK, Tse H, Chan WM, Chot GK, Zhang AJ, Sridhar S, Wong SC, Chan JF, Chan AS, Woo PC, Lau SK, Lo JY, Chan KH, Cheng VC, Yuen KY. 2014. A novel psittacine adenovirus identified during an outbreak of avian chlamydiosis and human psittacosis: zoonosis associated with virus-bacterium coinfection in birds. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3318. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003318>.
31. Dickx V, Vanrompay D. 2011. Zoonotic transmission of *Chlamydia psittaci* in a chicken and turkey hatchery. *J Med Microbiol* 60:775–779. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.030528-0>.
32. Ahmed B, De Boeck C, Dumont A, Cox E, De Reu K, Vanrompay D. 2015. First experimental evidence for the transmission of *Chlamydia psittaci* in poultry through eggshell penetration. *Transbound Emerg Dis* <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12358>.
33. Beeckman DS, Vanrompay DC. 2009. Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect* 15:11–17. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02669.x>.
34. Abadia G, Capek I, André-Fontaine G, Laurens E. 2006. Etude de séroprévalence de la chlamydie aviaire chez certains professionnels avicoles en Bretagne et Pays de la Loire, 2001–2002. *BEH* 27–28:204–205.
35. Belchior E, Bradane G, Mercier A-F, Fortin N, Ollivier R, Hubert B. 2010. Investigations de cas humains de psittacose dans deux abattoirs de volailles, Pays de la Loire, Mars-Avril 2009. *Epidemiol Santé Anim* 57:5–11.
36. Hulin V, Oger S, Vorimore F, Aaziz R, de Barbeyrac B, Berruchon J, Sachse K, Laroucau K. 2015. Host preference and zoonotic potential of *Chlamydia psittaci* and *C. gallinacea* in poultry. *Pathog Dis* 73:1–11. <http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftv007>.
37. Essig A, Heinemann M, Simnacher U, Marre R. 1997. Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* 63:1396–1399.
38. Coulon C, Eterpi M, Greub G, Collignon A, McDonnell G, Thomas V. 2012. Amoebal host range, host-free survival, and disinfection susceptibility of environmental *Chlamydiae* as compared to *Chlamydia trachomatis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64:364–373. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00919.x>.
39. Witz M, Polkinghorne A, Dumrese C, Ziegler U, Greub G, Posptschl A, Vaughan L. 2008. Predator or prey? *Chlamydophila abortus* infections of a free-living amoeba, *Acanthamoeba castellanii* 9GU. *Microbes Infect* 10:591–597.
40. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. 1994. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 58:686–699.
41. Liu Z, Shou H-Z, Hsia R-C, Bavofil P. 2006. The Chlamydiaphages, p 79–101. In Bavofil PM, Wyrick PB (ed), *Obligate intracellular parasitism*. Horizon Bioscience, Oxford, United Kingdom.
42. Bacon EJ, Richmond SJ, Wood DJ, Stirling P, Bevan BJ, Chalmers WS. 1986. Serological detection of phage infection in *Chlamydia psittaci* recovered from ducks. *Vet Rec* 119:618–620.
43. Richmond SJ, Stirling P, Ashley CR. 1982. Virus infecting the reticulate bodies of an avian strain of *Chlamydia psittaci*. *FEMS Microbiol Lett* 14:31–36.
44. Deschuyffeleer TP, Tyberghien LF, Dickx VL, Geens T, Saelen JM, Vanrompay DC, Braeckman LA. 2012. Risk assessment and management of *Chlamydia psittaci* in poultry processing plants. *Ann Occup Hyg* 56:340–349. <http://dx.doi.org/10.1093/annhyg/mer102>.

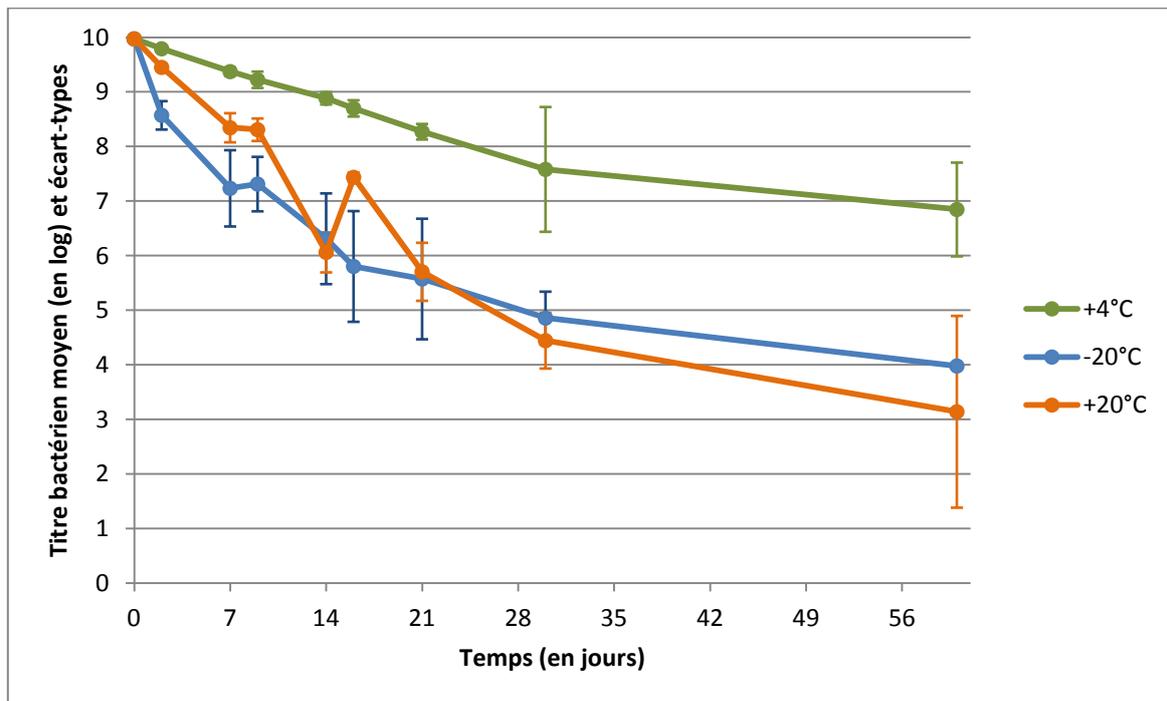


Figure 18 : Evolution du titre bactérien moyen des séries S1 à S5 de *C. psittaci* exprimé en \log_{10} avec les écart-types, en fonction du temps et de la température d'incubation.

2. Etude de la survie de *Chlamydia psittaci* par des modèles *in vitro*

2.1 Etude de la survie de *C. psittaci* souche 06-859 maintenue à différentes conditions de température

Plusieurs revues font état de la possibilité de la survie des CE de *C. psittaci* dans l'environnement, qui pourraient alors représenter une source de contamination notamment pour les animaux. Nous avons fait le choix de tester l'effet de la température sur la survie de *C. psittaci* en l'incubant à différentes conditions visant à mimer des conditions de températures auxquelles elles pouvaient être exposées sur les parcours d'élevage.

Une suspension de la souche 06-859 de *C. psittaci* a été diluée en PBS puis incubée à trois conditions de température : -20°C, +4°C et +20°C. Des prélèvements ont été effectués de J₀ à J₆₀ à raison de deux fois par semaine durant les deux premières semaines, puis une fois par semaine jusqu'à J₃₀ et ensuite à J₆₀. Les prélèvements ont été analysés par IFD afin de suivre l'évolution du titre bactérien. L'essai a été réalisé avec cinq répétitions.

Les résultats de l'étude sont présentés en **Figure 18**.

Après titrage par IFD à J₀, le titre de l'inoculum de *C. psittaci* 06-859 a été estimé à $9,4 \cdot 10^9$ IFU/mL.

La tendance observée est identique pour les trois températures testées avec une décroissance du titre bactérien au cours du temps. Cependant, cette perte d'infectivité est plus brutale pour les échantillons incubés à -20°C et +20°C, puisque le titre perd en moyenne 4 à 5 log en 21 jours, contre 2 log à +4°C, pour le même temps d'incubation. Pour les trois conditions de température testées, des corps infectieux étaient toujours détectés au bout de deux mois d'incubation. A J₆₀, le titre bactérien des échantillons placés à +4°C a diminué d'environ 3 log par rapport au titre initial (J₀), contre 6 log pour les échantillons incubés à -20°C et 7 log pour les échantillons placés à +20°C.

L'analyse statistique a permis de mettre en évidence une différence significative ($p < 0.0001$) entre les titres bactériens déterminés à +4°C et à -20°C, ainsi qu'entre les titres bactériens déterminés à +4°C et à +20°C ($p < 0.0001$). Comme attendu, la durée d'incubation a également un effet significatif sur le titre bactérien.

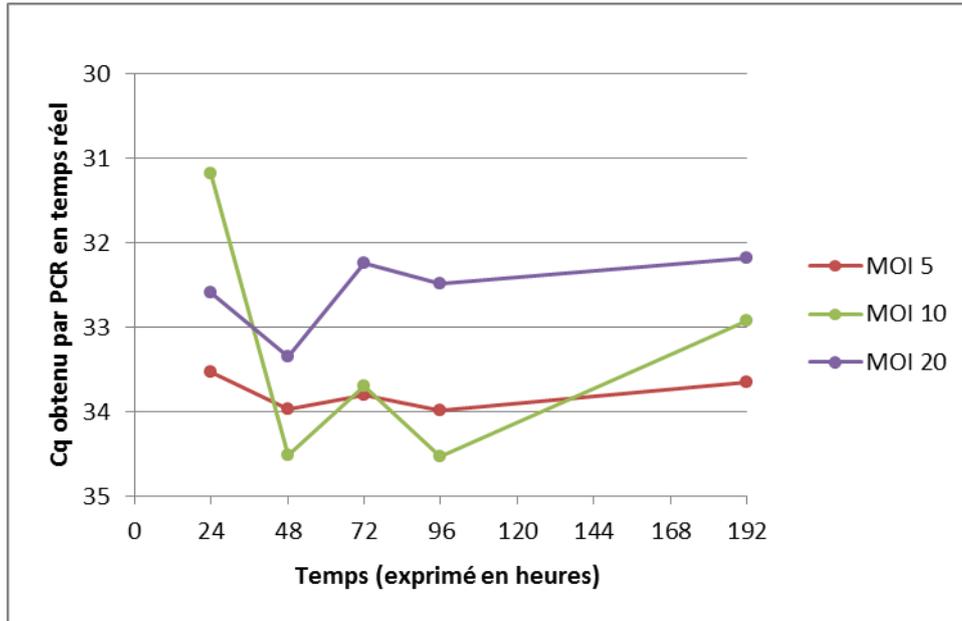


Figure 19 : Evolution de la valeur de Cq obtenue par PCR en temps réel ciblant le gène 23S rRNA en fonction du temps et de la MOI considérée.

2.2 Etude des interactions entre *C. psittaci* et *A. castellanii*

Les *Chlamydia* étant des bactéries parasites intracellulaires obligatoires, leur survie à plus ou moins long terme dans l'environnement semble être conditionnée par une interaction avec un hôte présent dans le sol. De nombreuses espèces de *Chlamydiales* sont capables de survivre, voire de croître, dans des amibes libres de l'environnement, en particulier *C. pneumoniae*, *C. abortus* et *C. trachomatis* [339, 340, 342]. En raison de la mise en évidence par PCR d'amibes dans des prélèvements environnementaux collectés en élevages de canards Mulard (voir 1.3.), les interactions possibles entre *C. psittaci* et une espèce d'amibe tellurique, *A. castellanii*, ont été investiguées.

A partir d'un tapis d'amibes inoculées avec une suspension de *C. psittaci*, trois essais indépendants ont été réalisés. Lors du premier (**Essai 1**), la présence de la bactérie a été recherchée par PCR à partir des tapis d'amibes obtenus par grattage.

Pour la seconde expérience (**Essai 2**), le surnageant de culture et le tapis d'amibes obtenu par grattage ont été remis en culture sur cellules afin de détecter et dénombrer les bactéries viables.

Enfin, lors du troisième essai (**Essai 3**), la présence de *C. psittaci* dans les amibes a été recherchée par microscopie électronique.

2.2.1. **Essai 1** - Infection de *A. castellanii* par *C. psittaci* et analyse par PCR

Le titre de l'inoculum lysé et utilisé pour infecter le tapis d'amibes a été estimé à $1,0 \cdot 10^9$ IFU/mL.

Les tapis d'*A. castellanii* ont été infectés par l'inoculum de *C. psittaci* avec différentes MOI : MOI 0.1, MOI 5, MOI 10 et MOI 20. La MOI 0.1 n'ayant donné que des résultats très faiblement positifs par PCR (données non présentées), cette condition a été écartée de l'analyse et seuls les résultats obtenus pour les MOI 5, MOI 10 et MOI 20 sont présentés en **Figure 19**.

De l'ADN de *Chlamydiaceae* a été détecté dans le tapis d'amibes par PCR en temps réel à chaque temps de prélèvement et pour chacune des trois MOI. L'évolution du Cq en fonction du temps d'incubation est relativement stable, toujours compris entre Cq 33 et 34 pour la MOI 5, entre Cq 31 et 35 pour la MOI 10 et entre Cq 32 et 34 pour la MOI 20.

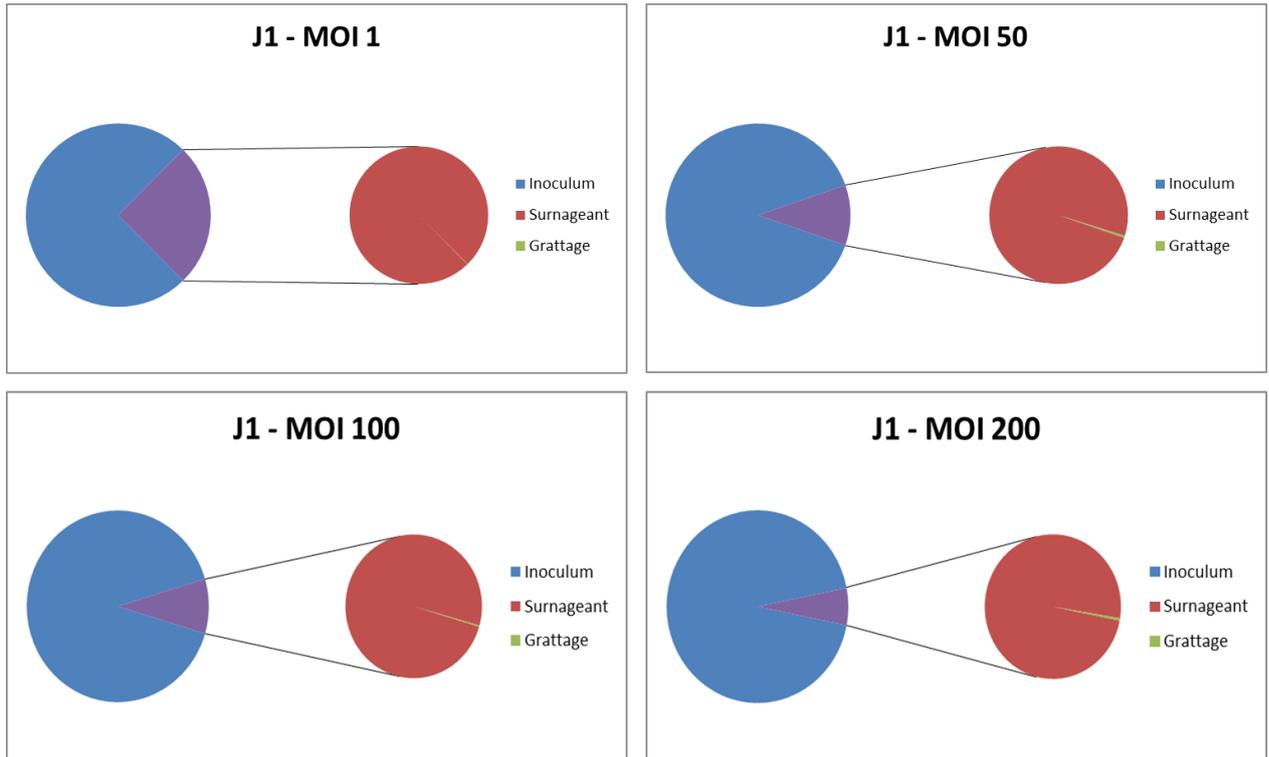


Figure 20 : Proportions de *C. psittaci* dans le surnageant (en rouge) et dans le grattage d'amibes (en vert) par rapport à l'inoculum de départ (en bleu) à J₁ pour les quatre MOI testées.

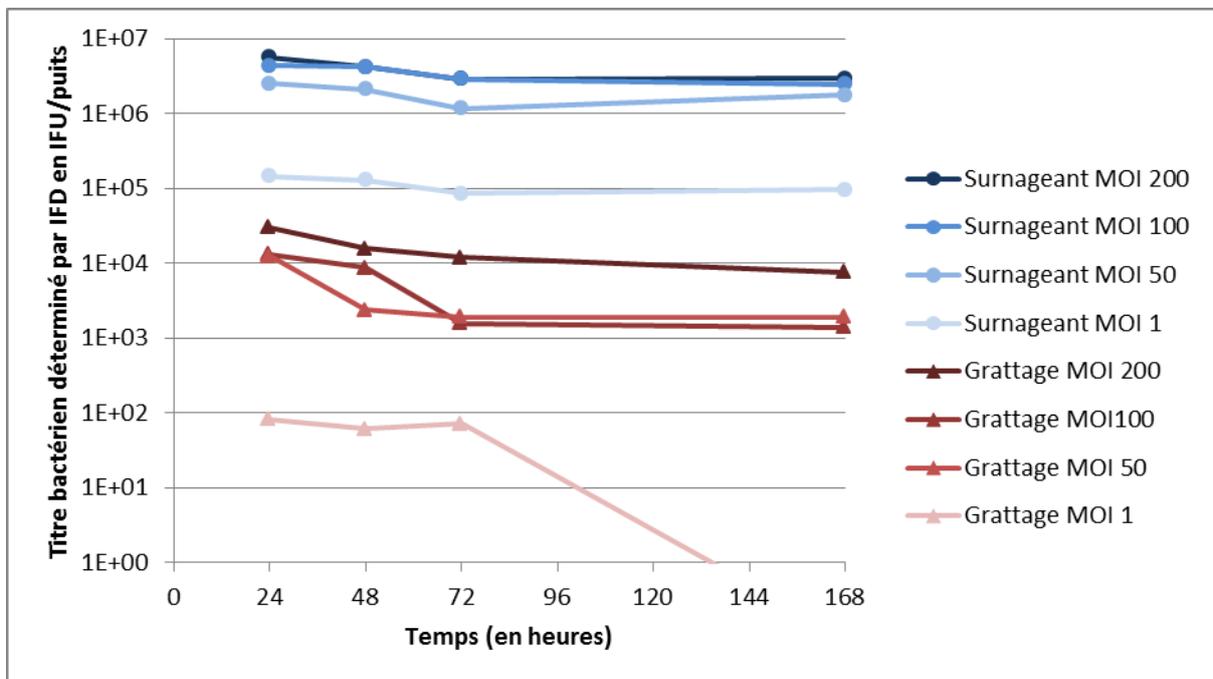


Figure 21 : Evolution du titre bactérien dans le surnageant et le grattage au cours du temps pour chaque MOI.

2.2.2. *Essai 2 - Infection de A. castellanii par C. psittaci et analyse par culture*

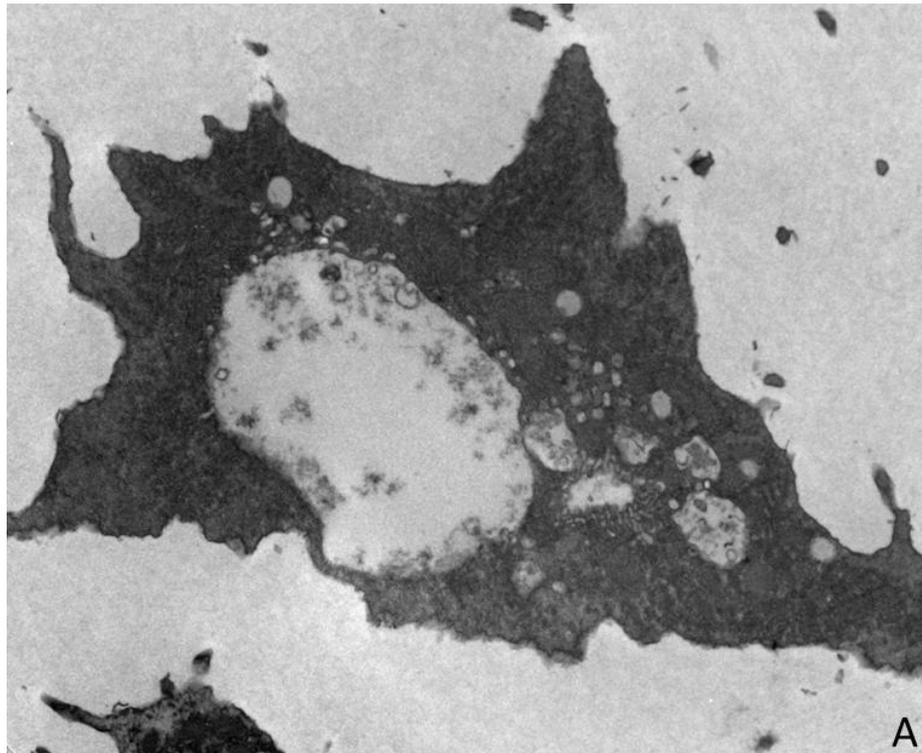
Les tapis d'*A. castellanii* ont été infectés par *C. psittaci* selon quatre MOI : MOI 1, MOI 50, MOI 100 et MOI 200. Des prélèvements ont été réalisés à J₁, J₂, J₃ et J₇ post-infection et le surnageant et les tapis d'amibes obtenus par grattages ont été remis en culture sur cellules et analysés par IFD.

Les résultats de titrage obtenus à J₁ post-inoculation des amibes sont présentés en **Figure 20**.

La proportion de *Chlamydia* n'ayant pas été éliminée lors du changement de milieu après la centrifugation d'inoculation, et donc détectée dans le surnageant ou dans le grattage du tapis d'amibes, est de plus en plus faible lorsque la MOI augmente. En effet, cette proportion s'élève à 34 % de l'inoculum de départ pour la MOI 1, et seulement à 7 % pour la MOI 200. La proportion de *C. psittaci* détectées dans le grattage d'amibes est toujours très faible, quelle que soit la MOI.

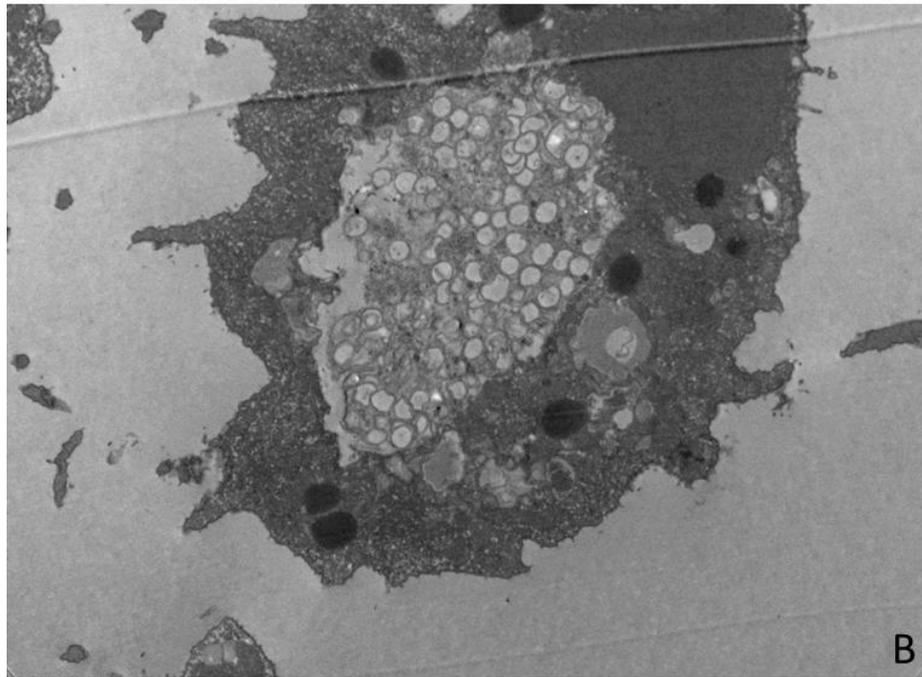
L'évolution au cours du temps des titres bactériens pour chaque MOI, déterminés par IFD (exprimés en IFU/puits de plaque de culture P6) dans le surnageant et le grattage du tapis d'amibes est présentée en **Figure 21**.

Les titres bactériens déterminés aussi bien dans le surnageant que dans le grattage sont relativement stables au cours du temps pour toutes les MOI, à l'exception du grattage de la MOI 1 dont le titre bactérien est devenu nul à J₇. Plus la MOI est importante, plus les titres bactériens calculés, aussi bien dans le grattage que dans le surnageant, sont élevés. Un écart important est observé entre les titres bactériens déterminés pour la MOI 1 et ceux calculés pour les trois autres MOI.



O-101F.008.tif
 O-101F
 24 hr Neg control
 Cal: 0.004 micron/pix
 13:55 01/05/16
 Microscopist: RH

500 nm
 HV=100.0kV
 Direct Mag: 2700x
 UMD Dental



O-101H.012.tif
 O-101H
 C. psittaci 24 hr pi
 Cal: 0.004 micron/pix
 11:34 12/21/15
 Microscopist: RH

500 nm
 HV=80.0kV
 Direct Mag: 2700x
 UMD Dental

Figure 22 : Clichés d'*A. castellanii* en microscopie électronique.
A) Cliché d'une *A. castellanii* non infectée (témoin négatif).
B) Cliché d'une *A. castellanii* infectée par *C. psittaci* à 24 h pi.

2.2.3. Essai 3 - Infection de *A. castellanii* par *C. psittaci* et analyse par MET

Des clichés de microscopie électronique ont été réalisés après fixation d'amibes infectées par *C. psittaci* (MOI 200), à 24 h pi.

Tandis que des vacuoles quasi vides sont observées pour les amibes non infectées (**Figure 22A**), les clichés de microscopie montrent des vacuoles remplies de corps sphériques pour les amibes infectées par *C. psittaci* (**Figure 22B**).

Ces corps sphériques sont peu denses aux électrons, certains semblant même « vides » (**Figure 22B**), et mesurent environ 0,3 µm de diamètre (**Figure 23**).



Figure 23 : Cliché de microscopie électronique des corps sphériques observés dans une vacuole d'*A. castellanii* infectée par *C. psittaci* à 24 h pi.

Discussion

La chlamydie aviaire, maladie provoquée par *C. psittaci*, est un facteur important de pertes économiques dans l'industrie avicole de certaines régions du monde, mais représente surtout un risque zoonotique pour les personnes exposées aux oiseaux. En effet, en France, les cas humains les plus sévères sont très fréquemment liés à une exposition à des volailles et tout particulièrement à des canards [376]. L'infection chez l'animal étant principalement asymptomatique, elle est souvent détectée suite au signalement de cas humains qui peuvent s'avérer dramatiques si le diagnostic et/ou le traitement ne sont pas mis en place rapidement.

Dans le cadre de cette thèse, des suivis ont été réalisés sur des volailles à différents stades de l'élevage (couvoir, pré-gavage et gavage pour la filière canard, et abattoirs impliqués dans l'abattage de différentes espèces aviaires) afin d'évaluer la prévalence des *Chlamydiaceae* chez ces oiseaux et de caractériser les souches circulantes. Des prélèvements d'air ainsi que des suivis sérologiques et biologiques du personnel volontaire ont été effectués en parallèle afin d'évaluer l'exposition des professionnels travaillant au contact de ces animaux. Des prélèvements environnementaux ainsi que des essais *in vitro* visant à étudier la survie de *C. psittaci* ont été réalisés afin de tenter de mieux caractériser les modes de contamination possibles des oiseaux, ce qui pourrait, à terme, permettre de maîtriser le risque de contamination par *C. psittaci* chez l'animal et donc de réduire l'exposition des professionnels.

1. *C. psittaci* chez les canards vs *C. gallinacea* chez d'autres espèces de volailles.

Les suivis effectués en **filière canards Mulard** ont confirmé une prévalence importante de *C. psittaci* chez cette espèce en France, comme cela avait déjà été évoqué lors de précédentes études [1, 2], avec cependant des niveaux d'excrétion variables chez les animaux en fonction des stades de productions et des élevages. Le typage des prélèvements positifs a uniquement mis à jour le génotype E/B, avec une prédominance du sous-génotype 06-859. Ce génotype circule dans les élevages de canards en France et a été associé à plusieurs reprises à des cas de contamination humaine [1, 161, 253]. Le séquençage du gène *ompA* utilisé comme méthode de génotypage dans le cadre de ces travaux semble adapté car, si la méthode de MLVA permet généralement de distinguer les génotypes, ce séquençage reste la méthode la plus discriminante pour les souches appartenant aux génotypes C et E/B, classiquement isolées chez les canards [377].

La problématique de la chlamydie chez le canard Mulard est principalement française et peut notamment s'expliquer par l'existence d'un cheptel important, puisque le canard représente plus de 92 % de la production mondiale du foie gras [378]. Aucun symptôme évocateur de chlamydie tel que classiquement décrit n'a été observé dans le cadre de ces suivis. Avant les années 90, des signes cliniques, tels que des tremblements, des conjonctivites, des décharges nasales purulentes ou encore de fortes mortalités, étaient

décrits dans les lots de canards infectés par *C. psittaci* [189]. Depuis, les infections sont principalement asymptomatiques et très souvent découvertes fortuitement en lien avec des cas humains ou dans le cadre d'études spécifiques. Cette différence ne peut être formellement expliquée à ce jour, mais il est possible que les *Chlamydia* impliquées dans les cas cliniques décrits dans le passé correspondaient à des souches plus virulentes (génotype A, par exemple) que celles circulant désormais dans les élevages (génotypes E/B et C). Le typage des souches n'était que rarement réalisé à l'époque, les anticorps monoclonaux nécessaires au sérotypage n'étant détenus que par un nombre très limité de laboratoires de recherche. Les symptômes observés pourraient aussi être imputés à la présence de co-infections qui seraient moins présentes de nos jours, en raison de leur disparition naturelle ou de par l'utilisation de vaccins, ou encore à la sélection génétique qui a pu avantager des animaux plus résistants.

En parallèle, des prélèvements ont été réalisés dans un second abattoir, abattant différentes espèces de **volailles** à l'exception du canard (Abattoir B). Hormis un unique lot de poulets, dans lequel *C. psittaci* a été détectée à l'occasion de prélèvements supplémentaires effectués en fin d'année lors de l'abattage de volailles festives, seule l'espèce ***C. gallinacea*** a été détectée chez les volailles analysées dans cet abattoir. Ces souches particulières avaient initialement été détectées en Allemagne dans le cadre d'investigations conduites sur des lots de volailles [246] et avaient ensuite été isolées par le laboratoire à partir de poulets suite au signalement de pneumonies atypiques recensées chez des personnes travaillant dans un abattoir en Charente [88]. Notre étude a été la première à souligner l'importance de *C. gallinacea* chez les poulets et les dindes. Depuis, une étude menée en Asie a également montré une forte prédominance de *C. gallinacea* chez les poulets [226]. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus dans deux abattoirs belges où, au contraire, l'espèce *C. psittaci* a été mise en évidence dans de nombreux lots de poulets et de dindes [186, 379]. La présence de *C. gallinacea* n'avait cependant pas été recherchée. Il semble qu'il y ait un effet géographique sur la distribution de *C. psittaci* en élevages avicoles, trouvant peut-être son origine dans les pratiques d'élevage ou la circulation de *Chlamydia* dans les lots de reproducteurs et dans l'environnement des élevages.

2. Une exposition des professionnels à *C. psittaci* réelle tout au long de la filière canards Mulard : à un niveau moindre en couvoir par rapport à l'abattoir et plus fréquente en élevages

Les suivis ponctuels et mensuels réalisés au **couvoir** n'ont révélé qu'une très faible présence de *C. psittaci* chez les animaux ou les œufs analysés, ainsi que dans les prélèvements d'air réalisés à différents postes de travail. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans une étude menée par l'ITAVI et l'ANSES de Ploufragan en 2013 (« PalmiCouv »), dans laquelle des prélèvements de poussières et des écouillons cloacaux effectués sur des canetons âgés d'un jour dans 13 couvoirs de canards se sont tous révélés négatifs vis-à-vis de *C. psittaci* par PCR (Données LNR non publiées). Pourtant, des cas de contamination humaine ont été rapportés en 2009 dans le couvoir suivi [1, 258]. La détection d'un prélèvement d'air et de quatre OBNE très faiblement positifs au couvoir laisse entrevoir la possibilité d'une exposition des professionnels, à bas niveau, sans qu'aucun cas suspect de psittacose n'ait été signalé durant la période de ce suivi, ni même depuis les derniers cas signalés en 2009. Pour expliquer les contaminations humaines signalées en couvoir, ou encore en amont chez les éleveurs de reproducteurs, la possibilité d'une sur-excrétion massive de *C. psittaci* chez des lots de reproducteurs qui contamineraient à leur tour leur descendance et exposeraient ainsi les employés a été évoquée [1]. Les causes de cette sur-excrétion chez l'animal sont encore inconnues, mais pourraient notamment être expliquées par la présence d'infections concomitantes. En effet, de nombreuses études ont évoqué le rôle des co-infections dans l'augmentation de la virulence de *C. psittaci* [142, 144-147, 237]. Ainsi, le personnel du couvoir pourrait se contaminer via la manipulation d'œufs issus de parentaux fortement excréteurs, lors de l'incubation de ces œufs ou bien lors de l'éclosion. Une étude belge a en effet montré que 29 % (7/24) des lots de coquilles d'œufs de poule prélevés en élevages étaient positifs vis-à-vis de *C. psittaci* par PCR [159]. De plus, l'incubation expérimentale, mimant les conditions d'incubation en couvoir, d'œufs dont les coquilles avaient été enduites avec une suspension de *C. psittaci* a montré la pénétration de la bactérie dans tous les œufs testés (15/15) [159]. Cependant, dans le couvoir suivi dans le cadre de cette thèse, les œufs sont décontaminés à leur arrivée puis incubés en atmosphère « propre ». De plus, la contamination *in ovo* entraîne le plus souvent la mort de l'embryon, les œufs embryonnés sont d'ailleurs classiquement utilisés pour isoler les souches de *Chlamydia*. Une contamination du personnel du couvoir par la manipulation des œufs semble peu probable du fait des procédures de désinfection en place, mais possible lors de l'éclosion de lots qui auraient été contaminés *in ovo* et auraient survécus. Un tel épisode de contamination a été rapporté dans ce couvoir en 2009, avec la mise en évidence d'OBNE fortement contaminés par *C. psittaci* [1].

En **élevages**, l'ensemble des sept lots de canards Mulard suivis se sont révélés positifs vis-à-vis de *C. psittaci* et différents schémas d'excrétion ont été mis en évidence. Les prélèvements d'air réalisés en élevages étaient positifs en corrélation avec le niveau

d'excrétion des animaux. L'exposition des professionnels à ce niveau de la filière est donc réelle, mais invisible car aucun animal n'a présenté de symptômes, et imprévisible du fait des différents schémas d'excrétion.

En **abattoir (A)**, la présence de *Chlamydia* a été mise en évidence dans 48% (48/100) de l'ensemble des lots analysés lors des différentes études. Mais le plus souvent, le nombre d'animaux positifs ainsi que la charge bactérienne détectée étaient très faibles. Le même constat a été fait dans un autre abattoir également spécialisé dans l'abattage de canards, avec 33 % (13/39) de lots faiblement positifs prélevés sur une période de deux mois et demi (Données LNR non publiées). Cependant, en plus des deux lots exceptionnels détectés fortement positifs sur la chaîne d'abattage, le suivi mené en élevages a montré qu'un lot de canards traité avec des antibiotiques comportait un nombre non négligeable d'animaux toujours excréteurs au moment du gavage et à son arrivée à l'abattoir (voir 4.). Différents facteurs, tels qu'une contamination tardive (via l'environnement, la faune sauvage...) [1] ou encore un traitement antibiotique [220], peuvent agir sur l'excrétion des animaux et conduire à l'arrivée sur la chaîne d'abattage de lots représentant un risque plus important pour le personnel exposé.

La présence de *Chlamydia* n'a pu être mise en évidence que dans cinq prélèvements d'air réalisés dans l'abattoir A. Néanmoins, une limite du suivi de la contamination aérienne réside dans les séquences d'analyse réalisées. En effet, seuls deux prélèvements de 10 min ont été faits par poste de travail en utilisant un appareil et un milieu d'impaction validés pour la détection des *Chlamydia* [261]. Cette analyse menée seulement sur une courte période sur une journée de travail reflète uniquement la contamination aérienne au contact du lot traité au moment du prélèvement. Des capteurs individuels et portatifs existent et permettraient d'évaluer en continu l'exposition de chaque travailleur. Les prélèvements d'air positifs à l'abattoir provenaient du quai de déchargement et dans la zone d'accrochage des volailles. A ces deux postes de travail, les animaux sont vivants et parfois très agités. Le déchargement des caisses contenant les canards se fait, dans cette entreprise, dans un couloir permettant aux camions de circuler. Cet accès forme un couloir d'air dans lequel le vent s'engouffre et peut entraîner une aérosolisation des bactéries excrétées. Les animaux sont en général placés par trois ou quatre par caisse, et ces caisses sont déchargées et entassées les unes sur les autres sur le quai. Les canards, le plus souvent stressés, fientent énormément, souillant à la fois leurs congénères situés dans les cages inférieures ainsi que le quai de déchargement. Les fientes présentes au sol peuvent ensuite être transportées dans le reste de l'abattoir, via les bottes par exemple, et les oiseaux manipulés par le personnel affecté à l'accrochage ont le plus souvent leur plumage souillé. Ces postes de travail sont donc particulièrement à risque pour les travailleurs [380].

3. Des réponses sérologiques vis-à-vis de *C. psittaci* chez les professionnels en abattoir, particulièrement chez ceux travaillant au contact de canards

Les résultats de l'analyse de lots de volailles ont montré que l'exposition directe des professionnels à *C. psittaci* est réelle tout au long de la filière canards Mulard, mais très faible en couvoir, alors qu'elle semble plus fréquente en abattoir.

Dans l'**abattoir A**, parmi les personnes volontaires pour un suivi biologique et sérologique, l'une d'entre elle présentait un syndrome grippal lors de la mise en place de l'étude et a dû être hospitalisée. Cet homme de 34 ans travaillait dans l'abattoir depuis moins d'un mois. L'écouvillon pharyngé collecté à J₀ s'est révélé positif vis-à-vis de *C. psittaci* par PCR, alors qu'aucune trace d'anticorps n'a été détectée à partir du prélèvement sanguin collecté au même moment, prélèvement qui n'a malheureusement pas été renouvelé au bout de 30 jours. Des réponses sérologiques vis-à-vis de *C. psittaci* ont été détectées chez dix autres membres du personnel et d'autres cas suspects, non intégrés dans le suivi mis en place, ont été signalés par l'infirmière de cet abattoir sur cette même période, suggérant une exposition récente du personnel à *C. psittaci*.

D'une manière générale, il s'avère que les cas les plus sévères de psittacose concernent le plus souvent les nouveaux travailleurs, personnes naïves vis-à-vis de l'agent pathogène tel que l'intérimaire hospitalisé, ainsi que les personnes immunodéprimées. Une étude sérologique menée dans le Sud-Ouest et l'Ouest de la France en 2008-2009 avait ainsi montré que le nombre de personnes séropositives était plus important en novembre et décembre, période correspondant aux pics d'activités dans la filière avicole et nécessitant le recrutement de personnels temporaires [381]. Il semblerait qu'une immunité se mette en place chez les personnes en contact régulier avec les oiseaux, les tests sérologiques effectués sur ces personnes mettant en évidence la présence d'anticorps, sans toutefois que des signes cliniques ne soient associés [220, 235, 241, 242, 380]. Dans le cadre de notre étude, les prélèvements sérologiques effectués dans cet abattoir sur une personne ayant contracté une psittacose grave en 2011 étaient négatifs, et parmi les personnes présentant des réponses sérologiques vis-à-vis de *C. psittaci*, certaines travaillaient dans l'entreprise depuis plusieurs années voire plusieurs dizaines d'années. Des réinfections sont possibles, comme déjà évoqué dans le cas d'un vétérinaire qui a contracté une infection à *C. psittaci* par deux fois en l'espace de deux ans [382]. Ces résultats suggèrent que, s'il existe une immunité acquise chez l'Homme suite à une infection par *C. psittaci*, celle-ci est probablement de durée limitée et pourrait être spécifique d'un génotype donné [220].

Dans cet abattoir, huit des dix personnes présentant un résultat positif par PCR ou par sérologie travaillaient au poste d'éviscération. Ce poste avait déjà été identifié comme un poste à haut risque de par l'exposition du personnel à l'appareil digestif des oiseaux, dans

lequel la concentration de *C. psittaci* peut être importante [220, 227, 235, 241, 380, 383]. Cependant, en raison de la nécessité de polyvalence du personnel au sein des abattoirs, un employé peut être amené à occuper différents postes au cours d'une journée de travail. Parmi les personnes volontaires suivies et occupant des postes de découpe et de conditionnement, aucune n'a été diagnostiquée positive par sérologie ou par PCR. Cependant il ressort que quelques personnes ne travaillant pas au contact direct des animaux, comme le personnel de maintenance, présentaient des réponses sérologiques à un niveau parfois équivalent à celui de personnes travaillant au contact des canards. Cela témoigne d'une exposition du personnel à la bactérie dans les zones communes de l'établissement, possiblement par les flux d'air, ou encore par le biais de travaux de maintenance conduits sur les chaînes d'abattages.

Dans l'**abattoir B**, des réponses sérologiques faibles vis-à-vis de *C. psittaci* ont été détectées chez cinq membres du personnel, tous en contact avec des volailles vivantes. Mais les investigations conduites dans cet abattoir ont surtout montré la prédominance de l'espèce *C. gallinacea* dans les lots de volailles analysés, avec le passage régulier sur la chaîne d'abattage de lots fortement excréteurs (voir 2.). Les tests sérologiques utilisés dans le cadre de nos investigations sur le personnel volontaire (MIF, RecomLine) sont des tests commercialisés qui ciblent l'espèce *C. psittaci*. Le test RecomLine repose sur la détection d'une sélection d'antigènes recombinants de *Chlamydia*, alors que la MIF mesure la réponse vis-à-vis de l'ensemble des antigènes exposés à la surface de la bactérie [259]. Ces tests sont connus pour manquer de sensibilité et ces deux méthodes présentent le désavantage d'une lecture subjective (recherche de points de fluorescence ou de précipités, évaluation de l'intensité d'une bande). Des recouvrements avec les autres bactéries composant la famille des *Chlamydiaceae* sont parfois observés [259], et la forte prévalence de *C. pneumoniae* dans la population globale peut également masquer dans certains cas la réponse sérologique spécifique vis-à-vis de *C. psittaci*. Dans ce contexte, les réponses sérologiques mesurées chez le personnel de l'abattoir B peuvent être dues à un réel contact avec des souches de *C. psittaci*, mais également à des réactions croisées possibles avec *C. gallinacea* ou encore *C. pneumoniae*. D'une façon générale, des tests sérologiques plus sensibles et plus spécifiques sont nécessaires afin d'affiner les connaissances. Des travaux sont actuellement en cours pour identifier et caractériser des antigènes d'intérêt pour chacune des espèces de *Chlamydiaceae*, y compris les deux nouvelles espèces *C. avium* et *C. gallinacea* [196].

En comparaison avec les résultats sérologiques, le nombre d'écouvillons pharyngés positifs par PCR s'est révélé être très faible. En effet durant ce suivi, hormis l'intérimaire hospitalisé, seul un chauffeur, qui transportait des volailles vivantes depuis plus de 10 ans, avait un écouvillon pharyngé prélevé à J₀ très faiblement positif vis-à-vis des *Chlamydiaceae* (Cq de 39,4), sans que des anticorps n'aient été détectés à J₀ et J₃₀. Les tests sérologiques témoignent d'une exposition à la bactérie alors que la PCR met en évidence l'ADN. Pour les personnes dont les résultats sérologiques témoignent d'une infection en cours (présence d'IgM), un résultat négatif par PCR peut s'expliquer par le type de prélèvements et le

moment auquel il a été réalisé. Chez un patient, un signal positif par PCR peut être obtenu à partir d'un écouvillon pharyngé collecté dans les huit jours suivants le début des signes cliniques [384]. Des prélèvements plus invasifs tels que des lavages broncho-alvéolaires mènent le plus souvent à de meilleurs résultats. Dans le cadre de notre suivi, la majorité des personnes volontaires ne présentait aucun symptôme. Parmi les personnes présentant des anticorps vis-à-vis de *C. psittaci*, seules quelques-unes ont fait état de symptômes grippaux lors des entretiens. Les formes inapparentes ou peu expressives de la maladie ont dominé parmi le personnel.

Les abattoirs A et B ont eu à faire face à des cas de psittacose ces dernières années, dont deux cas fatals parmi les membres de leur personnel en 2008 et 2009 (Données non publiées et [255]). Pour ces deux cas, une souche de *C. psittaci* d'un génotype classiquement isolé chez le canard (génotype E/B) a été identifiée. Si l'origine de la contamination dans l'abattoir A est assez évidente de par la prévalence importante de la bactérie chez le canard, elle l'est beaucoup moins pour l'abattoir B. Deux hypothèses pouvant expliquer l'origine de la contamination de ce cas fatal survenu dans cet abattoir peuvent être émises. Tout d'abord, il est possible qu'un ou plusieurs lots de volailles hébergeant *C. psittaci* soient passés sur la chaîne d'abattage sur laquelle travaillait cette personne. Les résultats des investigations faites dans cet abattoir montrent cependant que la présence de *C. psittaci* dans les lots de volailles autres que le canard est anecdotique, cette espèce n'ayant été mise en évidence que dans un unique lot de poulets testé lors de l'abattage de volailles festives (voir 1.). Néanmoins, la présence d'une souche de *C. psittaci* présentant un génotype classiquement isolé chez le canard (génotype E/B) a récemment été mise en évidence chez des patientes, ainsi que dans le lot de poulets dont provenaient les volailles qu'elles avaient manipulées. Suite aux investigations menées autour de ce cas groupé de psittacose, il a été supposé que les poulets s'étaient probablement contaminés sur l'élevage via le parcours extérieur qui avait préalablement été occupé par un lot de canards [187]. Même si la rotation de lots appartenant à différentes espèces aviaires sur un même parcours n'est pas recommandée, il arrive que des éleveurs intercalent un lot de canards entre deux bandes d'autres espèces de volailles afin de compléter leurs revenus. Ces pratiques pourraient expliquer la présence occasionnelle de *C. psittaci* chez les volailles autres que le canard qui pourraient constituer une source potentielle de contamination pour les professionnels. Cependant, cela semble rare en France au regard de nos données qui montrent que *C. gallinacea* est l'espèce principalement détectée chez ces volailles, données récemment confirmées par une étude menée en Asie [226].

La seconde hypothèse qui pourrait expliquer la contamination du cas fatal survenu dans cet abattoir serait l'abattage pour test d'un lot unique d'une trentaine de canards, effectué un mois avant l'apparition des premiers signes cliniques chez le patient. Une brève exposition à *C. psittaci* peut être suffisante pour qu'une personne se contamine, d'autant plus si celle-ci est « naïve » vis-à-vis de la bactérie.

Un retard à la consultation, et donc à la mise sous traitement, associé à une éventuelle santé fragile peuvent expliquer les cas fatals, qui restent cependant rares sur notre territoire.

4. Caractérisation de l'excrétion de *C. psittaci* en élevages de canards Mulard : rôle de l'environnement, gestion des lots et des bâtiments/parcours, co-infections et utilisation des antibiotiques

Pour tous les élevages de canards Mulard sélectionnés lors de notre étude, la présence de *C. psittaci* avait été mise en évidence quelques mois avant le début du protocole lors de prélèvements effectués sur les lots alors en place dans ces élevages (données non présentées). Deux des **schémas d'excrétion** (nommés schémas « classique » et « tardif ») mis en évidence dans ce suivi avaient déjà été observés lors d'une précédente étude menée sur des lots de canards Mulard, provenant de la même région mais d'élevages différents [1].

Un troisième schéma d'excrétion dit « précoce » a été décrit pour la première fois dans le cadre de cette thèse. Ce schéma implique des animaux chez lesquels une excrétion massive est détectée dès l'âge de 3 à 4 semaines pour la quasi-totalité des animaux. Les résultats du questionnaire, soumis à l'ensemble des éleveurs et portant sur les pratiques d'élevage ainsi que sur les **procédures de nettoyage et de désinfection**, ont permis d'apprécier l'impact de certaines pratiques sur le niveau d'excrétion des animaux. Ainsi, les lots A1 et A2, présentant une excrétion précoce, avaient accès à un petit parcours adjacent au bâtiment de démarrage, qui n'était chaulé en partie qu'une fois par an et dont la surface n'était jamais grattée, à la différence des autres élevages qui effectuaient un chaulage après chacun des lots mis en place. Aussi, il s'est avéré, pour ces deux lots, que le sol du bâtiment de démarrage n'était pas non plus systématiquement chaulé. A noter qu'il arrive parfois que les animaux prêts à être transférés en atelier de gavage soient rassemblés la veille de leur transfert dans le bâtiment de démarrage (alors vide), ce bâtiment n'étant pas systématiquement nettoyé avant la mise en place du nouveau lot de canetons. Ces procédures de désinfection non systématiques et/ou non exhaustives pourraient expliquer la contamination détectée chez ces jeunes animaux. Cette dernière explication conviendrait également au troisième lot (lot C) qui présentait un schéma d'excrétion précoce, bien que ce lot n'ait alors pas accès à un parcours extérieur. Les pratiques de nettoyage appliquées dans cet élevage étaient moins complètes que dans les autres exploitations. De plus pour ce lot, 13 % (2/15) des écouvillons cloacaux étaient positifs lors de la mise en place (Cq moyen de 35). Alors que tous les écouvillons cloacaux étaient négatifs au moment de l'éclosion, deux tissus prélevés sur des OBNE provenant de ce lot se sont révélés faiblement positifs par PCR. Il est donc possible que la contamination mesurée dans ce lot à l'âge de 4 semaines résulte d'une contamination verticale comme évoqué lors d'une étude précédente [1]. Il est ensuite possible que ces animaux contribuent alors à la contamination de leur environnement (y compris de l'eau de boisson et de la nourriture) et indirectement à celle des autres animaux du lot.

En parallèle d'une infection entretenue par les lots de canards qui se succèdent dans les élevages, les parcours ouverts pourraient également être contaminés par la faune sauvage. Des *Chlamydia* atypiques ont été détectées chez des canards lors de notre suivi en

abattoirs (voir 1.), où deux lots provenant d'un même élevage étaient porteurs d'une *Chlamydia* similaire à celle détectée par le passé chez des oiseaux marins [32]. Les tentatives pour isoler cette souche ont été vaines, seule l'espèce *C. psittaci* a été mise en évidence dans les lots suivants (données non présentées). Ces résultats suggèrent le fait que la faune sauvage puisse interagir avec les oiseaux d'élevage et que des échanges de *Chlamydia* soient possibles, même si cette souche atypique ne semble pas s'être implantée dans l'élevage. Il n'est pas rare d'observer des oiseaux sauvages sur les parcours de canard Mulard, bien que des systèmes effaroucheurs soient régulièrement mis en place sur les élevages mais avec une efficacité assez faible. C'est d'ailleurs à la suite de l'observation d'ibis sacrés sur des parcours de canards qu'une étude avait été initiée, afin de voir si ces oiseaux sauvages hébergeaient des souches de *C. psittaci* et si leur présence pouvait expliquer les contaminations observées en élevages. Alors que la présence d'un génotype de *C. psittaci* classiquement isolé chez le canard avait pu être mise en évidence chez un spécimen (génotype C), cette étude avait surtout permis de mettre au jour une *Chlamydia* atypique très répandue chez ces ibis et avait abouti à la description d'une nouvelle espèce, *Candidatus C. ibidis* [55]. D'une façon générale, il semble que les souches aviaires de *Chlamydia* soient plus ou moins inféodées à une espèce aviaire donnée, même si cela n'est pas exclusif. La prévalence de *C. psittaci* en élevages de canards étant importante, on peut imaginer qu'une contamination d'oiseaux sauvages partageant les mêmes parcours que les volailles ou leur environnement soit aussi possible.

Une autre origine possible de contamination des volailles a été soulevée par Ling *et al.* en 2014 suite aux investigations menées sur des lots de vaccins vivants produits sur œufs et destinés à la filière avicole. En effet, la présence de *C. psittaci* a pu être mise en évidence dans 26,7 à 46,7 % des lots de vaccins testés, notamment produits pour lutter contre la maladie de Newcastle et la variole aviaire [164]. La transmission de la bactérie à des poulets par l'intermédiaire de vaccins contaminés a été évoquée. Cependant, dans le cadre de l'élevage du canard Mulard, la souche bactérienne (*pasteurella multocida*) intervenant dans la composition du vaccin contre la pasteurellose est cultivée sur gélose et ne présente donc pas de risque en ce qui concerne la chlamydiose aviaire, *C. psittaci* étant un agent pathogène intracellulaire obligatoire.

Il semble que plusieurs facteurs puissent interférer sur l'excrétion de la bactérie par les canards. Notamment, la présence de co-infections a souvent été évoquée comme un facteur pouvant accroître la virulence d'une infection à *C. psittaci*. Lors de notre suivi de lots de canards Mulard, un lot (lot A2) a dû être abattu prématurément avant le gavage en raison d'une suspicion d'herpès virose, suite à des signes cliniques compatibles (forte mortalité, diarrhée aqueuse profuse souvent verdâtre, animaux prostrés) et suite à la confirmation par PCR de la circulation de ce virus dans un élevage voisin. Lors du rappel de vaccination de ce lot, intervenu alors que les animaux étaient âgés de 8 semaines, la moitié des écouvillons cloacaux se sont révélés positifs vis-à-vis de *C. psittaci* (avec un Cq moyen = 33,8). Contrairement à nos attentes, la présence de ce virus ne semble pas avoir induit une

sur-excrétion de *C. psittaci*, puisque seuls 20 % des écouvillons étaient encore positifs lors de l'abattage des animaux alors âgés de 13 semaines (avec Cq moyen = 37,7).

Un second facteur qui pourrait agir sur l'excrétion de *C. psittaci* par les canards serait l'utilisation d'antibiotiques. Dans notre étude, le schéma dit « tardif » caractérisé par une excrétion massive en fin de processus d'élevage a été observé dans deux lots. Il est important de noter qu'un des lots concernés (lot E) avait fait l'objet d'un traitement à la doxycycline pendant six jours alors que les animaux étaient âgés de 4 semaines, en raison de dyspnées et de toux sans mortalité associée. La doxycycline, antibiotique de la famille des tétracyclines, est utilisée pour lutter contre de nombreuses infections bactériennes, y compris *C. psittaci*. Le traitement administré aux canards de ce lot a pu retarder l'excrétion de *C. psittaci* [220], notamment en induisant la formation de corps aberrants, c'est-à-dire de formes viables mais non infectieuses [102, 103]. Aucune excrétion de *C. psittaci* n'avait cependant été détectée dans ce lot à l'occasion des prélèvements effectués en amont du traitement (lors de la mise en place dans l'élevage et lors du dégriffage réalisé à l'âge de 9 jours). Dans le contexte de cet élevage, il est possible que le traitement **antibiotique** ait eu une action sur la circulation à bas bruit de *C. psittaci* (la présence de la bactérie avait été détectée à plusieurs reprises dans cet élevage lors de précédentes séries de prélèvements). Les animaux pourraient ainsi avoir été exposés aux *Chlamydia* plus tardivement et/ou à une charge bactérienne moindre. Il est assez difficile de supprimer complètement l'excrétion dans un lot, surtout en condition d'élevage en plein air. Un essai non publié avait été réalisé dans ce même élevage en 2008, au cours duquel 20 animaux marqués avaient été prélevés avant et après un traitement de 6 jours à la doxycycline, puis une semaine après la fin du traitement. L'analyse des écouvillons cloacaux avait montré une diminution de l'excrétion dans le lot, mais en fin de traitement près de la moitié des individus étaient toujours positifs. Ce nombre avait chuté à deux individus faiblement excréteurs une semaine après la fin du traitement. Ces animaux, même faiblement excréteurs, peuvent constituer un réservoir d'infection pour les autres individus.

D'une façon générale, au regard des résistances croissantes détectées chez les bactéries vis-à-vis de différentes classes d'antibiotiques, l'utilisation des antibiotiques doit être raisonnée, d'autant plus que des cas de résistance à la tétracycline ont d'ores et déjà été décrites chez des souches de *C. suis* [67-69].

Les **bactériophages** pourraient représenter un moyen de contrôle des infections à *Chlamydia* et leur utilisation présenterait une alternative à l'usage des antibiotiques. Le bactériophage Chp1, spécifique de *C. psittaci*, a été détecté pour la première fois en Angleterre en 1982 suite à une épidémie particulièrement virulente de psittacose en lien avec des canards [130]. Il avait alors été évoqué que ce bactériophage puisse jouer un rôle dans la virulence de *C. psittaci*, en tant qu'« amplificateur ». Depuis, les études menées sur d'autres phages de *Chlamydia* semblent plutôt montrer que le virus diminuerait la réponse inflammatoire chez l'animal [110, 132-134, 136]. Les différents phages de *Chlamydia* détectés à ce jour

présentent des structures et des propriétés similaires et le phage Chp1 pourrait de même agir comme un « régulateur » sur les souches de *C. psittaci*. Lors de nos suivis en élevages de canards, la présence du phage Chp1 a été détectée dans tous les types de prélèvements avec une prévalence importante, et principalement en association avec la présence de *C. psittaci*. Le rôle du bactériophage Chp1 reste à élucider.

5. Etude de la survie de *Chlamydia psittaci* dans l'environnement à l'aide de prélèvements et de modèles *in vitro*

La **survie** des *Chlamydia* dans l'environnement est très peu documentée dans la littérature et seules quelques revues font état de la possibilité pour les corps élémentaires (CE) de survivre notamment dans les fientes pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois [217]. Les prélèvements environnementaux effectués en élevages de canards Mulard ont permis de mettre en évidence des *Chlamydia* dans l'eau de boisson, dans les poussières et au niveau du sol, avec un sous-génotype identique à celui retrouvé chez les animaux, et en corrélation avec le niveau d'excrétion détecté chez les canards. De plus, les élevages sélectionnés pour ce suivi présentaient tous des antécédents de détection de *C. psittaci* chez les animaux, et le même sous-génotype avait d'ores et déjà été identifié lors de précédentes investigations conduites dans deux d'entre eux (D et E) (données non présentées), suggérant une persistance de la bactérie dans les exploitations. L'hypothèse d'une contamination des animaux via l'environnement pose la question de la survie des *Chlamydia*, celles-ci étant des bactéries parasites intracellulaires obligatoires.

Divers paramètres extérieurs peuvent impacter la survie de la bactérie dans l'environnement (hygrométrie et humidité du sol, température, nutriments disponibles...). Nous avons fait le choix de tester l'effet de la **température**, en incubant une suspension d'une souche de *C. psittaci* initialement isolée d'un canard à différentes conditions de température choisies pour mimer des conditions plus ou moins extrêmes auxquelles seraient exposées les *Chlamydia* sur un parcours (-20°C, +4°C et +20°C). Les résultats montrent que le titre bactérien chute au cours du temps, mais des bactéries viables et infectieuses étaient toujours détectées au bout de deux mois d'incubation, quelle que soit la condition de température testée. Dans le cadre d'une infection expérimentale menée sur des canetons Mulard, l'inoculation par voie orale de 10⁴ IFU/animal avait suffi à induire une excrétion cloacale massive de la bactérie chez la majorité des animaux de ce lot dix jours après l'infection, y compris pour les animaux non inoculés mis au contact [154]. L'infection se diffuse donc très vite au sein d'un lot et une dose réduite pourrait suffire à conduire au développement d'une infection parmi les animaux.

Les suspensions bactériennes testées ont été maintenues dans un milieu non nutritif (PBS), il est possible qu'une forme de persistance ait pu apparaître, comme cela a déjà été évoqué pour des *Chlamydia* privées de certains nutriments [103, 105, 106]. Celles-ci n'auraient alors pas été détectées dans notre étude car les CA constituent une forme viable mais non infectieuse et ne forment donc pas d'inclusions. Ainsi, si des CA se sont formés lors de notre étude, les titres bactériens auraient pu être sous-estimés. Il a été montré lors de plusieurs études *in vitro* que la formation de CA était réversible lorsque les conditions redevenaient favorables [101-103, 106, 385].

La survie de la bactérie était significativement meilleure à +4°C avec une perte de 3 log du titre bactérien en deux mois, contre 6 log à -20°C et 7 log à +20°C. Ces résultats semblent concorder avec l'observation selon laquelle les animaux sont plus excréteurs durant les saisons « froides » que les saisons « chaudes » ([34, 55, 183, 240, 386] et données non publiées), tendance également observée lors de nos suivis réalisés en abattoirs. De même, une étude menée en France en 2008-2009 et recensant les cas suspects de psittacose a mis en évidence un nombre plus élevé (multiplication par trois) de cas répertoriés d'octobre à décembre [381]. Une meilleure survie de la bactérie dans les conditions de température des saisons « froides » pourrait être à l'origine de cet « effet saison ».

Les **amibes** libres de l'environnement constituent également une piste intéressante pour la survie de *C. psittaci*, car les bactéries pourraient y trouver refuge en attendant d'être de nouveau ingérées par leurs prochains hôtes. Ces protozoaires sont particulièrement abondants dans les dix premiers centimètres du sol et sont d'autant plus nombreux que les sols sont humides et riches en matières organiques. Il a été montré que *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* et, dans une moindre mesure, *C. abortus* pouvaient survivre dans les amibes, à défaut de s'y multiplier [339, 340, 342]. Plusieurs espèces de *Chlamydiales* possèdent aussi un tropisme naturel pour les amibes.

Les investigations menées sur les prélèvements environnementaux réalisés dans le cadre du suivi des lots de canards Mulard (voir 4.) ont conduit à la détection par PCR d'amibes en co-présence de *C. psittaci*. Afin d'étudier les interactions entre *A. castellanii* et *C. psittaci*, des co-cultures ont été réalisées et la bactérie a pu être détectée par PCR dans les tapis d'amibes infectées, ainsi que par immunofluorescence suite à la remise en culture sur cellules des amibes infectées et préalablement lysées. Ces résultats témoignent seulement de la présence de la bactérie dans les prélèvements analysés, la bactérie pouvant être à l'intérieur des amibes ou à leur surface uniquement. Contrairement aux protocoles classiques mis en œuvre avec des bactéries plus « conventionnelles », un traitement antibiotique n'a pas été mis en place afin d'éliminer les bactéries non internalisées avant la collecte des prélèvements. Les antibiotiques actifs contre *C. psittaci* nécessitent un temps d'exposition minimum et/ou ciblent principalement les *Chlamydia* lorsqu'elles sont en phase de multiplication, donc intracellulaires. Les clichés de microscopie électronique réalisés à 24 h pi ont mis en évidence la présence de corps sphériques au sein de vacuoles d'amibes

infectées. Les caractéristiques de ces corps (densité aux électrons, taille) correspondent aux caractéristiques des CR, suggérant que les *Chlamydia* internalisées sous forme de CE aient pu se transformer, ou que l'amibe ait ingéré les *Chlamydia* sous cette forme puisque l'inoculum était composé à la fois de CE et de CR. Néanmoins, même si sur certains clichés la présence de *Chlamydia* « intactes » au sein des amibes est visible, la majorité des corps sphériques présents semblent « vides ». Ces observations pourraient résulter d'une perte de densité électronique ou s'expliquer par le fait que les *Chlamydia* sont dégradées par les amibes.

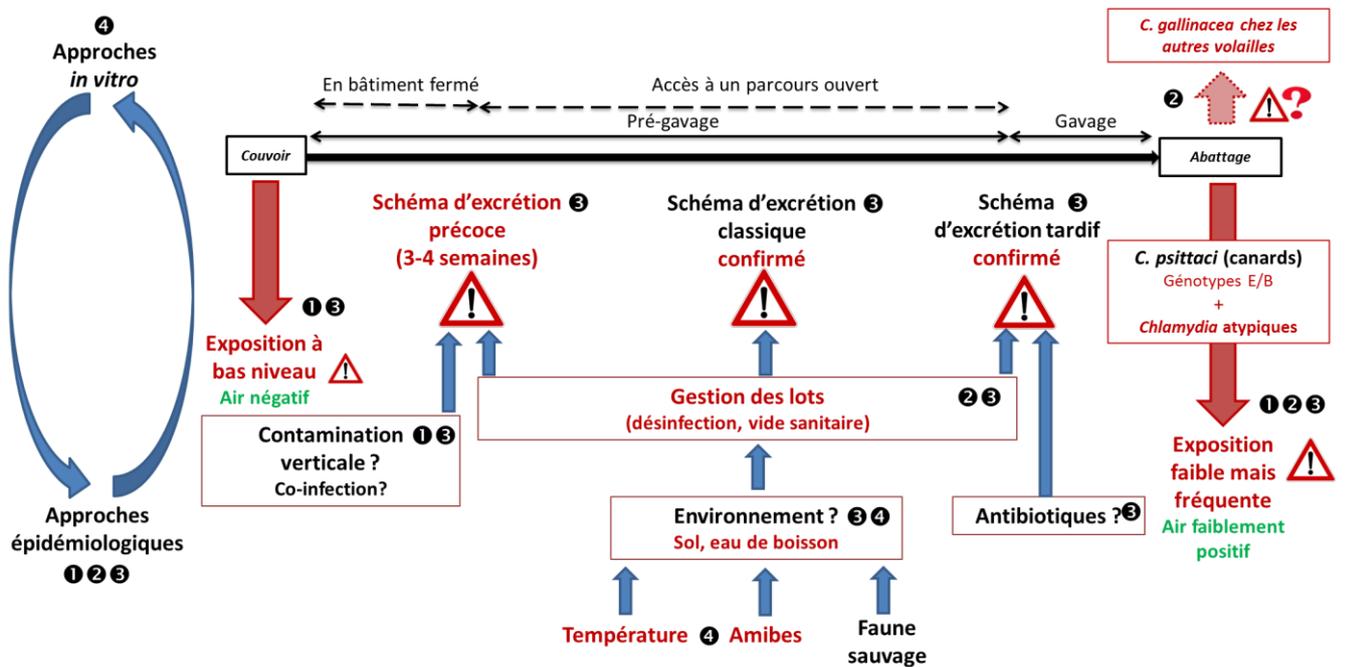


Figure 24 : Schématisation des résultats obtenus dans le cadre des différentes études. En rouge : Nouveaux résultats ; ① : Etude en couvoir et abattoir de canards ; ② : Etude dans deux abattoirs de volailles ; ③ : Suivi de lots de canards Mulard ; ④ : Modèles *in vitro*

Les résultats originaux obtenus tout au long de la filière avicole, grâce aux différentes études menées du couvoir à l'abattoir, sont synthétisés dans la **Figure 24**. Ces approches épidémiologiques ont été complétées par des études *in vitro* destinées à investiguer la survie de *C. psittaci*.

En conclusion, nos travaux ont apportés des informations originales relatives à l'exposition des professionnels impliqués dans l'ensemble de la filière avicole, conduisant à des recommandations pratiques pour :

- Limiter la contamination des lots au cours de la période d'élevage (désinfection systématiques des bâtiments et/ou des parcours entre les lots, vide sanitaire et utilisation raisonnée des antibiotiques). En cas de pratiques d'élevages à risques, des schémas d'excrétion précoce peuvent être observés chez les canards dès l'âge de 3 ou 4 semaines.
- Mieux contrôler l'exposition des éleveurs et des personnels travaillant sur la chaîne d'abattage (notamment ceux travaillant au déchargement et à l'accrochage des volailles, ainsi qu'à l'éviscération).
- Améliorer l'identification des *Chlamydia* circulant chez les volailles (nouvelles espèces de *Chlamydia*, caractérisation fine des souches de *C. psittaci* et *C. gallinacea*).
- Aborder la question de la survie de *C. psittaci* dans l'environnement à l'aide d'approches complémentaires *in vitro* (effet de la température, survie dans les amibes).

Conclusion et perspectives

Lors de ces travaux de thèse, nous avons confirmé la prévalence importante de *C. psittaci* dans la filière canards Mulard, avec la détection de la bactérie dans tous les lots suivis. Les profils d'excrétion mis en évidence auparavant ont de nouveau été observés, et un nouveau profil a été décrit pour trois des sept lots suivis. Toutefois, aucun animal n'a présenté de symptômes évocateurs de la maladie. *C. psittaci* ne semble pas être un problème majeur de santé animale en France. Néanmoins, nos résultats démontrent une réelle exposition des professionnels à la bactérie tout au long de la filière avicole, avec la détection de réponses sérologiques et/ou biologiques chez des membres du personnel à l'abattoir, ou encore la détection de *C. psittaci* dans des prélèvements d'air réalisés en élevages de canards. A l'abattoir, certains postes tels que l'éviscération, le déchargement et l'accrochage des volailles semblent les plus à risque de contamination. Les données de prévalence concernant la psittacose restent toutefois très incomplètes, notamment en raison du fait que la maladie n'est pas à déclaration obligatoire en France. Une étude menée à grande échelle sur le personnel de couvoirs, d'élevages, d'ateliers de gavages et d'abattoirs permettrait de disposer de données épidémiologiques et d'apprécier plus finement le taux d'exposition des professionnels à *C. psittaci*. Dans cet objectif, la collection de sérums issus d'adhérents volontaires à la MSA, prélevés en 2012-2013 et incluant des salariés et exploitants agricoles en activité et âgés de plus de 25 ans issus de différents secteurs d'activité (culture, élevage, travaux forestiers, paysagisme, artisanat, coopératives agricoles...), constitue un échantillonnage très intéressant qui mériterait d'être exploité afin d'affiner les données sur la psittacose, notamment.

La forte prévalence de *C. psittaci* en élevages de canards, associée à la mise en évidence d'une exposition réelle des professionnels, impliquent de trouver des solutions afin de réduire le risque de psittacose au sein de la filière avicole. Un des premiers axes à renforcer serait la **sensibilisation des personnels** aux risques encourus. L'information des personnes exposées est primordiale, car il est nécessaire d'identifier le risque pour le maîtriser. Les résultats obtenus lors d'études telles que celles menées dans le cadre de cette thèse doivent être communiqués aux professionnels de la filière, mais également aux professionnels de santé. Les personnes travaillant à proximité d'oiseaux doivent être encouragées à consulter un médecin dès l'apparition des premiers signes cliniques, afin d'éviter les cas graves de psittacose.

Une plaquette d'information a été réalisée dans ce sens par la MSA et l'INRS à destination des professionnels et détaille les risques encourus et les précautions nécessaires afin d'éviter au maximum l'exposition à *C. psittaci* dans le contexte professionnel.

L'aménagement des infrastructures pour permettre une bonne hygiène du personnel et limiter la dissémination de la bactérie dans les parties dites « propres » ou communes est important. Egalement, le respect de bonnes pratiques peut permettre de réduire l'exposition des professionnels, comme par exemple un nettoyage du matériel et des locaux en utilisant un détergent actif contre *C. psittaci*, l'application d'eau sur les sols pour éviter en partie la

formation d'aérosols ou encore l'élimination régulière, avec les précautions adéquates, des déchets biologiques (carcasses, fientes, litières...).

Suite aux deux décès survenus dans les abattoirs A et B, diverses mesures ont été prises dans ces entreprises afin de réduire l'exposition du personnel. En particulier, un système de ventilation a été installé dans l'abattoir A au niveau du poste d'accrochage et une infirmière a été engagée pour informer les nouveaux arrivants du risque infectieux inhérent à un travail à proximité de volailles. Les travailleurs sont aussi fortement invités, voire obligés pour les postes les plus exposés tels que le déchargement ou l'accrochage des volailles, à porter des équipements de protection individuelle. Cependant, le personnel rencontre parfois des difficultés à porter les masques de protection, évoquant une gêne inspiratoire, une transpiration excessive ou encore des difficultés de communication. Lorsque les masques sont portés, ils peuvent aussi l'être de manière incorrecte, en couvrant seulement la bouche par exemple. Ces mesures ne sont donc pas suffisantes et il est nécessaire d'envisager d'autres approches pour diminuer voire supprimer l'excrétion de *C. psittaci* par les canards afin de réduire au maximum l'exposition des professionnels.

Mieux comprendre les **voies de contamination** des animaux semble dès lors primordial afin d'agir sur la source de l'infection. Des corrélations ont pu être établies entre l'excrétion des canards et les procédures de nettoyage et désinfection en place dans les différents élevages. L'analyse de prélèvements environnementaux (poussières, eau et sol) a montré que *C. psittaci* était présente dans l'environnement, en lien avec le niveau d'excrétion détecté chez les canards. Ces travaux renforcent l'hypothèse de l'impact de l'environnement sur la présence de *C. psittaci* dans les lots de canards Mulard. Des prélèvements environnementaux réalisés dans les bâtiments et sur les parcours avant l'arrivée des animaux puis durant leur séjour auraient permis de statuer sur la contamination initiale de l'environnement et de suivre son évolution, en parallèle de l'excrétion détectée chez les canards. Des prélèvements auraient également pu être réalisés après l'application des procédures de nettoyage et de désinfection pour évaluer leur efficacité sur la présence de *C. psittaci*.

Peu de données sont actuellement disponibles quant à la **survie** de *C. psittaci* dans l'environnement. Comme attendu, la présence d'amibes a été mise en évidence dans la majorité des échantillons d'eau et de sol réalisés en élevages de canards. Les études *in vitro* conduites sur les interactions entre *C. psittaci* et *A. castellanii* semblent montrer que la bactérie pourrait pénétrer au sein de l'amibe. Toutefois, on ignore toujours si *C. psittaci* peut y survivre, ou si elle est simplement ingérée puis dégradée par l'amibe. Afin de mieux comprendre ces interactions, il conviendrait de réaliser de nouvelles co-cultures, avec l'observation quotidienne des tapis d'amibes et le marquage par immunofluorescence des *Chlamydia* qui permettrait notamment de suivre l'évolution de l'infection. La réalisation en parallèle de clichés de microscopie sur les tapis d'amibes préalablement fixés permettrait d'observer la structure fine des *Chlamydia*.

Néanmoins, nos travaux ont montré que *C. psittaci* pouvait survivre, en conditions expérimentales basiques (milieu non nutritif), pendant au moins deux mois, notamment lorsqu'elle était maintenue à basse température (+4°C). Il est donc possible aussi que la bactérie n'ait pas nécessairement besoin d'un hôte pour survivre dans l'environnement et que la rotation des lots de canards sur un même parcours suffise à entretenir l'infection et à maintenir la présence de *C. psittaci* dans l'environnement.

A ce titre, les mesures adoptées par l'arrêté du 15 janvier 2016, suite à la recrudescence de cas d'influenza aviaire en élevages de canards dans le Sud-Ouest de la France, pourraient constituer une belle opportunité pour étudier le rôle de l'environnement dans la présence de *C. psittaci* en élevages. En effet, le ministère de l'Agriculture a décidé d'imposer un vide sanitaire total et prolongé d'au moins deux mois dans 17 départements, interdisant l'implantation de nouveaux lots de canetons sur tous les élevages, ceci afin de pouvoir nettoyer et décontaminer progressivement l'ensemble des bâtiments et des parcours. On pourrait imaginer effectuer des prélèvements dans une sélection d'élevages concernés par ces mesures, dans le but de voir l'efficacité de ce vide sanitaire sur la présence de *C. psittaci* dans l'environnement, en parallèle de sa présence chez les nouveaux lots mis en place.

Les **moyens de lutte** reposent essentiellement sur des mesures d'hygiène ou sur l'usage d'antibiotiques, qui doivent être utilisés avec modération en raison du risque d'émergence de souches résistantes [387, 388]. Ces 20 dernières années, différents types de vaccins incluant des molécules d'ADN [149, 221] ou encore des protéines recombinantes [223] ont notamment été testés expérimentalement, mais aucun n'a abouti à ce jour à une commercialisation.

Des composés naturels ou chimiques comme alternatives aux antibiotiques font actuellement l'objet de travaux et pourraient constituer un moyen de lutte efficace contre les agents pathogènes d'une façon générale. Ces molécules pourraient être utilisées en tant que traitement, mais également en prophylaxie. L'huile essentielle d'origan testée *in vitro* puis *in vivo* en tant que complément alimentaire a permis d'inhiber avec succès le développement de bactéries intestinales pathogènes chez le poulet telles que *Salmonella* et *E. coli* [389, 390]. Egalement, une étude a montré qu'une préparation composée intégralement de molécules végétales, le Respitol-B, et particulièrement l'un de ses composants principaux le menthol, était efficace pour inhiber *in vitro* le développement de plusieurs bactéries, levures et champignons d'intérêt vétérinaire dans la filière volailles [391]. L'huile essentielle de menthe, des terpènes ou encore des flavonoïdes se sont révélés efficaces pour inhiber *in vitro* le développement de *C. trachomatis* et *C. pneumoniae* [392-394], et des composés chimiques dérivés du 3-isoxazolidone et portant divers agents chélateurs ont présenté *in vitro* un effet inhibiteur sur le développement de *C. trachomatis* [395]. Il serait maintenant intéressant de tester l'action de ces différents composés sur des *Chlamydia* d'intérêt vétérinaire, tels que *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. felis* et *C. psittaci*.

Les amibes pourraient aussi constituer une piste intéressante pour neutraliser une infection au sein d'un élevage. L'idée que certains de ces protozoaires puissent servir d'hôte protecteur providentiel pour *Chlamydia* a été évoquée, mais il pourrait tout autant être envisagé d'utiliser les amibes, connues pour se nourrir de bactéries, afin de « nettoyer » les élevages et faire baisser la pression infectieuse. A ce titre, il serait intéressant d'étudier les interactions entre *C. psittaci* et une amibe particulière, *Willaertia magna* souche C2c maky, notamment utilisée comme biocide biologique pour traiter des eaux contaminées par *Legionella* dont elle est capable d'inhiber le développement [396]. L'étude des interactions entre cette amibe et *C. psittaci* avait été envisagée dans le cadre de cette thèse, en collaboration avec un partenaire industriel, mais n'a malheureusement pu aboutir en raison de contraintes administratives.

Les bactériophages étaient auparavant largement utilisés à travers le monde pour traiter certaines maladies infectieuses d'origines bactériennes, mais furent partiellement voire complètement abandonnés au profit des antibiotiques. Cependant, face à l'émergence de souches résistantes, la phagothérapie redevient aujourd'hui au centre des préoccupations, notamment pour traiter certaines pathologies humaines. Son utilisation pour faire baisser la pression infectieuse de *C. psittaci* en élevages est une piste qu'il conviendrait d'investiguer. Lors de notre étude menée sur des lots de canards Mulard, le bactériophage Chp1 a été détecté dans la majorité des prélèvements effectués, particulièrement en co-présence de *C. psittaci*. Le rôle de ce bactériophage reste flou, son isolement et son maintien en culture permettraient d'étudier *in vitro* et *in vivo* son impact sur une infection à *C. psittaci*, comme cela a notamment été décrit pour le bactériophage ϕ CPG1, infectant *C. caviae* [110, 135].

L'efficacité de l'ensemble de ces candidats (composés chimiques, naturels, amibes, bactériophages) devra tout d'abord être démontrée *in vitro* sur *C. psittaci*. Ils pourront ensuite être testés *in vivo* en utilisant notamment le modèle expérimental développé sur des canetons Mulard par le laboratoire, qui vise à reproduire, via une inoculation par voie orale, un portage asymptomatique à l'image du constat établi sur le terrain.

C. psittaci n'est pas, cependant, la seule espèce de *Chlamydia* hébergée par les volailles. En effet, nos résultats mettent en évidence, pour la première fois, une prévalence de *C. gallinacea* très supérieure à celle de *C. psittaci* chez les volailles autres que le canard, notamment les poulets, les dindes et les pintades. Ces données mettent en avant cette nouvelle espèce dont il convient dorénavant de tenir compte, au niveau des élevages et de son éventuel impact sur la santé des professionnels. Il est à présent nécessaire de faire évoluer les outils de diagnostic en intégrant *C. gallinacea* dans la liste des pathogènes à rechercher, afin de déterminer son impact chez les personnes travaillant au contact des volailles.

Peu de données sont encore disponibles quant aux conséquences d'une infection et/ou d'un portage de *C. gallinacea* chez les animaux, aussi un modèle expérimental pourrait être développé avec des poulets EOPS afin d'étudier le déroulement de l'infection et les

éventuels signes cliniques qui peuvent en résulter, telle qu'une perte de poids déjà évoquée lors d'une précédente étude sur des volailles [226], ou encore des troubles de la reproduction, évoqués dans le cas d'un portage intestinal de *C. pecorum* chez des ruminants [85]. L'impact d'une co-infection *C. gallinacea* - *C. psittaci* serait également intéressante à investiguer, afin d'observer une éventuelle synergie entre ces deux espèces qui pourrait mener à une virulence exacerbée chez l'animal.

Une *Chlamydia* atypique a été détectée à l'abattoir chez deux lots de canards provenant d'un même élevage, et le séquençage du gène *ompA* a montré une forte homologie de séquence avec une *Chlamydia* initialement détectée chez un goéland. Il semble que de nombreuses *Chlamydia* non encore décrites circulent, particulièrement chez les oiseaux sauvages. La détection et la caractérisation de ces *Chlamydia* atypiques pourrait mener à la description de nouvelles familles et/ou espèces de *Chlamydiales*, comme cela a notamment été le cas récemment pour *C. avium* et *C. gallinacea*. Ces bactéries pourraient représenter un risque pour la santé vétérinaire mais aussi pour la santé publique. Afin de détecter ces *Chlamydia* atypiques, il est important de maintenir une approche de dépistage généraliste en utilisant des outils de détection à large spectre en première intention, pour ensuite identifier l'espèce avec des outils plus spécifiques.

En conclusion, ces travaux de thèse ont démontré une prévalence importante de *C. psittaci* chez le canard Mulard, au contraire des autres volailles qui hébergent très majoritairement *C. gallinacea*. L'exposition des professionnels aux *Chlamydia* est réelle, tout au long du processus d'élevage des volailles, mais plus particulièrement en élevages de canards Mulard et à l'abattoir, bien que des cas de psittacose soient parfois signalés dans les couvoirs. L'infection est principalement asymptomatique chez les volailles, et les lots de canards présentent des schémas d'excrétion variables, aussi il convient pour les professionnels de se protéger à chaque contact avec les animaux. La compréhension des voies de contamination des animaux semble primordiale afin de réduire la prévalence de *C. psittaci* en filière avicole et donc l'exposition des professionnels. L'hypothèse d'une contamination environnementale se fait de plus en plus claire, avec notamment la mise en évidence d'un lien existant entre les procédures de nettoyage et désinfection et l'excrétion des canards, la description de la survie de *C. psittaci* en dehors de tout hôte vivant, ou encore la mise en évidence d'une possible survie de *C. psittaci* au sein d'*A. castellanii*. Des outils permettant de détecter plus spécifiquement les réponses immunitaires induites par *C. gallinacea* doivent être développés afin d'étudier l'impact de cette espèce chez l'Homme. La mise au point de moyens de lutte efficaces permettant de réduire voire de supprimer l'excrétion chez les volailles est également nécessaire, dans le but de diminuer l'exposition des professionnels.

Références

- [1] Vorimore, F., Thébault, A., Poisson, S., Cléva, D., Robineau, J., de Barbeyrac, B., Durand, B., Laroucau, K., *Chlamydia psittaci* in ducks a hidden health risk for poultry workers, *Pathog Dis*, **73** (2015) 1-9.
- [2] Léon, O., Sraka, B., Ballot, A., Armand, C., Guérin, J.-L., Evaluation du portage de *Chlamydophila psittaci* au sein de la filière canards gras : implications pour la santé publique., 2004.
- [3] Pawlikowska-Warych, M., Deptula, W., Characteristics of *chlamydia*-like organisms pathogenic to fish, *J Appl Genet*, (2015).
- [4] Gupta, R.S., Naushad, S., Chokshi, C., Griffiths, E., Adeolu, M., A phylogenomic and molecular markers based analysis of the phylum *Chlamydiae*: proposal to divide the class *Chlamydiia* into two orders, *Chlamydiales* and *Parachlamydiales* ord. nov., and emended description of the class *Chlamydiia*, *Antonie van Leeuwenhoek*, **108** (2015) 765-81.
- [5] Everett, K.D., Bush, R.M., Andersen, A.A., 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** (1999) 415-40.
- [6] Wheelhouse, N., Longbottom, D., Endemic and emerging chlamydial infections of animals and their zoonotic implications, *Transbound Emerg Dis*, **59** (2012) 283-91.
- [7] Martel, A., Adriaensen, C., Bogaerts, S., Ducatelle, R., Favoreel, H., Cramer, S., Hyatt, A.D., Haesebrouck, F., Pasmans, F., Novel *Chlamydiaceae* disease in captive salamanders, *Emerg Infect Dis*, **18** (2012) 1020-2.
- [8] Martel, A., Adriaensen, C., Sharifian-Fard, M., Vandewoestyne, M., Deforce, D., Favoreel, H., Bergen, K., Spitzen-van der Sluijs, A., Devisscher, S., Adriaens, T., Louette, G., Baert, K., Hyatt, A., Cramer, S., Haesebrouck, F., Pasmans, F., The novel '*Candidatus Amphibiichlamydia ranarum*' is highly prevalent in invasive exotic bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*), *Environ Microbiol Rep*, **5** (2013) 105-8.
- [9] Thomas, V., Casson, N., Greub, G., *Criblamydia sequanensis*, a new intracellular *Chlamydiales* isolated from Seine river water using amoebal co-culture, *Environ Microbiol*, **8** (2006) 2125-35.
- [10] Corsaro, D., Feroldi, V., Saucedo, G., Ribas, F., Loret, J.F., Greub, G., Novel *Chlamydiales* strains isolated from a water treatment plant, *Environ Microbiol*, **11** (2009) 188-200.
- [11] Taylor-Brown, A., Vaughan, L., Greub, G., Timms, P., Polkinghorne, A., Twenty years of research into *Chlamydia*-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum *Chlamydiae*, *Pathog Dis*, **73** (2015) 1-15.
- [12] Wheelhouse, N., Sait, M., Gidlow, J., Deuchande, R., Borel, N., Baily, J., Caldow, G., Longbottom, D., Molecular detection of *Chlamydia*-like organisms in cattle drinking water, *Vet Microbiol*, **152** (2011) 196-9.
- [13] Laroucau, K., de Cremoux, R., Rodolakis, A., Rôle des *chlamydiae* dans les avortements des ruminants, *Bulletin des G. T. V.*, (2014) 23-32.
- [14] Blumer, S., Greub, G., Waldvogel, A., Hassig, M., Thoma, R., Tschuor, A., Pospischil, A., Borel, N., *Waddlia*, *Parachlamydia* and *Chlamydiaceae* in bovine abortion, *Vet Microbiol*, **152** (2011) 385-93.
- [15] Baud, D., Regan, L., Greub, G., Emerging role of *Chlamydia* and *Chlamydia*-like organisms in adverse pregnancy outcomes, *Curr Opin Infect Dis*, **21** (2008) 70-6.
- [16] Coulon, C., Amibes libres de l'environnement : Résistance aux traitements de désinfection et interactions avec les *Chlamydiales*., 2011.
- [17] Rurangirwa, F.R., Dilbeck, P.M., Crawford, T.B., McGuire, T.C., McElwain, T.F., Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order *Chlamydiales*: proposal of *Waddliaceae* fam. nov., *Waddlia chondrophila* gen. nov., sp. nov, *Int J Syst Bacteriol*, **49 Pt 2** (1999) 577-81.
- [18] Dilbeck, P.M., Evermann, J.F., Crawford, T.B., Ward, A.C., Leathers, C.W., Holland, C.J., Mebus, C.A., Logan, L.L., Rurangirwa, F.R., McGuire, T.C., Isolation of a previously undescribed *rickettsia* from an aborted bovine fetus, *J Clin Microbiol*, **28** (1990) 814-6.

- [19] Chua, P.K., Corkill, J.E., Hooi, P.S., Cheng, S.C., Winstanley, C., Hart, C.A., Isolation of *Waddlia malaysiensis*, a novel intracellular bacterium, from fruit bat (*Eonycteris spelaea*), *Emerg Infect Dis*, **11** (2005) 271-7.
- [20] Pierle, S.A., Morales, C.O., Martinez, L.P., Ceballos, N.A., Rivero, J.J., Diaz, O.L., Brayton, K.A., Setien, A.A., Novel *Waddlia* Intracellular Bacterium in *Artibeus intermedius* Fruit Bats, Mexico, *Emerg Infect Dis*, **21** (2015) 2161-3.
- [21] Dilbeck-Robertson, P., McAllister, M.M., Bradway, D., Evermann, J.F., Results of a new serologic test suggest an association of *Waddlia chondrophila* with bovine abortion, *J Vet Diagn Invest*, **15** (2003) 568-9.
- [22] Karlsen, M., Nylund, A., Watanabe, K., Helvik, J.V., Nylund, S., Plarre, H., Characterization of 'Candidatus Clavochlamydia salmonicola': an intracellular bacterium infecting salmonid fish, *Environ Microbiol*, **10** (2008) 208-18.
- [23] Mitchell, S.O., Steinum, T., Rodger, H., Holland, C., Falk, K., Colquhoun, D.J., Epitheliocystis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., farmed in fresh water in Ireland is associated with 'Candidatus Clavochlamydia salmonicola' infection, *J Fish Dis*, **33** (2010) 665-73.
- [24] Draghi, A., 2nd, Popov, V.L., Kahl, M.M., Stanton, J.B., Brown, C.C., Tsongalis, G.J., West, A.B., Frasca, S., Jr., Characterization of "Candidatus piscichlamydia salmonis" (order *Chlamydiales*), a chlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), *J Clin Microbiol*, **42** (2004) 5286-97.
- [25] Draghi, A., 2nd, Bebak, J., Daniels, S., Tulman, E.R., Geary, S.J., West, A.B., Popov, V.L., Frasca, S., Jr., Identification of 'Candidatus Piscichlamydia salmonis' in Arctic charr *Salvelinus alpinus* during a survey of charr production facilities in North America, *Dis Aquat Organ*, **89** (2010) 39-49.
- [26] Stride, M.C., Polkinghorne, A., Miller, T.L., Groff, J.M., LaPatra, S.E., Nowak, B.F., Molecular characterization of "Candidatus Parilichlamydia carangidicola," a novel *Chlamydia*-like epitheliocystis agent in Yellowtail Kingfish, *Seriola lalandi* (Valenciennes), and the proposal of a new family, "Candidatus Parilichlamydiaceae" fam. nov. (Order *Chlamydiales*), *Appl Environ Microbiol*, **79** (2013) 1590-7.
- [27] Stride, M.C., Polkinghorne, A., Miller, T.L., Nowak, B.F., Molecular characterization of "Candidatus Similichlamydia latridicola" gen. nov., sp. nov. (*Chlamydiales*: "Candidatus Parilichlamydiaceae"), a novel *Chlamydia*-like epitheliocystis agent in the Striped Trumpeter, *Latris lineata* (Forster), *Appl Environ Microbiol*, **79** (2013) 4914-20.
- [28] Steigen, A., Karlsbakk, E., Plarre, H., Watanabe, K., Overgard, A.C., Brevik, O., Nylund, A., A new intracellular bacterium, *Candidatus Similichlamydia labri* sp. nov. (*Chlamydiaceae*) producing epitheliocysts in ballan wrasse, *Labrus bergylta* (Pisces, Labridae), *Arch Microbiol*, **197** (2015) 311-8.
- [29] Stride, M.C., Polkinghorne, A., Powell, M.D., Nowak, B.F., "Candidatus Similichlamydia laticola", a novel *Chlamydia*-like agent of epitheliocystis in seven consecutive cohorts of farmed Australian barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), *PLoS One*, **8** (2013) e82889.
- [30] Steigen, A., Nylund, A., Karlsbakk, E., Akoll, P., Fiksdal, I.U., Nylund, S., Odong, R., Plarre, H., Semyalo, R., Skar, C., Watanabe, K., 'Cand. Actinochlamydia clariae' gen. nov., sp. nov., a unique intracellular bacterium causing epitheliocystis in catfish (*Clarias gariepinus*) in Uganda, *PLoS One*, **8** (2013) e66840.
- [31] Lagkouvardos, I., Weinmaier, T., Lauro, F.M., Cavicchioli, R., Rattei, T., Horn, M., Integrating metagenomic and amplicon databases to resolve the phylogenetic and ecological diversity of the *Chlamydiae*, *ISME J*, **8** (2014) 115-25.
- [32] Christerson, L., Blomqvist, M., Grannas, K., Thollessen, M., Laroucau, K., Waldenstrom, J., Eliasson, I., Olsen, B., Herrmann, B., A novel *Chlamydiaceae*-like bacterium found in faecal specimens from sea birds from the Bering Sea, *Environ Microbiol Rep*, **2** (2010) 605-10.
- [33] Isaksson, J., Christerson, L., Blomqvist, M., Wille, M., Alladio, L., Sachse, K., Olsen, B., González-Acuña, D., Herrmann, B., *Chlamydiaceae*-like bacterium, but no *Chlamydia psittaci*, in sea birds from Antarctica, *Polar Biol*, (2015) 1-6.

- [34] Aaziz, R., Gourlay, P., Vorimore, F., Sachse, K., Siarkou, V.I., Laroucau, K., *Chlamydiaceae* in north Atlantic seabirds admitted to a wildlife rescue center in western France, *Appl Environ Microbiol*, **81** (2015) 4581-90.
- [35] Corsaro, D., Valassina, M., Venditti, D., Increasing diversity within *Chlamydiae*, *Crit Rev Microbiol*, **29** (2003) 37-78.
- [36] Mitura, A., Szymanska-Czerwinska, M., Niemczuk, K., Anara, J., *Chlamydia* in birds - occurrence, new species and zoonotic potential - a review., *Bull Vet Inst Pulawy*, **58** (2014) 503-6.
- [37] Horn, M., Collingro, A., Schmitz-Esser, S., Beier, C.L., Purkhold, U., Fartmann, B., Brandt, P., Nyakatura, G.J., Droege, M., Frishman, D., Rattei, T., Mewes, H.W., Wagner, M., Illuminating the evolutionary history of *chlamydiae*, *Science*, **304** (2004) 728-30.
- [38] Horn, M., *Chlamydiae* as symbionts in eukaryotes, *Annu Rev Microbiol*, **62** (2008) 113-31.
- [39] Ryan, E.T., Trachoma: A blinding scourge from the bronze age to the twenty-first century., *New Engl J Med*, **358** (2008) 1872-3.
- [40] Harkinezhad, T., Geens, T., Vanrompay, D., *Chlamydophila psittaci* infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences, *Vet Microbiol*, **135** (2009) 68-77.
- [41] Vanrompay, D., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis, *Vet Microbiol*, **45** (1995) 93-119.
- [42] Coles, A.C., Micro-organisms in psittacosis, *Br Med J*, **1** (1930) 719.
- [43] Wolins, W., Ornithosis; a review with a report of eight cases resulting from contact with the domestic Pekin duck, *Am J Med Sci*, **216** (1948) 551-64.
- [44] Shewen, P.E., Chlamydial infection in animals: a review, *Can Vet J*, **21** (1980) 2-11.
- [45] Rake, G., Jones, H.P., Studies on Lymphogranuloma venereum: I. Development of the agent in the yolk sac of the chicken embryo, *J Exp Med*, **75** (1942) 323-38.
- [46] Moulder, J.W., The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses, *Annu Rev Microbiol*, **20** (1966) 107-30.
- [47] Storz, J., Page, L., Taxonomy of the *Chlamydiae*: Reasons for classifying organisms of the genus *Chlamydia*, family *Chlamydiaceae*, in a separate order, *Chlamydiales* ord. nov., *Int J Syst Bacteriol*, **21** (1971) 332-4.
- [48] Skerman, V.B.D., McGowan, V., Sneath, P.H.A., Approved lists of bacterial names, *Int J Syst Bacteriol*, **30** (1980) 225-420.
- [49] Grayston, J.T., Kuo, C., Campbell, L.A., Wang, S.P., *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. Strain TWAR, *int J Syst Evol Microbiol*, **39** (1989) 88-90.
- [50] Fukushi, H., Hirai, K., Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants, *Int J Syst Bacteriol*, **42** (1992) 306-8.
- [51] Schachter, J., Stephens, R.S., Timms, P., Kuo, C., Bavoil, P.M., Birkelund, S., Boman, J., Caldwell, H., Campbell, L.A., Chernesky, M., Christiansen, G., Clarke, I.N., Gaydos, C., Grayston, J.T., Hackstadt, T., Hsia, R., Kaltenboeck, B., Leinonnen, M., Ojcius, D., McClarty, G., Orfila, J., Peeling, R., Puolakkainen, M., Quinn, T.C., Rank, R.G., Raulston, J., Ridgeway, G.L., Saikku, P., Stamm, W.E., Taylor-Robinson, D.T., Wang, S.P., Wyrick, P.B., Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet, *Int J Syst Evol Microbiol*, **51** (2001) 249; author reply 51-3.
- [52] Janda, J.M., Abbott, S.L., 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls, *J Clin Microbiol*, **45** (2007) 2761-4.
- [53] Sachse, K., Bavoil, P.M., Kaltenboeck, B., Stephens, R.S., Kuo, C.C., Rossello-Mora, R., Horn, M., Emendation of the family *Chlamydiaceae*: proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species, *Syst Appl Microbiol*, **38** (2015) 99-103.
- [54] Sachse, K., Laroucau, K., Riege, K., Wehner, S., Dilcher, M., Creasy, H.H., Weidmann, M., Myers, G., Vorimore, F., Vicari, N., Magnino, S., Liebler-Tenorio, E., Ruetttger, A., Bavoil, P.M., Hufert, F.T., Rosselló-Móra, R., Marz, M., Evidence for the existence of two new members of the family *Chlamydiaceae* and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov., *Syst Appl Microbiol*, **37** (2014) 79-88.

- [55] Vorimore, F., Hsia, R.-c., Huot-Creasy, H., Bastian, S., Deruyter, L., Passet, A., Sachse, K., Bavoil, P., Myers, G., Laroucau, K., Isolation of a new *Chlamydia* species from the feral sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis.*, *PLoS ONE*, **8** (2013) e74823.
- [56] Burton, M.J., Mabey, D.C.W., The Global Burden of Trachoma: A Review, *PLoS Negl Trop Dis*, **3** (2009) e460.
- [57] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Recommendations for the prevention and management of *chlamydia trachomatis* infections, 1993., *MMWR*, **42** (1993).
- [58] Darville, T., *Chlamydia trachomatis* infections in neonates and young children, *Semin Pediatr Infect Dis*, **16** (2005) 235-44.
- [59] Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Sarowska, J., Choroszy-Krol, I., Selected aspects of *Chlamydophila pneumoniae* infections, *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, **69** (2015) 612-23.
- [60] Matsuo, J., Kobayashi, M., Nakamura, S., Mizutani, Y., Yao, T., Hirai, I., Yamamoto, Y., Yamaguchi, H., Stability of *Chlamydophila pneumoniae* in a harsh environment without a requirement for acanthamoebae, *Microbiol Immunol*, **54** (2010) 63-73.
- [61] Storey, C., Lusher, M., Yates, P., Richmond, S., Evidence for *Chlamydia pneumoniae* of non-human origin, *J Gen Microbiol*, **139** (1993) 2621-6.
- [62] Jackson, M., White, N., Giffard, P., Timms, P., Epizootiology of *Chlamydia* infections in two free-range koala populations, *Vet Microbiol*, **65** (1999) 255-64.
- [63] Frutos, M.C., Monetti, M.S., Vaulet, L.G., Cadario, M.E., Fermepin, M.R., Re, V.E., Cuffini, C.G., Genetic diversity of *Chlamydia* among captive birds from central Argentina, *Avian Pathol*, **44** (2015) 50-6.
- [64] Barron, A.L., White, H.J., Rank, R.G., Soloff, B.L., Target tissues associated with genital infection of female guinea pigs by the chlamydial agent of guinea pig inclusion conjunctivitis, *J Infect Dis*, **139** (1979) 60-8.
- [65] Sykes, J.E., Feline chlamydiosis, *Clin Tech Small Anim Pract*, **20** (2005) 129-34.
- [66] Schautteet, K., Vanrompay, D., *Chlamydiaceae* infections in pig, *Vet Res*, **42** (2011) 29.
- [67] Di Francesco, A., Donati, M., Rossi, M., Pignanelli, S., Shurdhi, A., Baldelli, R., Cevenini, R., Tetracycline-resistant *Chlamydia suis* isolates in Italy, *Vet Rec*, **163** (2008) 251-2.
- [68] Schautteet, K., De Clercq, E., Miry, C., Van Groenweghe, F., Delava, P., Kalmar, I., Vanrompay, D., Tetracycline-resistant *Chlamydia suis* in cases of reproductive failure on Belgian, Cypriote and Israeli pig production farms, *J Med Microbiol*, **62** (2013) 331-4.
- [69] Lenart, J., Andersen, A.A., Rockey, D.D., Growth and development of tetracycline-resistant *Chlamydia suis*, *Antimicrob Agents Chemother*, **45** (2001) 2198-203.
- [70] Institut de l'élevage, Nouzières, S., Laroucau, K., Berthelot, X., Dion, F., Leptitcolin, E., Nicollet, P., Vialard, J., de Cremoux, R., La chlamydie abortive chez les petits ruminants, 2013.
- [71] Herrmann, B., Rahman, R., Bergström, S., Bonnedahl, J., Olsen, B., *Chlamydophila abortus* in a Brown Skua (*Catharacta antarctica lonnbergi*) from a Subantarctic Island, *Appl Environ Microbiol*, **66** (2000) 3654-6.
- [72] Pospischil, A., Thoma, R., Hilbe, M., Grest, P., Gebbers, J.O., Abortion in woman caused by caprine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1), *Swiss Med Wkly*, **132** (2002) 64-6.
- [73] Hyde, S.R., Benirschke, K., Gestational psittacosis: case report and literature review, *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, **10** (1997) 602-7.
- [74] Anderson, I.E., Baxter, S.I., Dunbar, S., Rae, A.G., Philips, H.L., Clarkson, M.J., Herring, A.J., 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** (1996) 245-51.
- [75] Jee, J., Degraes, F.J., Kim, T., Kaltenboeck, B., High prevalence of natural *Chlamydophila* species infection in calves, *J Clin Microbiol*, **42** (2004) 5664-72.
- [76] Girjes, A.A., Hugall, A., Graham, D.M., McCaul, T.F., Lavin, M.F., Comparison of type I and type II *Chlamydia psittaci* strains infecting koalas (*Phascolarctos cinereus*), *Vet Microbiol*, **37** (1993) 65-83.
- [77] Tanaka, C., Miyazawa, T., Watarai, M., Ishiguro, N., Bacteriological survey of feces from feral pigeons in Japan, *J Vet Med Sci*, **67** (2005) 951-3.

- [78] Sachse, K., Laroucau, K., Vorimore, F., Magnino, S., Feige, J., Muller, W., Kube, S., Hotzel, H., Schubert, E., Slickers, P., Ehricht, R., DNA microarray-based genotyping of *Chlamydophila psittaci* strains from culture and clinical samples, *Vet Microbiol*, **135** (2009) 22-30.
- [79] Kaleta, E.F., Taday, E.M., Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology, *Avian Pathol*, **32** (2003) 435-61.
- [80] Spalatin, J., Fraser, C.E., Connell, R., Hanson, R.P., Berman, D.T., Agents of psittacosis-lymphogranuloma venereum group isolated from muskrats and snowshoe hares in Saskatchewan, *Can J Comp Med Vet Sci*, **30** (1966) 260-4.
- [81] Henning, K., Sachse, K., Sting, R., Demonstration of *Chlamydia* from an equine abortion., *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, **107** (2000) 49-52.
- [82] Szeredi, L., Hotzel, H., Sachse, K., High prevalence of chlamydial (*Chlamydophila psittaci*) infection in fetal membranes of aborted equine fetuses, *Vet Res Commun*, **29 Suppl 1** (2005) 37-49.
- [83] Sprague, L.D., Schubert, E., Hotzel, H., Scharf, S., Sachse, K., The detection of *Chlamydophila psittaci* genotype C infection in dogs, *Vet J*, **181** (2009) 274-9.
- [84] Kabeya, H., Sato, S., Maruyama, S., Prevalence and characterization of *Chlamydia* DNA in zoo animals in Japan, *Microbiol Immunol*, **59** (2015) 507-15.
- [85] Reinhold, P., Sachse, K., Kaltenboeck, B., *Chlamydiaceae* in cattle: commensals, trigger organisms, or pathogens?, *Vet J*, **189** (2011) 257-67.
- [86] Kauffold, J., Henning, K., Bachmann, R., Hotzel, H., Melzer, F., The prevalence of *chlamydiae* of bulls from six bull studs in Germany, *Anim Reprod Sci*, **102** (2007) 111-21.
- [87] Gasparini, J., Erin, N., Bertin, C., Jacquin, L., Vorimore, F., Frantz, A., Lenouvel, P., Laroucau, K., Impact of urban environment and host phenotype on the epidemiology of *Chlamydiaceae* in feral pigeons (*Columba livia*), *Environ Microbiol*, **13** (2011) 3186-93.
- [88] Laroucau, K., Vorimore, F., Aaziz, R., Berndt, A., Schubert, E., Sachse, K., Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France, *Infect Genet Evol*, **9** (2009) 1240-7.
- [89] Robertson, T., Bibby, S., O'Rourke, D., Belfiore, T., Agnew-Crumpton, R., Noormohammadi, A.H., Identification of Chlamydial species in crocodiles and chickens by PCR-HRM curve analysis, *Vet Microbiol*, **145** (2010) 373-9.
- [90] Zocevic, A., Vorimore, F., Marhold, C., Horvatek, D., Wang, D., Slavec, B., Prentza, Z., Stavianis, G., Prukner-Radovic, E., Dovc, A., Siarkou, V.I., Laroucau, K., Molecular characterization of atypical *Chlamydia* and evidence of their dissemination in different European and Asian chicken flocks by specific real-time PCR, *Environ Microbiol*, **14** (2012) 2212-22.
- [91] Szymańska-Czerwińska, M., Niemczuk, K., Sachse, K., Mitura, A., Karpińska Teresa, A., Reichert, M., Detection of a new non-classified *Chlamydia* species in hens in Poland, 2013, pp. 25.
- [92] Lagae, S., Kalmar, I., Laroucau, K., Vorimore, F., Vanrompay, D., Emerging *Chlamydia psittaci* infections in chickens and examination of transmission to humans, *J Med Microbiol*, **63** (2014) 399-407.
- [93] Matsumoto, A., Bessho, H., Uehira, K., Suda, T., Morphological studies of the association of mitochondria with chlamydial inclusions and the fusion of chlamydial inclusions, *J Electron Microscop (Tokyo)*, **40** (1991) 356-63.
- [94] Liechti, G.W., Kuru, E., Hall, E., Kalinda, A., Brun, Y.V., VanNieuwenhze, M., Maurelli, A.T., A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis*, *Nature*, **506** (2014) 507-10.
- [95] Kahrstrom, C.T., *Chlamydiae* play by their own rules, *Nat Rev Microbiol*, **12** (2014) 76-7.
- [96] Escalante-Ochoa, C., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., The intracellular life of *Chlamydia psittaci*: how do the bacteria interact with the host cell?, *FEMS Microbiol Rev*, **22** (1998) 65-78.
- [97] Hybiske, K., Stephens, R.S., Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104** (2007) 11430-5.
- [98] Airene, S., Surcel, H.-M., Alakärppä, H., Laitinen, K., Paavonen, J., Saikku, P., Laurila, A., *Chlamydia pneumoniae* infection in human monocytes., *Infect Immun*, **67** (1999) 1445-9.

- [99] Byrne, G.I., Ouellette, S.P., Wang, Z., Rao, J.P., Lu, L., Beatty, W.L., Hudson, A.P., *Chlamydia pneumoniae* expresses genes required for DNA replication but not cytokinesis during persistent infection of HEp-2 cells, *Infect Immun*, **69** (2001) 5423-9.
- [100] Borel, N., Summersgill, J.T., Mukhopadhyay, S., Miller, R.D., Ramirez, J.A., Pospischil, A., Evidence for persistent *Chlamydia pneumoniae* infection of human coronary atheromas, *Atherosclerosis*, **199** (2008) 154-61.
- [101] Kintner, J., Lajoie, D., Hall, J., Whittimore, J., Schoborg, R.V., Commonly prescribed beta-lactam antibiotics induce *C. trachomatis* persistence/stress in culture at physiologically relevant concentrations, *Front Cell Infect Microbiol*, **4** (2014) 44.
- [102] Matsumoto, A., Manire, G.P., Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*, *J Bacteriol*, **101** (1970) 278-85.
- [103] Goellner, S., Schubert, E., Liebler-Tenorio, E., Hotzel, H., Saluz, H.P., Sachse, K., Transcriptional response patterns of *Chlamydophila psittaci* in different *in vitro* models of persistent infection, *Infect Immun*, **74** (2006) 4801-8.
- [104] Beatty, W.L., Byrne, G.I., Morrison, R.P., Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection *in vitro*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90** (1993) 3998-4002.
- [105] Raulston, J.E., Response of *Chlamydia trachomatis* serovar E to iron restriction *in vitro* and evidence for iron-regulated chlamydial proteins, *Infect Immun*, **65** (1997) 4539-47.
- [106] Harper, A., Pogson, C.I., Jones, M.L., Pearce, J.H., Chlamydial development is adversely affected by minor changes in amino acid supply, blood plasma amino acid levels, and glucose deprivation, *Infect Immun*, **68** (2000) 1457-64.
- [107] Deka, S., Vanover, J., Dessus-Babus, S., Whittimore, J., Howett, M.K., Wyrick, P.B., Schoborg, R.V., *Chlamydia trachomatis* enters a viable but non-cultivable (persistent) state within herpes simplex virus type 2 (HSV-2) co-infected host cells, *Cellular microbiology*, **8** (2006) 149-62.
- [108] Romano, J.D., de Beaumont, C., Carrasco, J.A., Ehrenman, K., Bavoil, P.M., Coppens, I., Fierce competition between *Toxoplasma* and *Chlamydia* for host cell structures in dually infected cells, *Eukaryot Cell*, **12** (2013) 265-77.
- [109] Schoborg, R.V., Borel, N., Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) co-infection induced chlamydial persistence/stress does not require viral replication, *Front Cell Infect Microbiol*, **4** (2014) 20.
- [110] Hsia, R., Ohayon, H., Gounon, P., Dautry-Varsat, A., Bavoil, P.M., Phage infection of the obligate intracellular bacterium, *Chlamydia psittaci* strain guinea pig inclusion conjunctivitis, *Microbes Infect*, **2** (2000) 761-72.
- [111] Campbell, L.A., Patton, D.L., Moore, D.E., Cappuccio, A.L., Mueller, B.A., Wang, S.P., Detection of *Chlamydia trachomatis* deoxyribonucleic acid in women with tubal infertility, *Fertil Steril*, **59** (1993) 45-50.
- [112] Schachter, J., Moncada, J., Dawson, C.R., Sheppard, J., Courtright, P., Said, M.E., Zaki, S., Hafez, S.F., Lorincz, A., Nonculture methods for diagnosing chlamydial infection in patients with trachoma: a clue to the pathogenesis of the disease?, *J Infect Dis*, **158** (1988) 1347-52.
- [113] Lewis, M.E., Belland, R.J., AbdelRahman, Y.M., Beatty, W.L., Aiyar, A.A., Zea, A.H., Greene, S.J., Marrero, L., Buckner, L.R., Tate, D.J., McGowin, C.L., Kozlowski, P.A., O'Brien, M., Lillis, R.A., Martin, D.H., Quayle, A.J., Morphologic and molecular evaluation of *Chlamydia trachomatis* growth in human endocervix reveals distinct growth patterns, *Front Cell Infect Microbiol*, **4** (2014) 71.
- [114] Hogan, R.J., Mathews, S.A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J.T., Timms, P., Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm, *Infect Immun*, **72** (2004) 1843-55.
- [115] Van Lent, S., Piet, J.R., Beeckman, D., van der Ende, A., Van Nieuwerburgh, F., Bavoil, P., Myers, G., Vanrompay, D., Pannekoek, Y., Full genome sequences of all nine *Chlamydia psittaci* genotype reference strains, *J Bacteriol*, **194** (2012) 6930-1.
- [116] Dugan, J., Rockey, D.D., Jones, L., Andersen, A.A., Tetracycline resistance in *Chlamydia suis* mediated by genomic islands inserted into the chlamydial *inv*-like gene, *Antimicrob Agents Chemother*, **48** (2004) 3989-95.

- [117] Ripa, T., Nilsson, P., A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests, *Euro Surveill*, **11** (2006) E061109 2.
- [118] Sachse, K., Laroucau, K., Vanrompay, D., Avian Chlamydiosis, *Curr Clin Micro Rpt*, **2** (2015) 10-21.
- [119] Jutras, I., Subtil, A., Wyplosz, B., Dautry-Varsat, A., Chlamydia, in: G. J-P (Ed.) *Intracellular pathogens in membrane interactions and vacuole biogenesis*, Springer-Verlag New York, New York, 2004, pp. 179-89.
- [120] Abromaitis, S., Stephens, R.S., Attachment and Entry of *Chlamydia* Have Distinct Requirements for Host Protein Disulfide Isomerase, *PLoS Pathogens*, **5** (2009) e1000357.
- [121] Dautry-Varsat, A., Balana, M.E., Wyplosz, B., Chlamydia-host cell interactions : recent advances on bacterial entry and intracellular development, *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, **5** (2004) 561-70.
- [122] Vanrompay, D., Charlier, G., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Ultrastructural changes in avian *Chlamydia psittaci* serovar A-, B-, and D-infected Buffalo Green Monkey cells, *Infect Immun*, **64** (1996) 1265-71.
- [123] Voigt, A., Schofl, G., Saluz, H.P., The *Chlamydia psittaci* genome: a comparative analysis of intracellular pathogens, *PLoS One*, **7** (2012) e35097.
- [124] Borth, N., Litsche, K., Franke, C., Sachse, K., Saluz, H.P., Hanel, F., Functional interaction between type III-secreted protein IncA of *Chlamydophila psittaci* and human G3BP1, *PLoS One*, **6** (2011) e16692.
- [125] Knittler, M.R., Berndt, A., Bocker, S., Dutow, P., Hanel, F., Heuer, D., Kagebein, D., Klos, A., Koch, S., Liebler-Tenorio, E., Ostermann, C., Reinhold, P., Saluz, H.P., Schofl, G., Sehnert, P., Sachse, K., *Chlamydia psittaci*: new insights into genomic diversity, clinical pathology, host-pathogen interaction and anti-bacterial immunity, *Int J Med Microbiol*, **304** (2014) 877-93.
- [126] Bocker, S., Heurich, A., Franke, C., Monajembashi, S., Sachse, K., Saluz, H.P., Hanel, F., *Chlamydia psittaci* inclusion membrane protein IncB associates with host protein Snapin, *Int J Med Microbiol*, **304** (2014) 542-53.
- [127] Mojica, S.A., Hovis, K.M., Frieman, M.B., Tran, B., Hsia, R.C., Ravel, J., Jenkins-Houk, C., Wilson, K.L., Bavoil, P.M., SINC, a type III secreted protein of *Chlamydia psittaci*, targets the inner nuclear membrane of infected cells and uninfected neighbors, *Mol Biol Cell*, **26** (2015) 1918-34.
- [128] He, Q.Z., Zeng, H.C., Huang, Y., Hu, Y.Q., Wu, Y.M., The type III secretion system (T3SS) of *Chlamydophila psittaci* is involved in the host inflammatory response by activating the JNK/ERK signaling pathway, *Biomed Res Int*, **2015** (2015) 652416.
- [129] Wolff, B.J., Morrison, S.S., Pesti, D., Ganakammal, S.R., Srinivasamoorthy, G., Changayil, S., Weil, M.R., MacCannell, D., Rowe, L., Frace, M., Ritchie, B.W., Dean, D., Winchell, J.M., *Chlamydia psittaci* comparative genomics reveals intraspecies variations in the putative outer membrane and type III secretion system genes, *Microbiology*, **161** (2015) 1378-91.
- [130] Richmond, S.J., Stirling, P., Ashley, C.R., Virus infecting the reticulate bodies of an avian strain of *Chlamydia psittaci*, *FEMS Microbiol Lett*, **14** (1982) 31-6.
- [131] Sliwa-Dominiak, J., Suszynska, E., Pawlikowska, M., Deptula, W., *Chlamydia* bacteriophages, *Arch Microbiol*, **195** (2013) 765-71.
- [132] Rank, R.G., Bowlin, A.K., Cane, S., Shou, H., Liu, Z., Nagarajan, U.M., Bavoil, P.M., Effect of Chlamydiophage phiCPG1 on the course of conjunctival infection with "*Chlamydia caviae*" in guinea pigs, *Infect Immun*, **77** (2009) 1216-21.
- [133] Hoestgaard-Jensen, K., Christiansen, G., Honore, B., Birkelund, S., Influence of the *Chlamydia pneumoniae* AR39 bacteriophage phiCPAR39 on chlamydial inclusion morphology, *FEMS Immunol Med Microbiol*, **62** (2011) 148-56.
- [134] Everson, J.S., Garner, S.A., Fane, B., Liu, B.L., Lambden, P.R., Clarke, I.N., Biological properties and cell tropism of Chp2, a bacteriophage of the obligate intracellular bacterium *Chlamydophila abortus*, *J Bacteriol*, **184** (2002) 2748-54.
- [135] Hsia, R.C., Ting, L.M., Bavoil, P.M., Microvirus of *chlamydia psittaci* strain guinea pig inclusion conjunctivitis: isolation and molecular characterization, *Microbiology*, **146** (Pt 7) (2000) 1651-60.

- [136] Salim, O., Skilton, R.J., Lambden, P.R., Fane, B.A., Clarke, I.N., Behind the chlamydial cloak: the replication cycle of chlamydiae Chp2, revealed, *Virology*, **377** (2008) 440-5.
- [137] Smith, K.A., Campbell, C.T., Murphy, J., Stobierski, M.G., Tengelsen, L.A., Compendium of measures to control *Chlamydomphila psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (Avian Chlamydiosis), 2010., *NASPHV*, (2010).
- [138] Yeruva, L., Spencer, N., Bowlin, A.K., Wang, Y., Rank, R.G., Chlamydial infection of the gastrointestinal tract: a reservoir for persistent infection, *Pathog Dis*, **68** (2013) 88-95.
- [139] Van Loock, M., Loots, K., Van Heerden, M., Vanrompay, D., Goddeeris, B.M., Exacerbation of *Chlamydomphila psittaci* pathogenicity in turkeys superinfected by *Escherichia coli*, *Vet Res*, **37** (2006) 745-55.
- [140] Van Loock, M., Loots, K., Zande, S.V., Heerden, M.V., Nauwynck, H., Goddeeris, B.M., Vanrompay, D., Pathogenic interactions between *Chlamydomphila psittaci* and avian pneumovirus infections in turkeys, *Vet Microbiol*, **112** (2006) 53-63.
- [141] Desmidt, M., Ducatelle, R., Uyttebroek, E., Charlier, G., Hoorens, J., Respiratory adenovirus-like infection in a rose-ringed parakeet (*Psittacula krameri*), *Avian Dis*, **35** (1991) 1001-6.
- [142] To, K.K., Tse, H., Chan, W.M., Choi, G.K., Zhang, A.J., Sridhar, S., Wong, S.C., Chan, J.F., Chan, A.S., Woo, P.C., Lau, S.K., Lo, J.Y., Chan, K.H., Cheng, V.C., Yuen, K.Y., A novel psittacine adenovirus identified during an outbreak of avian chlamydiosis and human psittacosis: zoonosis associated with virus-bacterium coinfection in birds, *PLoS Negl Trop Dis*, **8** (2014) e3318.
- [143] Perpignan, D., Garner, M.M., Wellehan, J.F., Armstrong, D.L., Mixed infection with reovirus and *Chlamydomphila* in a flock of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*), *J Avian Med Surg*, **24** (2010) 316-21.
- [144] Circella, E., Pugliese, N., Todisco, G., Cafiero, M.A., Sparagano, O.A., Camarda, A., *Chlamydia psittaci* infection in canaries heavily infested by *Dermanyssus gallinae*, *Exp Appl Acarol*, **55** (2011) 329-38.
- [145] Karpinska, T.A., Kozaczynski, W., Niemczuk, K., Jasik, A., Kycko, A., Reichert, M., Mixed infection by fowlpox virus and *Chlamydomphila psittaci* in a commercial laying hen flock, *Acta Vet Hung*, **16** (2013) 1-10.
- [146] Van Loock, M., Geens, T., De Smit, L., Nauwynck, H., Van Empel, P., Naylor, C., Hafez, H.M., Goddeeris, B.M., Vanrompay, D., Key role of *Chlamydomphila psittaci* on Belgian turkey farms in association with other respiratory pathogens, *Vet Microbiol*, **107** (2005) 91-101.
- [147] Arzey, G.G., Arzey, K.E., Chlamydiosis in layer chickens, *Aust Vet J*, **67** (1990) 461.
- [148] Vanrompay, D., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Pathogenicity for turkeys of *Chlamydia psittaci* strains belonging to the avian serovars A, B and D, *Avian Pathol*, **23** (1994) 247-62.
- [149] Harkinezhad, T., Schautteet, K., Vanrompay, D., Protection of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) against *Chlamydomphila psittaci* challenge by DNA vaccination, *Vet Res*, **40** (2009) 61.
- [150] Yin, L., Lagae, S., Kalmar, I., Borel, N., Pospischil, A., Vanrompay, D., Pathogenicity of low and highly virulent *Chlamydia psittaci* isolates for specific-pathogen-free chickens, *Avian Dis*, **57** (2013) 242-7.
- [151] Yin, L., Kalmar, I.D., Lagae, S., Vandendriessche, S., Vanderhaeghen, W., Butaye, P., Cox, E., Vanrompay, D., Emerging *Chlamydia psittaci* infections in the chicken industry and pathology of *Chlamydia psittaci* genotype B and D strains in specific pathogen free chickens, *Vet Microbiol*, **162** (2013) 740-9.
- [152] Kalmar, I., Berndt, A., Yin, L., Chiers, K., Sachse, K., Vanrompay, D., Host-pathogen interactions in specific pathogen-free chickens following aerogenous infection with *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia abortus*, *Veterinary immunology and immunopathology*, **164** (2015) 30-9.
- [153] Braukmann, M., Sachse, K., Jacobsen, I.D., Westermann, M., Menge, C., Saluz, H.P., Berndt, A., Distinct intensity of host-pathogen interactions in *Chlamydia psittaci*- and *Chlamydia abortus*-infected chicken embryos, *Infect Immun*, **80** (2012) 2976-88.
- [154] Thierry, S., Vorimore, F., Rossignol, C., Scharf, S., Sachse, K., Berthon, P., Durand, B., Virlogeux-Payant, I., Borel, N., Laroucau, K., Oral uptake of *Chlamydia psittaci* by ducklings resulting in systemic dissemination and an intestinal reservoir, *PLoS ONE*, (in press) (2016).

- [155] Rank, R.G., Yeruva, L., Hidden in plain sight: chlamydial gastrointestinal infection and its relevance to persistence in human genital infection, *Infect Immun*, **82** (2014) 1362-71.
- [156] Vorimore, F., Investigation de la filière canards vis-à-vis des infections à *Chlamydia psittaci* et étude expérimentale., 2011.
- [157] Lublin, A., Shudari, G., Mechani, S., Weisman, Y., Egg transmission of *Chlamydia psittaci* in turkeys, *Vet Rec*, **139** (1996) 300.
- [158] Wittenbrink, M.M., Mrozek, M., Bisping, W., Isolation of *Chlamydia psittaci* from a chicken egg: evidence of egg transmission, *Zentralbl Veterinarmed B*, **40** (1993) 451-2.
- [159] Ahmed, B., De Boeck, C., Dumont, A., Cox, E., De Reu, K., Vanrompay, D., First experimental evidence for the transmission of *Chlamydia psittaci* in poultry through eggshell penetration, *Transbound Emerg Dis*, (2015).
- [160] Guérin, J.-L., Ballot, A., Sraka, B., Léon, O., Portage de *Chlamydophila psittaci* dans la filière canard mulard : Evaluation du portage chez les reproducteurs et incidence sur le statut du caneton., 2006.
- [161] Magnino, S., Haag-Wackernagel, D., Geigenfeind, I., Helmecke, S., Dovc, A., Prukner-Radovic, E., Residbegovic, E., Ileski, V., Laroucau, K., Donati, M., Martinov, S., Kaleta, E.F., Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications, *Vet Microbiol*, **135** (2009) 54-67.
- [162] Heddema, E.R., Ter Sluis, S., Buys, J.A., Vandenbroucke-Grauls, C.M., van Wijnen, J.H., Visser, C.E., Prevalence of *Chlamydophila psittaci* in fecal droppings from feral pigeons in Amsterdam, The Netherlands, *Appl Environ Microbiol*, **72** (2006) 4423-5.
- [163] Geigenfeind, I., Vanrompay, D., Haag-Wackernagel, D., Prevalence of *Chlamydia psittaci* in the feral pigeon population of Basel, Switzerland, *J Med Microbiol*, **61** (2012) 261-5.
- [164] Ling, Y., Chen, H., Chen, X., Yang, X., Yang, J., Bavoil, P.M., He, C., Epidemiology of *Chlamydia psittaci* Infection in Racing Pigeons and Pigeon Fanciers in Beijing, China, *Zoonoses Public Health*, **62** (2015) 401-6.
- [165] Sariya, L., Prompiram, P., Tangsudjai, S., Poltep, K., Chamsai, T., Mongkolphan, C., Rattanavibul, K., Sakdajivachareon, V., Detection and characterization of *Chlamydophila psittaci* in asymptomatic feral pigeons (*Columba livia domestica*) in central Thailand, *Asian Pac J Trop Med*, **8** (2015) 94-7.
- [166] Stenzel, T., Pestka, D., Choszcz, D., The prevalence and genetic characterization of *Chlamydia psittaci* from domestic and feral pigeons in Poland and the correlation between infection rate and incidence of pigeon circovirus, *Poultry science*, **93** (2014) 3009-16.
- [167] Khodadadi, M., Hemmatinezhad, B., Doosti, A., Khamesipour, F., Awosile, B., Molecular Detection and Prevalence of *Chlamydophila psittaci* in the Blood, Liver and Muscle Tissue of Urban Pigeons (*Columba livia domestica*) in Iran, *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **21** (2015) 265-9.
- [168] Ghorbanpoor, M., Bakhtiari, N.M., Mayahi, M., Moridveisi, H., Detection of *Chlamydophila psittaci* from pigeons by polymerase chain reaction in Ahvaz, *Iranian journal of microbiology*, **7** (2015) 18-22.
- [169] Elezi, Y., Shehu, G., Korro, K., Qafmolla, L., *Chlamydia psittaci* in parrots, pigeons, canaries, peacocks and Pheasants in Albania, *J Anim Vet Adv*, **13** (2014) 1014-7.
- [170] Sheleby-Elias, J., Solorzano-Morales, A., Romero-Zuniga, J.J., Dolz, G., Molecular detection and genotyping of *Chlamydia psittaci* in captive Psittacines from Costa Rica, *Vet Med Int*, **2013** (2013) 142962.
- [171] Herrera, I., Khan, S.R., Kaleta, E.F., Muller, H., Dolz, G., Neumann, U., Serological status for *Chlamydophila psittaci*, Newcastle disease virus, avian polyoma virus, and Pacheco disease virus in scarlet macaws (*Ara macao*) kept in captivity in Costa Rica, *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, **48** (2001) 721-6.
- [172] Piasecki, T., Chrzastek, K., Wieliczko, A., Detection and identification of *Chlamydophila psittaci* in asymptomatic parrots in Poland, *BMC Vet Res*, **8** (2012) 233.
- [173] Dovc, A., Slavec, B., Lindtner-Knific, R., Zorman-Rojs, O., Racnik, J., Golja, J., Vlahovic, K., Study of *Chlamydophila psittaci* outbreak in budgerigars, *Bull Vet Inst Pulawy*, **51** (2007) 343-6.

- [174] de Freitas Raso, T., Seixas, G.H., Guedes, N.M., Pinto, A.A., *Chlamydophila psittaci* in free-living Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil, *Vet Microbiol*, **117** (2006) 235-41.
- [175] de Freitas Raso, T.F., Teixeira, R.H., Carrasco, A.O., Araujo, J.P., Jr., Pinto, A.A., *Chlamydophila psittaci* infections in hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) confiscated in Brazil, *J Zoo Wildl Med*, **44** (2013) 169-72.
- [176] de Freitas Raso, T., Junior, A.B., Pinto, A.A., Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive Amazon parrots in Brazil, *J Zoo Wildl Med*, **33** (2002) 118-21.
- [177] Zhang, N.Z., Zhang, X.X., Zhou, D.H., Huang, S.Y., Tian, W.P., Yang, Y.C., Zhao, Q., Zhu, X.Q., Seroprevalence and genotype of *Chlamydia* in pet parrots in China, *Epidemiol Infect*, **143** (2015) 55-61.
- [178] Chahota, R., Ogawa, H., Mitsuhashi, Y., Ohya, K., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Genetic diversity and epizootiology of *Chlamydophila psittaci* prevalent among the captive and feral avian species based on VD2 region of *ompA* gene, *Microbiol Immunol*, **50** (2006) 663-78.
- [179] Blomqvist, M., Christerson, L., Waldenstrom, J., Herrmann, B., Olsen, B., *Chlamydia psittaci* in Swedish wetland birds: a risk to zoonotic infection?, *Avian Dis*, **56** (2012) 737-40.
- [180] Marhold, C., Slavec, B., Laroucau, K., vorimore, F., Racnik, J., Zadavec, M., Kese, D., Krapez, U., Dovc, A., Detection of *Chlamydia psittaci* in cage birds in Slovenia by real-time PCR, *Slov Vet Res*, **4** (2012) 185-92.
- [181] Blomqvist, M., Christerson, L., Waldenstrom, J., Lindberg, P., Helander, B., Gunnarsson, G., Herrmann, B., Olsen, B., *Chlamydia psittaci* in birds of prey, Sweden, *Infection ecology & epidemiology*, **2** (2012).
- [182] Zhao, J.M., Rong, G., Zhou, H.L., Hou, G.Y., Seroprevalence and risk factors of *Chlamydia psittaci* infection in domestic geese *Anser domestica*, in Hainan province of China, *Acta Trop*, **145** (2015) 23-5.
- [183] Sraka, B., Détection et quantification du portage de *Chlamydophila psittaci* chez le canard mulard et gavage : enquête de prévalence., 2004.
- [184] Andersen, A.A., Vanrompay, D., Avian chlamydiosis, *Rev Sci Tech*, **19** (2000) 396-404.
- [185] Vanrompay, D., Butaye, P., Van Nerom, A., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., The prevalence of *Chlamydia psittaci* infections in Belgian commercial turkey poults, *Vet Microbiol*, **54** (1997) 85-93.
- [186] Dickx, V., Geens, T., Deschuyffeleer, T., Tyberghien, L., Harkinezhad, T., Beeckman, D.S., Braeckman, L., Vanrompay, D., *Chlamydophila psittaci* zoonotic risk assessment in a chicken and turkey slaughterhouse, *J Clin Microbiol*, **48** (2010) 3244-50.
- [187] Laroucau, K., Aaziz, R., Meurice, L., Servas, V., Chossat, I., Royer, H., de Barbeyrac, B., Vaillant, V., Moyon, J.L., Meziani, F., Sachse, K., Rolland, P., Outbreak of psittacosis in a group of women exposed to *Chlamydia psittaci*-infected chickens, *Euro Surveill*, **20** (2015).
- [188] Bavoil, P.M., What's in a word: the use, misuse, and abuse of the word "persistence" in *Chlamydia* biology, *Front Cell Infect Microbiol*, **4** (2014) 27.
- [189] Arzey, K.E., Arzey, G.G., Reece, R.L., Chlamydiosis in commercial ducks, *Aust Vet J*, **67** (1990) 333-4.
- [190] Andersen, A.A., Comparison of pharyngeal, fecal, and cloacal samples for the isolation of *Chlamydia psittaci* from experimentally infected cockatiels and turkeys., *J Vet Diagn Invest*, **8** (1996) 448-50.
- [191] Vanrompay, D., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 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** (1992) 105-12.
- [192] OIE, Avian chlamydiosis, in: OIE Terrestrial Manual 2012, 2012.
- [193] Singh, S., Eldin, C., Kowalczywska, M., Raoult, D., Axenic culture of fastidious and intracellular bacteria, *Trends Microbiol*, **21** (2013) 92-9.
- [194] Omsland, A., Sager, J., Nair, V., Sturdevant, D.E., Hackstadt, T., Developmental stage-specific metabolic and transcriptional activity of *Chlamydia trachomatis* in an axenic medium, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109** (2012) 19781-5.

- [195] Donati, M., Laroucau, K., Storni, E., Mazzeo, C., Magnino, S., Di Francesco, A., Baldelli, R., Ceglie, L., Renzi, M., Cevenini, R., Serological response to pgp3 protein in animal and human chlamydial infections, *Vet Microbiol*, **135** (2009) 181-5.
- [196] Rahman, K.S., Chowdhury, E.U., Poudel, A., Ruettinger, A., Sachse, K., Kaltenboeck, B., Defining species-specific immunodominant B cell epitopes for molecular serology of *Chlamydia* species, *Clin Vaccine Immunol*, **22** (2015) 539-52.
- [197] Lienard, J., Croxatto, A., Aeby, S., Jatou, K., Posfay-Barbe, K., Gervais, A., Greub, G., Development of a new *Chlamydiales*-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples, *J Clin Microbiol*, **49** (2011) 2637-42.
- [198] Everett, K.D., Hornung, L.J., Andersen, A.A., Rapid detection of the *Chlamydiaceae* and other families in the order *Chlamydiales*: three PCR tests, *J Clin Microbiol*, **37** (1999) 575-80.
- [199] DeGraves, F.J., Gao, D., Kaltenboeck, B., High-sensitivity quantitative PCR platform, *Biotechniques*, **34** (2003) 106-10, 12-5.
- [200] Ehricht, R., Slickers, P., Goellner, S., Hotzel, H., Sachse, K., Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies, *Mol Cell Probes*, **20** (2006) 60-3.
- [201] Menard, A., Clerc, M., Subtil, A., Megraud, F., Bebear, C., de Barbeyrac, B., Development of a real-time PCR for the detection of *Chlamydia psittaci*, *J Med Microbiol*, **55** (2006) 471-3.
- [202] Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., Sachse, K., New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples, *Vet J*, **181** (2009) 145-50.
- [203] Heddema, E.R., Beld, M.G., de Wever, B., Langerak, A.A., Pannekoek, Y., Duim, B., Development of an internally controlled real-time PCR assay for detection of *Chlamydophila psittaci* in the LightCycler 2.0 system, *Clin Microbiol Infect*, **12** (2006) 571-5.
- [204] Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A., Longbottom, D., Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections, *Vet Microbiol*, **135** (2009) 2-21.
- [205] Andersen, A.A., Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test., *J Clin Microbiol*, **29** (1991) 707-11.
- [206] Vanrompay, D., Andersen, A.A., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Serotyping of European isolates of *Chlamydia psittaci* from poultry and other birds, *J Clin Microbiol*, **31** (1993) 134-7.
- [207] Sayada, C., Andersen, A.A., Storey, C., Milon, A., Eb, F., Hashimoto, N., Hirai, K., Elion, J., Denamur, E., Usefulness of omp1 restriction mapping for avian *Chlamydia psittaci* isolate differentiation, *Res Microbiol*, **146** (1995) 155-65.
- [208] Geens, T., Desplanques, A., Van Loock, M., Bonner, B.M., Kaleta, E.F., Magnino, S., Andersen, A.A., Everett, K.D., Vanrompay, D., 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** (2005) 2456-61.
- [209] Pannekoek, Y., Morelli, G., Kusecek, B., Morre, S.A., Ossewaarde, J.M., Langerak, A.A., van der Ende, A., Multi locus sequence typing of *Chlamydiales*: clonal groupings within the obligate intracellular bacteria *Chlamydia trachomatis*, *BMC Microbiol*, **8** (2008) 42.
- [210] Pannekoek, Y., Dickx, V., Beeckman, D.S.A., Jolley, K.A., Keijzers, W.C., Vretou, E., Maiden, M.C.J., Vanrompay, D., van der Ende, A., Multi locus sequence typing of *Chlamydia* reveals an association between *Chlamydia psittaci* genotypes and host species, *PLoS ONE*, **5** (2010) e14179.
- [211] Seth-Smith, H.M., Harris, S.R., Rance, R., West, A.P., Severin, J.A., Ossewaarde, J.M., Cutcliffe, L.T., Skilton, R.J., Marsh, P., Parkhill, J., Clarke, I.N., Thomson, N.R., Genome sequence of the zoonotic pathogen *Chlamydophila psittaci*, *J Bacteriol*, **193** (2011) 1282-3.
- [212] Center for Food Security & Public Health (CFSPH), Psittacosis / Avian Chlamydiosis, (2009).
- [213] Grimes, J.E., Wyrick, P.B., Chlamydiosis (Ornithosis), in: B.W. Calnek (Ed.) Diseases of poultry, 1991.
- [214] Tappe, J.P., Andersen, A.A., Chevillat, N.F., Respiratory and pericardial lesions in turkeys infected with avian or mammalian strains of *Chlamydia psittaci*, *Vet Pathol*, **26** (1989) 386-95.

- [215] Yin, L., Kalmar, I., Chiers, K., Debyser, I., Vanrompay, D., *Chlamydia psittaci* strains from broiler chickens induce histopathological lesions and mortality in SPF chickens, *Bull Vet Inst Pulawy*, **59** (2015) 43.
- [216] Kramer, A., Schwebke, I., Kampf, G., How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review, *BMC Infect Dis*, **6** (2006) 130-.
- [217] Longbottom, D., Coulter, L.J., Animal chlamydioses and zoonotic implications, *J Comp Pathol*, **128** (2003) 217-44.
- [218] Reeve, P., Owen, J., Oriel, J.D., Laboratory procedures for the isolation of *chlamydia trachomatis* from the human genital tract, *J Clin Pathol*, **28** (1975) 910-4.
- [219] Haider, S., Wagner, M., Schmid, M.C., Sixt, B.S., Christian, J.G., Hacker, G., Pichler, P., Mechtler, K., Muller, A., Baranyi, C., Toenshoff, E.R., Montanaro, J., Horn, M., Raman microspectroscopy reveals long-term extracellular activity of *Chlamydiae*, *Mol Microbiol*, **77** (2010) 687-700.
- [220] Newman, C.P., Palmer, S.R., Kirby, F.D., Caul, E.O., A prolonged outbreak of ornithosis in duck processors, *Epidemiol Infect*, **108** (1992) 203-10.
- [221] Vanrompay, D., Cox, E., Volckaert, G., Goddeeris, B., Turkeys are protected from infection with *Chlamydia psittaci* by plasmid DNA vaccination against the major outer membrane protein, *Clin Exp Immunol*, **118** (1999) 49-55.
- [222] Crane, D.D., Carlson, J.H., Fischer, E.R., Bavoil, P., Hsia, R.C., Tan, C., Kuo, C.C., Caldwell, H.D., *Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane protein D is a species-common pan-neutralizing antigen, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103** (2006) 1894-9.
- [223] Liu, S., Sun, W., Chu, J., Huang, X., Wu, Z., Yan, M., Zhang, Q., Zhao, P., Igietseme, J.U., Black, C.M., He, C., Li, Y., Construction of Recombinant HVT Expressing PmpD, and Immunological Evaluation against *Chlamydia psittaci* and Marek's Disease Virus, *PLoS One*, **10** (2015) e0124992.
- [224] Sachse, K., Kuehlewind, S., Ruetzger, A., Schubert, E., Rohde, G., More than classical *Chlamydia psittaci* in urban pigeons, *Vet Microbiol*, **157** (2012) 476-80.
- [225] Zocevic, A., Vorimore, F., Vicari, N., Gasparini, J., Jacquin, L., Sachse, K., Magnino, S., Laroucau, K., A real-time PCR assay for the detection of atypical strains of *Chlamydiaceae* from pigeons, *PLoS ONE*, **8** (2013) e58741.
- [226] Guo, W., Li, J., Kaltenboeck, B., Gong, J., Fan, W., Wang, C., *Chlamydia gallinacea*, not *C. psittaci*, is the endemic chlamydial species in chicken (*Gallus gallus*), *Scientific Reports*, **6** (2016) 19638.
- [227] Hedberg, K., White, K.E., Forfang, J.C., Korlath, J.A., Friendshuh, K.A., Hedberg, C.W., MacDonald, K.L., Osterholm, M.T., An outbreak of psittacosis in Minnesota turkey industry workers: implications for modes of transmission and control, *Am J Epidemiol*, **130** (1989) 569-77.
- [228] Williams, J., Tallis, G., Dalton, C., Ng, S., Beaton, S., Catton, M., Elliott, J., Carnie, J., Community outbreak of psittacosis in a rural Australian town, *Lancet*, **351** (1998) 1697-9.
- [229] Telfer, B.L., Moberley, S.A., Hort, K.P., Branley, J.M., Dwyer, D.E., Muscatello, D.J., Correll, P.K., England, J., McAnulty, J.M., Probable psittacosis outbreak linked to wild birds, *Emerg Infect Dis*, **11** (2005) 391-7.
- [230] Ito, I., Ishida, T., Mishima, M., Osawa, M., Arita, M., Hashimoto, T., Kishimoto, T., Familial cases of psittacosis: possible person-to-person transmission, *Intern Med*, **41** (2002) 580-3.
- [231] McGuigan, C.C., McIntyre, P.G., Templeton, K., Psittacosis outbreak in Tayside, Scotland, December 2011 to February 2012, *Euro Surveill*, **17** (2012) 20186.
- [232] Gelfand, M.S., Cleveland, K.O., Family outbreak of psittacosis with an exhumation-based diagnosis: following in the footsteps of Dr. House, *Am J Med Sci*, **345** (2013) 252-3.
- [233] Rehn, M., Ringberg, H., Runehagen, A., Herrmann, B., Olsen, B., Petersson, A.C., Hjertqvist, M., Kuhlmann-Berenzon, S., Wallensten, A., Unusual increase of psittacosis in southern Sweden linked to wild bird exposure, January to April 2013, *Euro Surveill*, **18** (2013) 20478.
- [234] Wallensten, A., Fredlund, H., Runehagen, A., Multiple human-to-human transmission from a severe case of psittacosis, Sweden, January-February 2013., *Euro Surveill*, **19** (2014).

- [235] Anderson, D.C., Stoesz, P.A., Kaufmann, A.F., Psittacosis outbreak in employees of a turkey-processing plant, *Am J Epidemiol*, **107** (1978) 140-8.
- [236] Irons, J.V., Sullivan, T.D., Rowen, J., Outbreak of psittacosis (ornithosis) from working with turkeys or chickens, *Am J Public Health*, **41** (1951) 931-7.
- [237] Chau, S., Tso, E.Y., Leung, W.S., Fung, K.S., Three cases of atypical pneumonia caused by *Chlamydophila psittaci*, *Hong Kong Med J*, **21** (2015) 272-5.
- [238] Cheng, Y.J., Lin, K.Y., Chen, C.C., Huang, Y.L., Liu, C.E., Li, S.Y., Zoonotic atypical pneumonia due to *Chlamydophila psittaci*: first reported psittacosis case in Taiwan, *J Formos Med Assoc*, **112** (2013) 430-3.
- [239] Dieu Ngan, T.T., Thomas, S., Larsson, M., Horby, P., Diep, N.N., Dat, V.Q., Trung, N.V., Ha, N.H., Rogier van Doorn, H., Van Kinh, N., Wertheim, H.F., First report of human psittacosis in Vietnam, *J Infect*, **66** (2013) 461-4.
- [240] Branley, J.M., Weston, K.M., England, J., Dwyer, D.E., Sorrell, T.C., Clinical features of endemic community-acquired psittacosis, *New Microbes New Infect*, **2** (2014) 7-12.
- [241] Tiong, A., Vu, T., Counahan, M., Leydon, J., Tallis, G., Lambert, S., Multiple sites of exposure in an outbreak of ornithosis in workers at a poultry abattoir and farm, *Epidemiol Infect*, **135** (2007) 1184-91.
- [242] Hinton, D.G., Shipley, A., Galvin, J.W., Harkin, J.T., Brunton, R.A., Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant, *Aust Vet J*, **70** (1993) 174-6.
- [243] Palmer, S.R., Andrews, B.E., Major, R., A common-source outbreaks of ornithosis in veterinary surgeons, *Lancet*, **2** (1981) 798-9.
- [244] Petrovay, F., Balla, E., Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydophila psittaci*, *J Med Microbiol*, **57** (2008) 1296-8.
- [245] Kovacova, E., Majtan, J., Botek, R., Bokor, T., Blaskovicova, H., Solavova, M., Ondicova, M., Kazar, J., A fatal case of psittacosis in Slovakia, January 2006, *Euro Surveill*, **12** (2007) E070802 1.
- [246] Gaede, W., Reckling, K.F., Dresenkamp, B., Kenklies, S., Schubert, E., Noack, U., Irmischer, H.M., Ludwig, C., Hotzel, H., Sachse, K., *Chlamydophila psittaci* infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany, *Zoonoses Public Health*, **55** (2008) 184-8.
- [247] Haas, W.H., Swaan, C.M., Meijer, A., Neve, G., Buchholz, U., Beer, M., van Steenbergen, J.E., Krause, G., A Dutch case of atypical pneumonia after culling of H5N1 positive ducks in Bavaria was found infected with *Chlamydophila psittaci*, *Euro Surveill*, **12** (2007) 3.
- [248] Berk, Y., Klaassen, C.H., Mouton, J.W., Meis, J.F., An outbreak of psittacosis at a bird-fanciers fair in the Netherlands, *Ned Tijdschr Geneesk*, **152** (2008) 1889-92.
- [249] Heddema, E.R., van Hannen, E.J., Duim, B., de Jongh, B.M., Kaan, J.A., van Kessel, R., Lumeij, J.T., Visser, C.E., Vandenbroucke-Grauls, C.M., An outbreak of psittacosis due to *Chlamydophila psittaci* genotype A in a veterinary teaching hospital, *J Med Microbiol*, **55** (2006) 1571-5.
- [250] Speelberg, B., Heddema, E.R., Janssen, N., Scholtes, B.M.J., van Vliet, E.C.J., Verduin, C.M., *Chlamydia psittaci* pneumonia with septic shock and hypoxic respiratory failure, *Neth J Crit Care*, **18** (2014) 18-22.
- [251] Belchior, E., Barataud, D., Ollivier, R., Capek, I., Laroucau, K., de Barbeyrac, B., Hubert, B., Psittacosis outbreak after participation in a bird fair, Western France, December 2008, *Epidemiol Infect*, **139** (2011) 1637-41.
- [252] Laroucau, K., de Barbeyrac, B., Vorimore, F., Clerc, M., Bertin, C., Harkinezhad, T., Verminnen, K., Obeniche, F., Capek, I., Bebear, C., Durand, B., Zanella, G., Vanrompay, D., Garin-Bastuji, B., Sachse, K., Chlamydial infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France, *Vet Microbiol*, **135** (2009) 82-9.
- [253] Carlier, L., Kempf, M., Aaziz, R., Jolivet-Gougeon, A., Laroucau, K., A severe case of pneumopathy in a duck breeder due to *Chlamydia psittaci* diagnosed by 16S rDNA sequencing., *JMM Case Reports*, (2014).
- [254] Pelle-Duporte, D., Gendre, L., Epidémies d'ornithose dans un abattoir de volailles, *Documents pour le médecin du travail*, **85** (2001) 49-57.

- [255] Belchior, E., Bradane, G., Mercier, A.-F., Fortin, N., Ollivier, R., Hubert, B., Investigations de cas humains de psittacose dans deux abattoirs de volailles, Pays de la Loire, Mars-avril 2009., *Epidemiol et santé anim*, **57** (2010) 5-11.
- [256] Fraeyman, A., Boel, A., Van Vaerenbergh, K., De Beenhouwer, H., Atypical pneumonia due to *Chlamydophila psittaci*: 3 case reports and review of literature, *Acta Clin Belg*, **65** (2010) 192-6.
- [257] De Boeck, C., Dehollogne, C., Dumont, A., Spierenburg, M., Heijne, M., Gyssens, I., J, V.D.H., Vanrompay, D., Managing a cluster outbreak of psittacosis in Belgium linked to a pet shop visit in The Netherlands, *Epidemiol Infect*, (2015) 1-7.
- [258] Belchior, E., Ollivier, R., Foyer de cas groupés de psittacose dans un couvoir, Maine-et-Loire, octobre-décembre 2009., 2010.
- [259] de Barbeyrac, B., Obeniche, F., Peuchant, O., Bébéar, C., Méthodes de diagnostic des infections à Chlamydiae : directes et/ou sérodiagnostic ? Que choisir ?, *Journal des Anti-infectieux*, **16** (2014) 185-91.
- [260] Ragnaud, J.M., Dupon, M., Echinard, E., Lacut, J.Y., Aubertin, J., Aspects actuels des infections à *Chlamydia psittaci*. A propos de 32 observations, *Médecine et Maladies Infectieuses*, **15** (1985) 706-13.
- [261] Van Droogenbroeck, C., Van Risseghem, M., Braeckman, L., Vanrompay, D., Evaluation of bioaerosol sampling techniques for the detection of *Chlamydophila psittaci* in contaminated air, *Vet Microbiol*, **135** (2009) 31-7.
- [262] FranceAgriMer, Les filières de l'élevage français, (2014).
- [263] Guérin, J.-L., www.avicampus.fr.
- [264] Thierry, S., Etude de la diversité génétique d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydophila psittaci* chez les oiseaux et mise au point de modèles expérimentaux aviaires., 2011.
- [265] FranceAgriMer, Les fiches FranceAgriMer - Volailles de chair février 2015., (2015).
- [266] FranceAgriMer, Les fiches FranceAgriMer - Oeufs de consommation et ovoproduits février 2015., 2015.
- [267] Bernard, P., Evaluation des expositions à *Chlamydia psittaci* dans la filière canard gras et description des pratiques d'élevage des exploitations suivies., 2013, pp. 160.
- [268] FranceAgriMer, Les fiches FranceAgriMer - Palmipèdes à foie gras février 2015., 2015.
- [269] Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, R.S., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W., The revised classification of eukaryotes., *J Eukaryot Microbiol*, **59** (2012) 429-93.
- [270] Bouyer, S., Différenciation d'*Acanthamoeba castellanii* et rôle dans l'interaction avec *Legionella pneumophila*., 2008.
- [271] Bowers, B., A morphological study of plasma and phagosome membranes during endocytosis in *Acanthamoeba*, *The Journal of cell biology*, **84** (1980) 246-60.
- [272] Thomas, V., Amibes libres de l'environnement : écologie et interactions avec des micro-organismes pathogènes émergents., 2012.
- [273] Schuster, F.L., Levandowsky, M., Chemosensory responses of *Acanthamoeba castellanii*: visual analysis of random movement and responses to chemical signals, *J Eukaryot Microbiol*, **43** (1996) 150-8.
- [274] Sriram, R., Shoff, M., Booton, G., Fuerst, P., Visvesvara, G.S., Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years, *J Clin Microbiol*, **46** (2008) 4045-8.
- [275] Schuster, F.L., Visvesvara, G.S., Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals, *Int J Parasitol*, **34** (2004) 1001-27.
- [276] Liu, H., Ha, Y.R., Lee, S.T., Hong, Y.C., Kong, H.H., Chung, D.I., Genetic diversity of *Acanthamoeba* isolated from ocean sediments, *Korean J Parasitol*, **44** (2006) 117-25.
- [277] Munson, D.A., Paget, T.A., Distribution of *Acanthamoeba* in more and less polluted North Sea coastal sediments, *J Eukaryot Microbiol*, **53 Suppl 1** (2006) S12-4.

- [278] Ettinger, M.R., Webb, S.R., Harris, S.A., McIninch, S.P., G, C.G., Brown, B.L., Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA, *Parasitol Res*, **89** (2003) 6-15.
- [279] Lorenzo-Morales, J., Lindo, J.F., Martinez, E., Calder, D., Figueruelo, E., Valladares, B., Ortega-Rivas, A., Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies, *Ann Trop Med Parasitol*, **99** (2005) 751-8.
- [280] da Silva, M.A., da Rosa, J.A., Isolation of potentially pathogenic free-living amoebas in hospital dust, *Rev Saude Publica*, **37** (2003) 242-6.
- [281] Sawyer, T.K., Free-living pathogenic and nonpathogenic amoebae in Maryland soils, *Appl Environ Microbiol*, **55** (1989) 1074-7.
- [282] Rezaeian, M., Niyiyati, M., Farnia, S., Motevalli Haghi, A., Isolation of *Acanthamoeba* Spp. from Different Environmental Sources., *Iranian J Parasitol*, **3** (2008) 44-7.
- [283] Kingston, D., Warhurst, D.C., Isolation of amoebae from the air, *J Med Microbiol*, **2** (1969) 27-36.
- [284] Lawande, R.V., Recovery of soil amoebae from the air during the harmattan in Zaria, Nigeria, *Ann Trop Med Parasitol*, **77** (1983) 45-9.
- [285] Brown, T.J., Cursons, R.T., Keys, E.A., Amoebae from antarctic soil and water, *Appl Environ Microbiol*, **44** (1982) 491-3.
- [286] Rodriguez Zaragoza, S., Mayzlish, E., Steinberger, Y., Seasonal changes in free-living amoeba species in the root canopy of *Zygophyllum dumosum* in the Negev Desert, Israel, *Microb Ecol*, **49** (2005) 134-41.
- [287] Thomas, V., Loret, J.F., Jousset, M., Greub, G., Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant, *Environ Microbiol*, **10** (2008) 2728-45.
- [288] Stockman, L.J., Wright, C.J., Visvesvara, G.S., Fields, B.S., Beach, M.J., Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA--1990-1992, *Parasitol Res*, **108** (2011) 621-7.
- [289] Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D.S., Greub, G., Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network, *Appl Environ Microbiol*, **72** (2006) 2428-38.
- [290] Barbaree, J.M., Fields, B.S., Feeley, J.C., Gorman, G.W., Martin, W.T., Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*, *Appl Environ Microbiol*, **51** (1986) 422-4.
- [291] Baré, J., Sabbe, K., Van Wichelen, J., van Gremberghe, I., D'hondt, S., Houf, K., Diversity and habitat specificity of free-living protozoa in commercial poultry houses, *Appl Environ Microbiol*, **75** (2009) 1417-26.
- [292] Vaerewijck, M.J., Sabbe, K., Van Hende, J., Bare, J., Houf, K., Sampling strategy, occurrence and diversity of free-living protozoa in domestic refrigerators, *J Appl Microbiol*, **109** (2010) 1566-78.
- [293] Vaerewijck, M.J.M., Sabbe, K., Baré, J., Houf, K., Microscopic and molecular studies of the diversity of free-living protozoa in meat-cutting plants, *Appl Environ Microbiol*, **74** (2008) 5741-9.
- [294] Rivera, F., Galvan, M., Robles, E., Leal, P., Gonzalez, L., Lacy, A.M., Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico, *J Protozool*, **28** (1981) 54-6.
- [295] Napolitano, J.J., Isolation of amoebae from edible mushrooms, *Appl Environ Microbiol*, **44** (1982) 255-7.
- [296] Larkin, D.F., Kilvington, S., Easty, D.L., Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria, *Brit J Ophthalmol*, **74** (1990) 133-5.
- [297] Barbeau, J., Buhler, T., Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines, *Res Microbiol*, **152** (2001) 753-60.
- [298] Dendana, F., Sellami, H., Jarraya, F., Sellami, A., Makni, F., Cheikhrouhou, F., Hachicha, J., Ayadi, A., Free-living amoebae (FLA): detection, morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* genus in the hydraulic system of an haemodialysis unit in Tunisia, *Parasite*, **15** (2008) 137-42.
- [299] Schuster, F.L., Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas, *Clin Microbiol Rev*, **15** (2002) 342-54.

- [300] Imam, A.M., Mahgoub, E.S., Blindness due to *Acanthamoeba*: first case report from Sudan, *Int J Health Sci*, **2** (2008) 163-6.
- [301] Rivera, F., Medina, F., Ramirez, P., Alcocer, J., Vilaclara, G., Robles, E., Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients, *Environ Res*, **33** (1984) 428-40.
- [302] Santos, L.C., Oliveira, M.S., Lobo, R.D., Higashino, H.R., Costa, S.F., van der Heijden, I.M., Giudice, M.C., Silva, A.R., Levin, A.S., *Acanthamoeba* spp. in Urine of Critically Ill Patients, *Emerg Infect Dis*, **15** (2009) 1144-6.
- [303] Lorenzo-Morales, J., Lopez-Darias, M., Martinez-Carretero, E., Valladares, B., Isolation of potentially pathogenic strains of *Acanthamoeba* in wild squirrels from the Canary Islands and Morocco, *Exp Parasitol*, **117** (2007) 74-9.
- [304] La Scola, B., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., de Lamballerie, X., Drancourt, M., Birtles, R., Claverie, J.M., Raoult, D., A giant virus in amoebae, *Science*, **299** (2003) 2033.
- [305] Abrahao, J.S., Dornas, F.P., Silva, L.C., Almeida, G.M., Boratto, P.V., Colson, P., La Scola, B., Kroon, E.G., *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* and other giant viruses: an open field to outstanding discoveries., *Virol J*, **11** (2014) 120.
- [306] Colson, P., Yutin, N., Shabalina, S.A., Robert, C., Fournous, G., La Scola, B., Raoult, D., Koonin, E.V., Viruses with more than 1,000 genes: *Mamavirus*, a new *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* strain, and reannotation of *Mimivirus* genes, *Genome Biol Evol*, **3** (2011) 737-42.
- [307] Yoosuf, N., Yutin, N., Colson, P., Shabalina, S.A., Pagnier, I., Robert, C., Azza, S., Klose, T., Wong, J., Rossmann, M.G., La Scola, B., Raoult, D., Koonin, E.V., Related giant viruses in distant locations and different habitats: *Acanthamoeba polyphaga moumouvirus* represents a third lineage of the *Mimiviridae* that is close to the megavirus lineage, *Genome Biol Evol*, **4** (2012) 1324-30.
- [308] Boyer, M., Yutin, N., Pagnier, I., Barrassi, L., Fournous, G., Espinosa, L., Robert, C., Azza, S., Sun, S., Rossmann, M.G., Suzan-Monti, M., La Scola, B., Koonin, E.V., Raoult, D., Giant *Marseillevirus* highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106** (2009) 21848-53.
- [309] Philippe, N., Legendre, M., Doutre, G., Coute, Y., Poirot, O., Lescot, M., Arslan, D., Seltzer, V., Bertaux, L., Bruley, C., Garin, J., Claverie, J.M., Abergel, C., Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes, *Science*, **341** (2013) 281-6.
- [310] Legendre, M., Bartoli, J., Shmakova, L., Jeudy, S., Labadie, K., Adrait, A., Lescot, M., Poirot, O., Bertaux, L., Bruley, C., Coute, Y., Rivkina, E., Abergel, C., Claverie, J.M., Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111** (2014) 4274-9.
- [311] Mattana, A., Serra, C., Mariotti, E., Delogu, G., Fiori, P.L., Cappuccinelli, P., *Acanthamoeba castellanii* promotion of in vitro survival and transmission of coxsackie b3 viruses, *Eukaryot Cell*, **5** (2006) 665-71.
- [312] Lorenzo-Morales, J., Coronado-Alvarez, N., Martinez-Carretero, E., Maciver, S.K., Valladares, B., Detection of four adenovirus serotypes within water-isolated strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain, *Am J Trop Med Hyg*, **77** (2007) 753-6.
- [313] Danes, L., Cerva, L., Survival of polioviruses and echoviruses in *Acanthamoeba castellanii* cultivated in vitro, *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*, **25** (1981) 169-74.
- [314] Steenbergen, J.N., Shuman, H.A., Casadevall, A., *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98** (2001) 15245-50.
- [315] Gomez-Couso, H., Paniagua-Crespo, E., Ares-Mazas, E., *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*, *Parasitol Res*, **100** (2007) 1151-4.
- [316] Winiecka-Krusnell, J., Dellacasa-Lindberg, I., Dubey, J.P., Barragan, A., *Toxoplasma gondii*: uptake and survival of oocysts in free-living amoebae, *Exp Parasitol*, **121** (2009) 124-31.
- [317] Anand, C.M., Skinner, A.R., Malic, A., Kurtz, J.B., Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *J Hyg-Cambridge*, **91** (1983) 167-78.

- [318] Newsome, A.L., Scott, T.M., Benson, R.F., Fields, B.S., Isolation of an amoeba naturally harboring a distinctive *Legionella* species, *Appl Environ Microbiol*, **64** (1998) 1688-93.
- [319] Barker, J., Humphrey, T.J., Brown, M.W., Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease, *FEMS Microbiol Lett*, **173** (1999) 291-5.
- [320] Saeed, A., Abd, H., Edvinsson, B., Sandstrom, G., *Acanthamoeba castellanii* an environmental host for *Shigella dysenteriae* and *Shigella sonnei*, *Arch Microbiol*, **191** (2009) 83-8.
- [321] Tezcan-Merdol, D., Ljungstrom, M., Winiecka-Krusnell, J., Linder, E., Engstrand, L., Rhen, M., Uptake and replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhyodes*, *Appl Environ Microbiol*, **70** (2004) 3706-14.
- [322] Gaze, W.H., Burroughs, N., Gallagher, M.P., Wellington, E.M., Interactions between *Salmonella typhimurium* and *Acanthamoeba polyphaga*, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles, *Microb Ecol*, **46** (2003) 358-69.
- [323] La Scola, B., Raoult, D., *Afipia felis* in hospital water supply in association with free-living amoebae, *Lancet*, **353** (1999) 1330.
- [324] Thom, S., Warhurst, D., Drasar, B.S., Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae, *J Med Microbiol*, **36** (1992) 303-6.
- [325] Wagner, Y., Noack, B., Hoffmann, T., Jacobs, E., Christian Luck, P., Periodontopathogenic bacteria multiply in the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii*, *Int J Hyg Environ Health*, **209** (2006) 535-9.
- [326] Inglis, T.J., Rigby, P., Robertson, T.A., Dutton, N.S., Henderson, M., Chang, B.J., Interaction between *Burkholderia pseudomallei* and *Acanthamoeba* species results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and escape, *Infect Immun*, **68** (2000) 1681-6.
- [327] Landers, P., Kerr, K.G., Rowbotham, T.J., Tipper, J.L., Keig, P.M., Ingham, E., Denton, M., Survival and growth of *Burkholderia cepacia* within the free-living amoeba *Acanthamoeba polyphaga*, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **19** (2000) 121-3.
- [328] La Scola, B., Raoult, D., Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*, *Clin Microbiol Infect*, **7** (2001) 75-9.
- [329] Cardas, M., Khan, N.A., Alsam, S., *Staphylococcus aureus* exhibit similarities in their interactions with *Acanthamoeba* and ThP1 macrophage-like cells, *Exp Parasitol*, **132** (2012) 513-8.
- [330] Schulz, F., Martijn, J., Wascher, F., Lagkouvardos, I., Kostanjsek, R., Ettema, T.J., Horn, M., A *Rickettsiales* symbiont of amoebae with ancient features, *Environ Microbiol*, (2015).
- [331] Ogata, H., La Scola, B., Audic, S., Renesto, P., Blanc, G., Robert, C., Fournier, P.E., Claverie, J.M., Raoult, D., Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens, *PLoS Genet*, **2** (2006) e76.
- [332] Greub, G., *Parachlamydia acanthamoebae*, an emerging agent of pneumonia, *Clin Microbiol Infect*, **15** (2009) 18-28.
- [333] Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandstrom, G., Forsman, M., Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*, *Appl Environ Microbiol*, **69** (2003) 600-6.
- [334] Dey, R., Hoffman, P.S., Glomski, I.J., Germination and amplification of anthrax spores by soil-dwelling amoebas, *Appl Environ Microbiol*, **78** (2012) 8075-81.
- [335] Adekambi, T., Ben Salah, S., Khlif, M., Raoult, D., Drancourt, M., Survival of environmental *Mycobacteria* in *Acanthamoeba polyphaga*, *Appl Environ Microbiol*, **72** (2006) 5974-81.
- [336] Fritsche, T.R., Horn, M., Wagner, M., Herwig, R.P., Schleifer, K.H., Gautom, R.K., Phylogenetic diversity among geographically dispersed *Chlamydiales* endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp, *Appl Environ Microbiol*, **66** (2000) 2613-9.
- [337] Kahane, S., Dvoskin, B., Mathias, M., Friedman, M.G., Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* survival within amoebal cysts, *Appl Environ Microbiol*, **67** (2001) 4789-95.
- [338] Michel, R., Steinert, M., Zöller, L., Hauröder, B., Henning, K., Free-living Amoebae may serve as hosts for the *Chlamydia*-like bacterium *Waddlia chondrophila* isolated from an aborted bovine foetus., *Acta Protozool*, **43** (2004) 37-42.

- [339] Essig, A., Heinemann, M., Simnacher, U., Marre, R., Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*, *Appl Environ Microbiol*, **63** (1997) 1396-9.
- [340] Coulon, C., Eterpi, M., Greub, G., Collignon, A., McDonnell, G., Thomas, V., Amoebal host range, host-free survival and disinfection susceptibility of environmental *Chlamydiae* as compared to *Chlamydia trachomatis*, *FEMS Immunol Med Microbiol*, **64** (2012) 364-73.
- [341] Iovieno, A., Ledee, D.R., Miller, D., Alfonso, E.C., Detection of bacterial endosymbionts in clinical *acanthamoeba* isolates, *Ophthalmology*, **117** (2010) 445-52, 52 e1-3.
- [342] Wirz, M., Polkinghorne, A., Dumrese, C., Ziegler, U., Greub, G., Pospischil, A., Vaughan, L., Predator or prey? *Chlamydophila abortus* infections of a free-living amoebae, *Acanthamoeba castellanii* 9GU, *Microbes Infect*, **10** (2008) 591-7.
- [343] Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P., Maillard, J.Y., Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality, *FEMS Microbiol Rev*, **34** (2010) 231-59.
- [344] Rahman, M., Abd, H., Romling, U., Sandstrom, G., Mollby, R., *Aeromonas-Acanthamoeba* interaction and early shift to a viable but nonculturable state of *Aeromonas* by *Acanthamoeba*, *J Appl Microbiol*, **104** (2008) 1449-57.
- [345] Evstigneeva, A., Raoult, D., Karpachevskiy, L., La Scola, B., Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33 different bacteria, including four new species and *Streptococcus pneumoniae*, *Microbiology*, **155** (2009) 657-64.
- [346] La Scola, B., Mezi, L., Auffray, J.P., Berland, Y., Raoult, D., Patients in the intensive care unit are exposed to amoeba-associated pathogens, *Infection control and hospital epidemiology*, **23** (2002) 462-5.
- [347] Horn, M., Harzenetter, M.D., Linner, T., Schmid, E.N., Muller, K.D., Michel, R., Wagner, M., Members of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* phylum as intracellular bacteria of *acanthamoebae*: proposal of '*Candidatus Amoebophilus asiaticus*', *Environ Microbiol*, **3** (2001) 440-9.
- [348] La Scola, B., Mallet, M.N., Grimont, P.A., Raoult, D., *Bosea eneeae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das et al. 1996), *Int J Syst Evol Microbiol*, **53** (2003) 15-20.
- [349] Michel, R., Hauröder, B., Isolation of an *Acanthamoeba* strain with intracellular *Burkholderia pickettii* infection, *Zentralbl Bakteriologie*, **285** (1997) 541-57.
- [350] Horn, M., Fritsche, T.R., Gautom, R.K., Schleifer, K.H., Wagner, M., Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*, *Environ Microbiol*, **1** (1999) 357-67.
- [351] Axelsson-Olsson, D., Olofsson, J., Svensson, L., Griekspoor, P., Waldenstrom, J., Ellstrom, P., Olsen, B., Amoebae and algae can prolong the survival of *Campylobacter* species in co-culture, *Exp Parasitol*, **126** (2010) 59-64.
- [352] Snelling, W.J., McKenna, J.P., Lecky, D.M., Dooley, J.S., Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa, *Appl Environ Microbiol*, **71** (2005) 5560-71.
- [353] King, C.H., Shotts, E.B., Jr., Wooley, R.E., Porter, K.G., Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination, *Appl Environ Microbiol*, **54** (1988) 3023-33.
- [354] Winiecka-Krusnell, J., Wreiber, K., von Euler, A., Engstrand, L., Linder, E., Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*, *Scandinavian journal of infectious diseases*, **34** (2002) 253-6.
- [355] Adeleke, A.A., Fields, B.S., Benson, R.F., Daneshvar, M.I., Pruckler, J.M., Ratcliff, R.M., Harrison, T.G., Weyant, R.S., Birtles, R.J., Raoult, D., Halablab, M.A., *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species, *Int J Syst Evol Microbiol*, **51** (2001) 1151-60.
- [356] La Scola, B., Mezi, L., Weiller, P.J., Raoult, D., Isolation of *Legionella anisa* using an amoebic coculture procedure, *J Clin Microbiol*, **39** (2001) 365-6.
- [357] La Scola, B., Birtles, R.J., Greub, G., Harrison, T.J., Ratcliff, R.M., Raoult, D., *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen, *Int J Syst Evol Microbiol*, **54** (2004) 699-703.

- [358] Zhou, X., Elmore, J., Call, D.R., Interactions between the environmental pathogen *Listeria monocytogenes* and a free-living protozoan (*Acanthamoeba castellanii*), *Environ Microbiol*, **9** (2007) 913-22.
- [359] Ly, T.M., Muller, H.E., Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa, *J Med Microbiol*, **33** (1990) 51-4.
- [360] Tomov, A.T., Tsvetkova, E.D., Tomova, I.A., Michailova, L.I., Kassovski, V.K., Persistence and multiplication of obligate anaerobe bacteria in amoebae under aerobic conditions, *Anaerobe*, **5** (1999) 19-23.
- [361] Thomas, V., McDonnell, G., Relationship between *mycobacteria* and amoebae: ecological and epidemiological concerns, *Lett Appl Microbiol*, **45** (2007) 349-57.
- [362] Cirillo, J.D., Falkow, S., Tompkins, L.S., Bermudez, L.E., Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence, *Infect Immun*, **65** (1997) 3759-67.
- [363] Steinert, M., Birkness, K., White, E., Fields, B., Quinn, F., *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls, *Appl Environ Microbiol*, **64** (1998) 2256-61.
- [364] Birtles, R.J., Rowbotham, T.J., Michel, R., Pitcher, D.G., Lascola, B., Alexiou-Daniel, S., Raoult, D., '*Candidatus Odyssella thessalonicensis*' gen. nov., sp. nov., an obligate intracellular parasite of *Acanthamoeba* species, *Int J Syst Evol Microbiol*, **50 Pt 1** (2000) 63-72.
- [365] Hundt, M.J., Ruffolo, C.G., Interaction of *Pasteurella multocida* with free-living amoebae, *Appl Environ Microbiol*, **71** (2005) 5458-64.
- [366] Horn, M., Fritsche, T.R., Linner, T., Gautom, R.K., Harzenetter, M.D., Wagner, M., Obligate bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *beta-Proteobacteria*: proposal of '*Candidatus Procabacter acanthamoebae*' gen. nov., sp. nov, *Int J Syst Evol Microbiol*, **52** (2002) 599-605.
- [367] Michel, R., Burghardt, H., Bergmann, H., *Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital, *Zentralblatt fur Hygiene und Umweltmedizin = International journal of hygiene and environmental medicine*, **196** (1995) 532-44.
- [368] Fritsche, T.R., Horn, M., Seyedirashti, S., Gautom, R.K., Schleifer, K.H., Wagner, M., In situ detection of novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. phylogenetically related to members of the order *Rickettsiales*, *Appl Environ Microbiol*, **65** (1999) 206-12.
- [369] Allombert, J., Vianney, A., Laugier, C., Petry, S., Hebert, L., Survival of *taylorellae* in the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii*, *BMC Microbiol*, **14** (2014) 69.
- [370] Abd, H., Valeru, S.P., Sami, S.M., Saeed, A., Raychaudhuri, S., Sandstrom, G., Interaction between *Vibrio mimicus* and *Acanthamoeba castellanii*, *Environ Microbiol Rep*, **2** (2010) 166-71.
- [371] Laskowski-Arce, M.A., Orth, K., *Acanthamoeba castellanii* promotes the survival of *Vibrio parahaemolyticus*, *Appl Environ Microbiol*, **74** (2008) 7183-8.
- [372] Kaltenboeck, B., Kousoulas, K.G., Storz, J., Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (ompA) genes of the four chlamydial species, *J Bacteriol*, **175** (1993) 487-502.
- [373] Pudjiatmoko, Fukushi, H., Ochiai, Y., Yamaguchi, T., Hirai, K., Phylogenetic analysis of the genus *Chlamydia* based on 16S rRNA gene sequences, *Int J Syst Bacteriol*, **47** (1997) 425-31.
- [374] Le Calvez, T., Trouilhe, M.C., Humeau, P., Moletta-Denat, M., Frere, J., Hechard, Y., Detection of free-living *amoebae* by using multiplex quantitative PCR, *Mol Cell Probes*, **26** (2012) 116-20.
- [375] R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing., 2015.
- [376] Abadia, G., Capek, I., André-Fontaine, G., Laurens, E., Etude de séroprévalence de la chlamydie aviaire chez certains professionnels avicoles en Bretagne et Pays de la Loire, 2001-2002., *BEH*, **27-28** (2006) 204-5.
- [377] Laroucau, K., Thierry, S., Vorimore, F., Blanco, K., Kaleta, E., Hoop, R., Magnino, S., Vanrompay, D., Sachse, K., Myers, G.S.A., Bavoil, P.M., Vergnaud, G., Pourcel, C., High resolution typing of *Chlamydia psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA), *Infect Genet Evol*, **8** (2008) 171-81.

- [378] SPF Santé publique, Production de foie gras, 2014.
- [379] Dickx, V., Vanrompay, D., Zoonotic transmission of *Chlamydia psittaci* in a chicken and turkey hatchery, *J Med Microbiol*, **60** (2011) 775-9.
- [380] Williams, C.J., Sillis, M., Fearne, V., Pezzoli, L., Beasley, G., Bracebridge, S., Reacher, M., Nair, P., Risk exposures for human ornithosis in a poultry processing plant modified by use of personal protective equipment: an analytical outbreak study, *Epidemiol Infect*, **141** (2013) 1965-74.
- [381] Belchior, E., Laroucau, K., de Barbeyrac, B., La psittacose : évolution actuelle, surveillance et investigations en France., *BEH Hors-série*, **38** (2010) 12-5.
- [382] Gosbell, I.B., Ross, A.D., Turner, I.B., *Chlamydia psittaci* infection and reinfection in a veterinarian, *Aust Vet J*, **77** (1999) 511-3.
- [383] Andrews, B.E., Major, R., Palmer, S.R., Ornithosis in poultry workers, *Lancet*, **1** (1981) 632-4.
- [384] Oger, S., Analyse du risque et des expositions à *Chlamydia psittaci*, agent de la psittacose, en milieu professionnel. Etude descriptive et rétrospective dans deux abattoirs de volailles en Vendée., 2014.
- [385] Beatty, W.L., Morrison, R.P., Byrne, G.I., Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis, *Microbiol Rev*, **58** (1994) 686-99.
- [386] Travnicek, M., Cislakova, L., Deptula, W., Stosik, M., Bhide, M.R., Wild pigeons and pheasants-- a source of *Chlamydia psittaci* for humans and animals, *Ann Agric Environ Med*, **9** (2002) 253-5.
- [387] World Organisation for animal health (OIE), Fact sheets - Antimicrobial resistance, 2015.
- [388] World Health Organization (WHO), Global action plan on antimicrobial resistance, 2015.
- [389] Betancourt, L., Rodriguez, F., Phandanouvong, V., Ariza-Nieto, C., Hume, M., Nisbet, D., Afanador-Tellez, G., Van Kley, A.M., Nalian, A., Effect of *Origanum* chemotypes on broiler intestinal bacteria, *Poultry science*, **93** (2014) 2526-35.
- [390] Betancourt, L., Phandanouvong, V., Patino, R., Ariza-Nieto, C., Afanador-Tellez, G., Composition and bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* genus., *Rev Med Vet Zoot*, **59** (2012) 21-31.
- [391] Mahboubi, M., Kazempour, N., Valian, M., Antimicrobial activity of natural Respitol-B and its main components against poultry microorganisms, *Pakistan journal of biological sciences : PJBS*, **16** (2013) 1065-8.
- [392] Sessa, R., Di Pietro, M., De Santis, F., Filardo, S., Ragno, R., Angiolella, L., Effects of *Mentha suaveolens* essential oil on *Chlamydia trachomatis*, *Biomed Res Int*, **2015** (2015) 508071.
- [393] Salin, O., Alakurtti, S., Pohjala, L., Siiskonen, A., Maass, V., Maass, M., Yli-Kauhaluoma, J., Vuorela, P., Inhibitory effect of the natural product betulin and its derivatives against the intracellular bacterium *Chlamydia pneumoniae*, *Biochemical pharmacology*, **80** (2010) 1141-51.
- [394] Alvesalo, J., Vuorela, H., Tammela, P., Leinonen, M., Saikku, P., Vuorela, P., Inhibitory effect of dietary phenolic compounds on *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures, *Biochemical pharmacology*, **71** (2006) 735-41.
- [395] Abdelsayed, S., Ha Duong, N.T., Hai, J., Hemadi, M., El Hage Chahine, J.M., Verbeke, P., Serradji, N., Design and synthesis of 3-isoxazolidone derivatives as new *Chlamydia trachomatis* inhibitors, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **24** (2014) 3854-60.
- [396] Dey, R., Cavalié, L., Vernet, C., Bodennec, J., Pernin, P., The free-living amoeba *Willertia magna*, is particularly resistant to infection by the pathogenic bacteria *Legionella pneumophila*, 2008.

Annexes

Annexe 1 : Protocoles d'extraction de l'ADN avec le kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) issus du « QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook » du 04/2010.

1) Protocole "Buccal Swab Spin Protocol"

Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from buccal swabs using a microcentrifuge. For total DNA purification using a vacuum manifold, see "Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Vacuum Protocol)" on page 40.

Important points before starting

- Due to the increased volume of Buffer AL that is required for the buccal swab protocol, fewer preparations can be performed. Additional Buffer AL can be purchased separately (see Ordering Information on page 71).
- This protocol is recommended for the following swab types: C.E.P. (Omni Swabs from Whatman Bioscience, www.whatman.com), cotton, and DACRON (Daigger, Puritan® applicators with plastic stick and cotton or DACRON tip from Hardwood Products Company, www.hwppuritan.com , or from Hain Diagnostika, www.hain-diagnostika.de).
- To collect a sample, scrape the swab firmly against the inside of each cheek 6 times. Air-dry the swab for at least 2 h after collection. Ensure that the person providing the sample has not consumed any food or drink in the 30 min prior to sample collection.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).

Things to do before starting

- Prepare a 56°C water bath for use in step 3.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 10.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 17.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Place buccal swab in a 2 ml microcentrifuge tube. Add 400 µl (cotton and DACRON swab) or 600 µl (Omni Swab) PBS to the sample.

The Omni Swab is ejected into the microcentrifuge tube by pressing the stem end towards the swab. Cotton or DACRON swabs are separated from the stick by hand or with scissors.

QIAamp Mini spin columns copurify RNA and DNA in parallel when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 µl of an RNase A stock solution (100 mg/ml) should be added to the sample prior to the addition of Buffer AL.

2. Add 20 µl QIAGEN Protease stock solution (or proteinase K) and 400 µl (200 µL) (cotton or DACRON swab) or 600 µl (Omni Swab) Buffer AL to the sample. Mix immediately by vortexing for 15 s.

In order to ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed immediately and thoroughly.

Note: Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

3. Incubate at 56°C for 10 min. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.
4. Add 400 µl (200 µL) (cotton or DACRON swab) or 600 µl (Omni Swab) ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by vortexing. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

5. Carefully apply 700 µl of the mixture from step 4 to the QIAamp Mini spin column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.*

Close each spin column in order to avoid aerosol formation during centrifugation.

6. Repeat step 5 by applying up to 700 µl of the remaining mixture from step 4 to the QIAamp Mini spin column.

7. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.*

8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min.

9. Recommended: Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

10. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 150 µl Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.

Elution with 100 µl buffer increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but may slightly reduce the overall DNA yield. Elution with volumes of less than 100 µl is not recommended as the overall DNA yield decreases dramatically.

A second elution step with the same 150 µl eluate containing the DNA will increase yield significantly. However this is not recommended when using the eluate for PCR.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and placing at –20°C is recommended.

One buccal swab typically yields 0.5–3.5 µg of DNA in 150 µl of buffer (3–23 ng/µl), with A260/A280 ratios of 1.7–1.9 (measured in water).

2) Protocole "Tissues"

Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from tissues using the QIAamp DNA Mini Kit.

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 18).
- Avoid repeated freezing and thawing of stored samples, since this leads to reduced DNA size.
- Transcriptionally active tissues, such as liver and kidney, contain high levels of RNA which will copurify with genomic DNA. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but will not inhibit PCR. If RNA-free genomic DNA is required, include the RNase A digest, as described in step 5a of the protocol.

Things to do before starting

- Equilibrate the sample to room temperature (15–25°C).
- Heat 2 water baths or heating blocks: one to 56°C for use in step 3, and one to 70°C for use in step 5.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 17.
- If a precipitate has formed in Buffer ATL or Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Excise the tissue sample or remove it from storage. Determine the amount of tissue.

Do not use more than 25 mg (10 mg spleen).

Weighing tissue is the most accurate way to determine the amount.

If DNA is prepared from spleen tissue, no more than 10 mg should be used.

The yield of DNA will depend on both the amount and the type of tissue processed.

1 mg of tissue will yield approximately 0.2–1.2 µg of DNA.

2. Cut up (step 2a), grind (step 2b), or mechanically disrupt (step 2c) the tissue sample.

The QIAamp procedure requires no mechanical disruption of the tissue sample, but lysis time will be reduced if the sample is ground in liquid nitrogen (step 2b) or mechanically homogenized (step 2c) in advance.

2a. Cut up to 25 mg of tissue (up to 10 mg spleen) into small pieces. Place in a 1.5 ml microcentrifuge tube, and add 180 µl of Buffer ATL. Proceed with step 3.

It is important to cut the tissue into small pieces to decrease lysis time.

2 ml microcentrifuge tubes may be better suited for lysis.

2b. Place up to 25 mg of tissue (10 mg spleen) in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into 1.5 ml microcentrifuge tube. Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw, and add 180 µl of Buffer ATL. Proceed with step 3.

2c. Add up to 25 mg of tissue (10 mg spleen) to a 1.5 ml microcentrifuge tube containing no more than 80 µl PBS. Homogenize the sample using the TissueRuptor or equivalent rotor–stator homogenizer. Add 100 µl Buffer ATL, and proceed with step 3.

Some tissues require undiluted Buffer ATL for complete lysis. In this case, grinding in liquid nitrogen is recommended. Samples cannot be homogenized directly in Buffer ATL, which contains detergent.

3. Add 20 µl proteinase K, mix by vortexing, and incubate at 56°C until the tissue is completely lysed. Vortex occasionally during incubation to disperse the sample, or place in a shaking water bath or on a rocking platform.

Note: Proteinase K must be used. QIAGEN Protease has reduced activity in the presence of Buffer ATL.

Lysis time varies depending on the type of tissue processed. Lysis is usually complete in 1–3 h. Lysis overnight is possible and does not influence the preparation. In order to ensure efficient lysis, a shaking water bath or a rocking platform should be used. If not available, vortexing 2–3 times per hour during incubation is recommended.

4. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

5. If RNA-free genomic DNA is required, follow step 5a. Otherwise, follow step 5b.

Transcriptionally active tissues, such as liver and kidney, contain high levels of RNA which will copurify with genomic DNA. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but will not inhibit PCR.

5a. First add 4 µl RNase A (100 mg/ml), mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate for 2 min at room temperature. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid before adding 200 µl Buffer AL to the sample.

Mix again by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.

It is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL. In most cases it will dissolve during incubation at 70°C. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

5b. Add 200 µl Buffer AL to the sample, mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.

It is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL, which in most cases will dissolve during incubation at 70°C. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

6. Add 200 µl ethanol (96–100%) to the sample, and mix by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.

It is essential that the sample, Buffer AL, and the ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form on addition of ethanol. It is essential to apply all of the precipitate to the QIAamp Mini spin column. This precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

Do not use alcohols other than ethanol since this may result in reduced yields.

7. Carefully apply the mixture from step 6 (including the precipitate) to the QIAamp Mini spin column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.*

Close each spin column to avoid aerosol formation during centrifugation.

It is essential to apply all of the precipitate to the QIAamp Mini spin column.

Centrifugation is performed at 6000 x g (8000 rpm) in order to reduce noise.

Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the solution has not completely passed through the membrane, centrifuge again at a higher speed until all the solution has passed through.

8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.

Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.*

9. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min.

10. Recommended: Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

11. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 200 µl Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.

12. Repeat step 11.

A 5 min incubation of the QIAamp Mini spin column loaded with Buffer AE or water, before centrifugation, generally increases DNA yield.

A third elution step with a further 200 µl Buffer AE will increase yields by up to 15%.

Volumes of more than 200 µl should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation.

Elution with volumes of less than 200 µl increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces the overall DNA yield (see Table 5, page 26). Eluting with 4 x 100 µl instead of 2 x 200 µl does not increase elution efficiency.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and placing at -20°C is recommended, since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

Yields of DNA will depend both on the amount and the type of tissue processed.

25 mg of tissue will yield approximately 10–30 µg of DNA in 400 µl of water (25–75 ng/µl), with an A260/A280 ratio of 1.7–1.9.

For more information about elution and how to determine DNA yield, length, and purity, refer to pages 25–26 and Appendix A, page 51.

Annexe 2 : Préparation du milieu PYG (Peptone Yeast Glucose)

Préparer tout d'abord le milieu PY (Peptone Yeast)

Pour cela, préparer les solutions stocks suivantes :

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à 0,05 M
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 0,4 M
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 0,25 M
- KH_2PO_4 à 0,25 M
- $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 0,005 M (Attention, ce produit est sensible à la lumière)

Préparer ensuite le mélange PY dans l'ordre suivant afin d'éviter la précipitation (pour 1 L de PY):

Proteose peptone	20,0 g
Yeast extract	1,0 g
Eau déionisée	900,0 mL
Solution de CaCl_2	8,0 mL
Solution de MgSO_4	10,0 mL
Solution de Na_2HPO_4	10,0 mL
Solution de KH_2PO_4	10,0 mL
Na citrate. $2\text{H}_2\text{O}$	1,0 g
Solution de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$	10,0 mL

Ajuster le volume final à 1 L. Le pH doit être de 6,5. Autoclaver la solution à 121°C.

Préparer une solution de glucose à 2 M et la filtrer afin de la stériliser.

Préparer le milieu PYG avant utilisation en ajoutant 5 % de solution de glucose au milieu PY. Il est également possible d'ajouter des antibiotiques afin d'éviter les contaminations bactériennes, par exemple de la Streptomycine à 100 mg/mL et de la Pénicilline à 100 000 U/mL.

Annexe 3 : Résultats du questionnaire soumis aux éleveurs de pré-gavage

Interaction entre deux bandes						
Item	Pratiques observées	Elevages				
		A	B	C	D	E
Nombre d'âges différents sur site	2 âges différents présents en permanence sur l'exploitation	x	x	x	x	x
	1 seul âge					
Intervalles de mises en place	Une mise en place toutes les 7 à 8 semaines	x	x	x	x	x
Gestion du parcours adjacent au bâtiment de desserrage	Utilisation pendant 1 à 3 semaines à partir de 15j voire 4 semaines en fonction de la météo					
Utilisation de chaux : selon les éleveurs épandage de chaux à chaque vide sanitaire ou une fois par an, sur la totalité du parc ou en partie seulement (abords, au niveau des trappes...). L'épandage s'effectue sur une surface humide à environ 0,5 à 1 kg de chaux par m²	Non					
	Oui en totalité à chaque bande		x			
	Oui en partie à chaque bande				x	
	Oui en totalité une fois par an					x
	Oui en partie (tours et entrées) une fois par an	x				
Grattage du parcours en surface	Oui une fois par an au printemps		x		x	
	Non	x				x
Vide sanitaire	5 semaines	x	x		x	
	3 à 5 semaines					x
Parcours desserrage	Utilisation pendant 8 semaines à partir de 4 semaines en rotation de 2 ou 3 parcs de 1ha chacun (très variable en fonction de la surface disponible)					
Utilisation de chaux	Oui en totalité une fois par an	x	x			
	Non			x	x	x
Grattage du parcours en surface	Oui une fois par an au printemps		x	x	x	
	Non	x				x
Vide sanitaire : il est supérieur à 3 semaines dans la plupart des élevages, mais est extrêmement variable (de 0 jours à 8 semaines)	7 à 8 semaines		x			
	6 à 7 semaines				x	
	3 à 6 semaines	x				x
	aucun			x		
Nettoyage et Désinfection du bâtiment démarrage						
Lavage effectué à l'eau froide à la pompe à haute pression avec utilisation d'un détergent moussant alcalin : Agromousse ® appliqué sur les parois et plafond	Application d'une mousse détergente avec un temps de contact de 6h puis lavage à l'eau froide à la pompe à haute pression	x				
	Application d'une mousse détergente avec un temps de contact de 15 min puis lavage à l'eau froide à la pompe à haute pression		x	x	x	x
Désinfection au moyen d'un désinfectant à base d'ammonium quaternaire et de glutaraldéhyde ® dilution 0,5L/100m³ bactéricide par contact en 5 minutes, virucicide en 15 minutes	Oui 2 désinfections, une après le lavage et une avant l'arrivée des canetons suivants				x	
	Oui 1 désinfection après le lavage suivi d'une fumigation (fumagri®, orthophénylphénol)		x			
	Oui 1 désinfection après le lavage	x		x		x
Utilisation de chaux (tout ou partie, fréquence...).	Oui en totalité à chaque bande		x	x	x	x
	Non systématique	x				
Nettoyage du matériel de démarrage Produit conseillé par l'OPA : (hypochlorite de sodium) dilution : 0,5L/HL	Lavage à l'eau et désinfection par trempage une journée avec de l'hypochlorite de sodium		x			
	Lavage à l'eau et désinfection par trempage quelques heures avec de l'hypochlorite de sodium					x
	Lavage à l'eau et désinfection par trempage une journée avec du détergent détartrant acide)	x				
	Lavage eau et désinfection (ammonium quaternaire et glutaraldéhyde) par pulvérisation avec du				x	
	Lavage eau et désinfection par pulvérisation avec de l'hypochlorite de sodium			x		
Nettoyage des Canalisations	Passage d'une base (hypochlorite de sodium) 30 minutes puis rinçage puis d'un détergent détartrant acide 30 minutes				x	
	Passage d'une base (hypochlorite de sodium) 30 minutes à 1 heure	x				
	rincé à l'eau		x	x		x
Vide sanitaire du bâtiment de démarrage	1 semaine	x	x	x		
	2 semaines				x	
	Jusqu'à 3 semaines					x

Nettoyage et désinfection bâtiment desserrage						
Retrait du fumier	Oui		x		x	x
	Non systématique après chaque bande, mais régulier (plus de 2 fois par an)	x				
	Effectué 2 fois par an			x		
Lavage effectué à l'eau froide à la pompe à haute pression	Oui sur toutes les surfaces				x	x
	Non systématique : uniquement l'ensemble des parois		x			
	Non systématique : uniquement le bas des parois	x				
Application d'un détergent moussant alcalin (Agromousse ®) appliqué sur les parois et plafond	Effectué 1 fois par an en totalité			x		
	Oui temps de contact >15 min		x		x	x
	Non	x		x		
Désinfection au moyen d'un désinfectant à base d'ammonium quaternaire et de glutaraldéhyde	Oui 2 désinfections, une après le lavage et une avant l'arrivée des canards				x	
	oui 1 désinfection après le lavage					x
	Effectué une fois par an			x		
Épandage de chaux (tout ou partie, fréquence...). L'épandage s'effectue sur une surface humide à environ 0,5 à 1 kg de chaux par m ²	Jamais	x	x			
	Oui en totalité à chaque bande		x		x	
	Oui totalité à chaque bande sauf si le vide sanitaire est trop court (ça arrive l'hiver)					x
Nettoyage du matériel de desserrage	Non	x		x		
	Lavage systématique à l'eau froide sans désinfection				x	
	Lavage non systématique à l'eau froide sans désinfection	x	x			x
Nettoyage des canalisations	Lavage une fois par an à l'eau puis désinfection avec de l'hypochlorite de sodium en trempage 1/2 journée			x		
	Passage d'une base (hypochlorite de sodium) 30 minutes puis rinçage puis d'un détergent détartrant acide 30 minutes				x	
	Rincé à l'eau sans utilisation de produits	x	x	x		x
Vide sanitaire du bâtiment de desserrage	3 à 4 semaines	x				
	1 semaine					x
	quelques jours		x		x	
	aucun			x		

Interaction entre les animaux d'une même bande						
Item	Pratiques observées	Elevages				
		A	B	C	D	E
Accès à un bâtiment toute la durée d'élevage (été)	Non, à 3 semaines d'âge plus d'abris			x		x
	Non à 5 semaines d'âge plus d'abris				x	
	Parfois non	x				
	Oui toujours		x			
Accès à un bâtiment toute la durée d'élevage (hiver)	Non, à 6 semaines d'âge plus d'abris					x
	Oui toujours	x	x	x	x	
Densité au démarrage (canards/m ²)	12 canards /m ²	x	x			
	14 canards /m ²			x		
	19 canards /m ²				x	x
Quantité de points d'eau disponibles à la mise en place (1 point d'eau disponible pour combien de canetons?)	1 point d'eau pour moins de 100 canetons ou présences de pipettes				x	
	1 point d'eau pour plus de 100 canetons mais moins de 150 canetons		x			
	1 point d'eau pour plus de 150 canetons	x		x		x
Points d'alimentation disponibles à la MEP (1 point d'alimentation disponible pour combien de canetons?)	1 point d'alimentation pour moins de 50 canetons ou présence de chaînes	x			x	
	1 point d'alimentation pour plus de 50 canetons mais moins de 70 canetons		x			
	1 point d'alimentation pour plus de 70 canetons			x		x
Gestion du paillage du bâtiment de démarrage.	Paillage effectué tous les jours	x	x	x	x	x
Mortalité sur les 4 premiers jours %	≤ 0,1 %	x	x	x		
	≤ 0,2 %					x
	de 0,2 à 0,5 %				x	
Densité d'animaux sur le parcours adjacent au bâtiment de desserrage (canards/m ²)	2 canards /m ²	x				
	5 canards /m ²					x
	10 canards /m ²		x		x	
Temps de présence sur le parcours adjacent au bâtiment de desserrage (en semaines)	1 semaine		x			x
	2 semaines	x			x	
Surface du parcours de desserrage disponible par canard (m ² /canards)	30 m ² / canard	x				
	15 m ² / canard			x		
	5 m ² / canard		x		x	x
Temps de présence sur le parcours de desserrage (en semaines)	7 semaines	x			x	
	8 semaines		x			
	9 semaines			x		x
Abreuvoirs disponibles pour 2000 canards	3 abreuvoirs				x	
	4 abreuvoirs	x		x		
	5 abreuvoirs		x			x
Mangeoires disponibles pour 2000 canards	3 mangeoires				x	
	5 mangeoires	x	x	x		
	8 mangeoires					x
Densité dans le bâtiment de desserrage canard/m ²	7 canards /m ²	x		x	x	
	14 canards /m ²		x			
	15 canards /m ²					x
Gestion du paillage du bâtiment de desserrage	Tous les jours	x		x	x	x
	Tous les deux jours		x			

Interaction homme animal						
Item	Pratiques observées	Elevages				
		A	B	C	D	E
Mise en place						
Nombre de personnes présentes lors des manipulations animales	1	x				x
	2		x	x	x	
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	10					
Origine des personnes (entreprise privée, voisins, autres éleveurs).	Éleveurs appartenant à l'exploitation	x	x	x	x	x
	Autres éleveurs de PAG voisins					
	Salariés d'une entreprise privée spécialisée en manipulation de volaille et lapin					
Temps passé lors de l'intervention	1 à 2 heures	x	x	x	x	x
	1/2 journée					
	1 journée ou plusieurs 1/2 journées					
	Plus d'une journée					
Lieu d'intervention (Plein air vs en bâtiment fermé)	En bâtiment fermé	x	x	x	x	x
	En bâtiment avec les portes grandes ouvertes					
	Plein air					
Débecquage simple (concerne que l'élevage C)						
Nombre de personnes présentes lors des manipulations animales	1			x		
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	10					
Origine des personnes (entreprise privée, voisins, autres éleveurs).	Éleveurs appartenant à l'exploitation			x		
	Autres éleveurs de PAG voisins					
	Salariés d'une entreprise privée spécialisée en manipulation de volaille et lapin					
Temps passé lors de l'intervention	1 à 2 heures					
	1/2 journée					
	1 journée ou plusieurs 1/2 journées					
	Plus d'une journée			x		
Lieu d'intervention (Plein air vs en bâtiment fermé)	En bâtiment fermé			x		
	En bâtiment avec les portes grandes ouvertes					
	Plein air					
dégriffage/débecquage						
Nombre de personnes présentes lors des manipulations animales	1					
	2		x	x		
	3					
	4					
	5					
	6	x				x
	7					
	10					
Origine des personnes (entreprise privée, voisins, autres éleveurs).	Éleveurs appartenant à l'exploitation		x	x		
	Autres éleveurs de PAG voisins	x				
	Salariés d'une entreprise privée spécialisée en manipulation de volaille et lapin					x
Temps passé lors de l'intervention	1 à 2 heures					
	1/2 journée	x	x	x		x
	1 journée ou plusieurs 1/2 journées					
	Plus d'une journée					
Lieu d'intervention (Plein air vs en bâtiment fermé)	En bâtiment fermé	x	x	x		x
	En bâtiment avec les portes grandes ouvertes					
	Plein air					

Primo-Vaccination						
Nombre de personnes présentes lors des manipulations animales	1	x		x		
	2		x			
	3					
	4				x	
	5					
	6					x
	7					
	10					
Origine des personnes (entreprise privée, voisins, autres éleveurs).	Éleveurs appartenant à l'exploitation	x	x	x		
	Autres éleveurs de PAG voisins					
	Salariés d'une entreprise privée spécialisée en manipulation de volaille et lapin				x	x
Temps passé lors de l'intervention	1 à 2 heures					
	1/2 journée		x		x	x
	1 journée ou plusieurs 1/2 journées	x				
	Plus d'une journée			x		
Lieu d'intervention (Plein air vs en bâtiment fermé)	En bâtiment fermé		x	x	x	x
	En bâtiment avec les portes grandes ouvertes	x				
	Plein air					
Rappel de vaccination						
Nombre de personnes présentes lors des manipulations animales	1	x		x		
	2		x			
	3					
	4				x	
	5					
	6					x
	7					
	10					
Origine des personnes (entreprise privée, voisins, autres éleveurs).	Éleveurs appartenant à l'exploitation	x	x	x		
	Autres éleveurs de PAG voisins					
	Salariés d'une entreprise privée spécialisée en manipulation de volaille et lapin				x	x
Temps passé lors de l'intervention	1 à 2 heures					
	1/2 journée		x		x	x
	1 journée ou plusieurs 1/2 journées	x				
	Plus d'une journée			x		
Lieu d'intervention (Plein air vs en bâtiment fermé)	En bâtiment fermé				x	
	En bâtiment avec les portes grandes ouvertes			x		x
	Plein air	x	x			
Transfert en gavage						
Nombre de personnes présentes lors des manipulations animales	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6	x			x	x
	7					
	10		x	x		
Origine des personnes (entreprise privée, voisins, autres éleveurs).	Éleveurs appartenant à l'exploitation					
	Autres éleveurs de PAG voisins	x				
	Salariés d'une entreprise privée spécialisée en manipulation de volaille et lapin		x	x	x	x
Temps passé lors de l'intervention	1 à 2 heures	x	x	x	x	x
	1/2 journée					
	1 journée ou plusieurs 1/2 journées					
	Plus d'une journée					
Lieu d'intervention (Plein air vs en bâtiment fermé)	En bâtiment fermé					
	En bâtiment avec les portes grandes ouvertes	x			x	
	Plein air		x	x		x

Annexe 4 : Communications orales

HULIN V, BERNARD P, VORIMORE F, AAZIZ R, CLEVA D, LAROUCAU K. « **Exposition des professionnels à *Chlamydia psittaci* en filière canard mulard** », Journées des Doctorants et post-doctorants ANSES, 27-28 novembre 2014, Maisons-Alfort.

HULIN V, BERNARD P, VORIMORE F, AAZIZ R, CLEVA D, LAROUCAU K. « **Exposition des professionnels à *Chlamydia psittaci* en filière canard mulard** », 6^{ème} Colloque International Francophone de Microbiologie Animale, 15-16 mai 2014, Toulouse.

HULIN V, OGER S, VORIMORE F, AAZIZ R, DE BARBEYRAC B, BERRUCHON J, SACHSE K, LAROUCAU K. « **Exposition des professionnels aux *Chlamydiaceae* : enquête dans deux abattoirs de volailles** », 11^{èmes} Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, 25-26 mai 2015, Tours.

HULIN V, BERNARD P, OGER S, VORIMORE F, AAZIZ R, CLEVA D, DE BARBEYRAC B, BERRUCHON J, ROBINEAU J, DURAND B, SIARKOU V, SACHSE K, LAROUCAU K. « **Chlamydiaceae in French poultry flocks : host preference and workers exposure** », 3rd European Meeting on Animal Chlamydioses, 24-25 septembre 2015, Maisons-Alfort.

Annexe 5 : Communications écrites (posters)

HULIN V, BERNARD P, VORIMORE F, AAZIZ R, CLEVA D, LAROUCAU K. « ***Chlamydia psittaci* zoonotic risk assessment in mule duck flocks** », Journées des Doctorants ABIES, 25-26 février 2014, Paris.

HULIN V, BERNARD P, VORIMORE F, AAZIZ R, CLEVA D, LAROUCAU K. « **Exposition des professionnels à *Chlamydia psittaci* dans la filière « canard mulard** », 10^{ème} congrès national de la Société Française de Microbiologie, 31 mars-1^{er} avril 2014, Paris.

HULIN V, BERNARD P, OGER S, VORIMORE F, AAZIZ R, CLEVA D, DE BARBEYRAC B, BERRUCHON J, ROBINEAU J, DURAND B, SIARKOU V, SACHSE K, LAROUCAU K. « ***Chlamydiaceae* in French poultry flocks : host preference and workers exposure** », 4^{ème} Colloque scientifique international de l'association Med-Vet-Net, 7-9 Octobre 2015, Maisons-Alfort.



Chlamydia psittaci zoonotic risk assessment in mule duck flocks

V. Hulin ⁽¹⁾, P. Bernard ⁽²⁾, F. Vorimore ⁽¹⁾, R. Aaziz ⁽¹⁾, D. Cleva ⁽³⁾, K. Laroucau ⁽¹⁾

(1) University Paris-Est, Anses, Animal Health Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, 94706, Maisons-Alfort, France
 (2) National veterinary school, Oniris, 44300, Nantes, France
 (3) Veterinary office, 85140, L'Oie, France

Introduction

Avian chlamydiosis, or psittacosis for human, is a zoonotic disease caused by *Chlamydia psittaci*. This small bacterium can infect more than 460 bird species from more than 30 orders (Taday & Kaleta, 2003). The infection is mostly asymptomatic in birds but can cause severe atypical pneumonia for humans and leads to death in the most extreme cases. Contamination from birds to human occurs through inhalation of contaminated aerosols and secretions.

In France, most of the human cases are linked to the professional occupation involving. These last years, mule ducks, mainly used for the foie gras production, have been frequently associated to human psittacosis cases (Laroucau *et al.*, 2009).

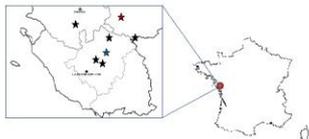
A study led in 2010 (Vorimore, 2010) highlighted a frequent asymptomatic carriage of *C. psittaci* by mule duck flocks in France.

The aim of the present study is to assess the risk exposure for professionals in contact with aerosols generated by infected mule duck flocks.

Material & Methods

Farms

Follow-up of 7 mule duck flocks (1 to 7) in 5 breeding farms from hatchery to slaughterhouse.



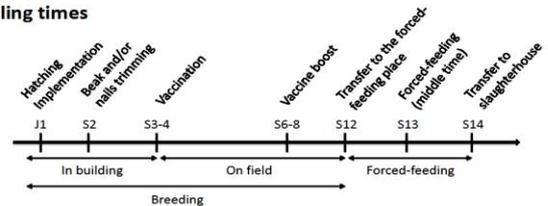
Location of the breeding farms (★), the hatchery (★) and the slaughterhouse (★)

Samples

Air samples and cloacal swabs on 15 randomly selected ducks were taken each sampling time requiring animal handling during the duck breeding process. Samples were submitted to a DNA extraction using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen).



Sampling times



Detection

A *Chlamydiaceae*-specific real-time PCR targeting the 23S rRNA gene was used in this study (Ehricht *et al.*, 2006). Positive samples were all re-analysed with a *C. psittaci*-specific real-time PCR assay (Menard *et al.*, 2006).

Genotyping

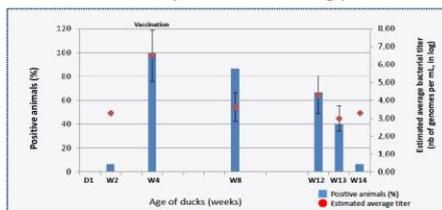
Sequencing of the *ompA* gene from positive samples when possible.

Results

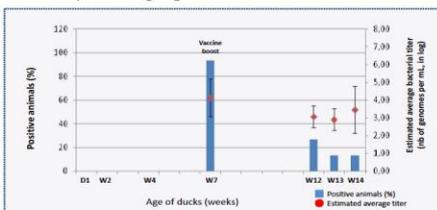
Animals

- No *Chlamydiaceae* were detected in the hatchery (eggs and dead or alive animals).
- Chlamydiaceae* have been found in all followed duck flocks even though all animals were healthy.
- Only the *C. psittaci* species has been detected (genotype E/B).

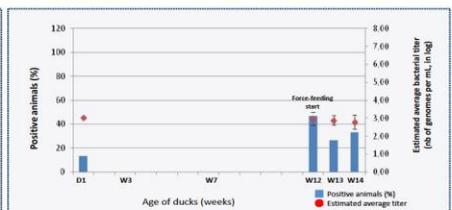
Three different patterns of shedding (results of cloacal swabs) were highlighted.



Pattern 1: High shedding at about 4 weeks of age when ducks are on field and lasting until the forced-feeding period (Flocks 1, 2 and 4).



Pattern 2: High shedding at about 8 weeks of age when ducks are on field (Flocks 3 and 6).



Pattern 3: Late shedding during the force-feeding period and at the slaughtering (Flocks 5 and 7).

- Air samples:** Air samples were positive only when sampling was done in a closed space and when animals were diagnosed as highly shedders (mainly during vaccination)
- Humans:** No related human cases reported

Conclusion

This study highlights a high prevalence of *C. psittaci* in mule ducks flocks. Thus, the exposition for workers is real and the most dangerous case is when animals do not show clinical signs. Furthermore, the flocks followed in this study presented different patterns of shedding. Consequently, it is almost impossible to predict or anticipate the risk of exposition to *C. psittaci*. In this situation, the use of personal protective equipment is highly recommended.

A questionnaire has been filled out by breeders during the study about breeding practices, rotation of flocks, disinfection, cleaning... The results highlighted that cleaning, disinfection and crawl space practices of buildings and fields were the most discriminating practices and could help to explain the shedding differences between flocks.

References:
 P. Bernard (2011) Evaluation des expositions à *Chlamydia psittaci* dans la filière canard gras et description des pratiques d'élevage des exploitations avicoles.
 B. Ehrlich *et al.* (2006) Evaluation of the molecular epidemiology and genotyping of *Chlamydia psittaci* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 304-311.
 A. Laroucau *et al.* (2009) *Chlamydia psittaci* in duck flocks associated with human cases of psittacosis in France. *Emerging Infectious Diseases*, 15: 160-162.
 A. Menard *et al.* (2006) Genotyping of *Chlamydia psittaci* by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 41-45.
 A. Vorimore *et al.* (2010) Shedding sites of exposure to an outbreak of psittacosis in workers at a poultry abattoir and farm. *Eurosurveillance*, 15(19): 19344-19349.
 F. Vorimore (2010) *Chlamydia psittaci* in duck flocks associated with human cases of psittacosis in France. *Emerging Infectious Diseases*, 16: 160-162.



Exposition des professionnels à *Chlamydia psittaci* dans la filière « canard mulard »

V. Hulin ⁽¹⁾, P. Bernard ⁽²⁾, F. Vorimore ⁽¹⁾, R. Aaziz ⁽¹⁾, D. Cleva ⁽³⁾, K. Laroucau ⁽¹⁾

(1) Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de santé animale, Unité zoonoses bactériennes, 94706, Maisons-Alfort, France
(2) Ecole nationale vétérinaire, Oniris, 44300, Nantes, France
(3) Cabinet vétérinaire, 85140, L'Olé, France

Introduction

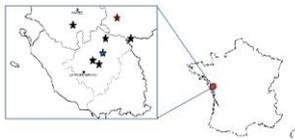
La chlamydie aviaire, ou psittacose pour les humains, est une zoonose causée par *Chlamydia psittaci*. Cette petite bactérie intracellulaire obligatoire peut infecter plus de 460 espèces d'oiseaux parmi 30 ordres différents (Taday & Kaleta, 2003). L'infection est principalement asymptomatique chez l'animal mais peut causer de graves pneumopathies atypiques chez l'Homme et mener à la mort dans les cas les plus graves. Les transmissions de l'animal à l'Homme se fait par inhalation d'aérosols contaminés ou de sécrétions.

La majorité des cas humains en France sont liés à une exposition régulière à des oiseaux, principalement dans le cadre de l'activité professionnelle. L'espèce principalement mise en cause dans les sévères cas humains recensés ces dernières années est le canard mulard, hybride stérile utilisé pour la production du foie gras (Laroucau *et al.*, 2009). Une étude menée en 2010 (Vorimore, 2010) a permis de mettre en évidence un portage asymptomatique fréquent de *C. psittaci* dans les lots de canards mulard en France. L'objectif de la présente étude est d'appréhender le risque pour les professionnels exposés aux aérosols contaminés générés par les lots de canards mulard.

Matériel & Méthodes

Elevages

Suivi de 7 lots de canards mulards (numérotés de 1 à 7) dans 5 élevages, du couvoir à l'abattoir.



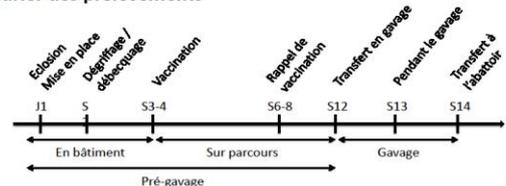
Localisation des élevages (A), du couvoir (B) et de l'abattoir (C)

Prélèvements

Prélèvements d'air et écouillons cloacaux sur 15 canards sélectionnés au hasard dans chaque lot. Prélèvements effectués à chaque intervention de l'Homme. Extraction d'ADN à partir des prélèvements avec le QIAamp DNA mini kit (Qiagen).



Calendrier des prélèvements



Détection

- 1) Tous les échantillons sont soumis à une PCR en temps réel spécifique des *Chlamydiaceae* ciblant le gène 23S rRNA (Ehrlich *et al.*, 2006).
- 2) Tous les échantillons positifs sont ré-analysés avec une PCR en temps réel spécifique de *C. psittaci* (Menard *et al.*, 2006).

Génotypage

Séquençage du gène *ompA* des échantillons positifs lorsque cela est possible

Résultats

Animaux

- Aucune *Chlamydiaceae* n'a été détectée dans les prélèvements du couvoir (œufs et animaux vivants ou morts avant l'éclosion).
- Des *Chlamydiaceae* ont été détectées dans tous les lots suivis alors même qu'aucun animal ne présentait de signes cliniques.
- Seule l'espèce *C. psittaci* a été détectée (génotype E/B).

Trois schémas d'excrétion différents (résultats des écouillons cloacaux) ont été observés.

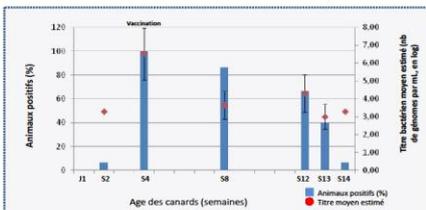


Schéma 1 : Pic d'excrétion à environ 4 semaines lorsque les canards sortent sur parcours et qui se poursuit jusqu'à l'abattage (Lots 1, 2 et 4).

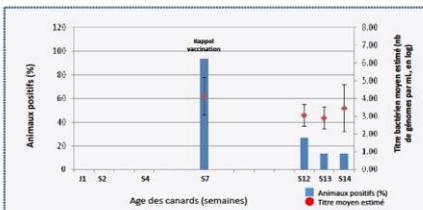


Schéma 2 : Forte excrétion à environ 8 semaines alors que les canards sortent sur parcours (Lots 3 et 6).

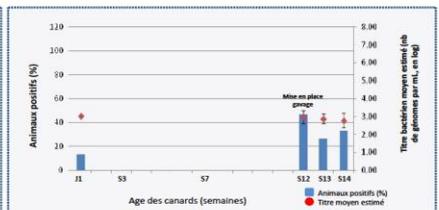


Schéma 3 : Excrétion tardive lors du gavage et de l'abattage (Lots 5 et 7).

- **Prélèvements d'air :** Les prélèvements d'air se sont révélés positifs lorsque les prélèvements étaient effectués dans un endroit clos et que les animaux étaient fortement excréteurs (principalement lors de la vaccination)
- **Humains :** Aucun cas humain en relation avec cette étude n'a été recensé

Conclusion

Cette étude a permis de confirmer la forte prévalence de *C. psittaci* en élevages de canards mulard. De ce fait, l'exposition des employés est réelle et d'autant plus dangereuse que le portage par les animaux est le plus souvent asymptomatique. Les lots suivis dans cette étude présentaient différents schémas d'excrétion soulignant la difficulté de prédire ou d'anticiper le risque d'exposition à la bactérie. Dans ce contexte, l'utilisation d'équipements de protection individuelle (EPI) adéquats est fortement recommandée.

Un questionnaire soumis aux éleveurs durant cette étude concernant leurs pratiques d'élevages (rotation des lots, mesures sanitaires, ...) a mis en évidence que les pratiques de désinfection et de vide sanitaire des bâtiments et des parcours étaient les plus discriminantes et pourraient aider à expliquer les différences d'excrétion des lots.

Références bibliographiques:
1. Bernard (2012) Caractérisation des expositions à *Chlamydia psittaci* dans le réseau canard gras et description des pratiques d'élevage des exploitants isolés.
2. Vorimore et al. (2010) Chlamydiae in wild aquatic birds: a review of their distribution, ecology and genetic diversity. *Journal of Avian Medicine* 15(1): 1-14.
3. Laroucau et al. (2009) Chlamydia infection in wild waterfowl and human cases of psittacosis in France. *Emerging Infectious Diseases* 15(10): 1881-1884.
4. Vorimore et al. (2008) Distribution of wild waterfowl in the European continent and their role as reservoirs of *Chlamydia psittaci*. *Journal of Avian Medicine* 13(1): 1-10.
5. Young et al. (2007) Outbreak of disease in a population of wild waterfowl in southern Australia associated with *Chlamydia psittaci*. *Emerging Infectious Diseases* 13(10): 1534-1538.
6. Vorimore (2010) Caractérisation de la filière canard gras en France: à l'attention des professionnels de santé publique.

Chlamydiaceae in French poultry flocks: host preference and workers exposure

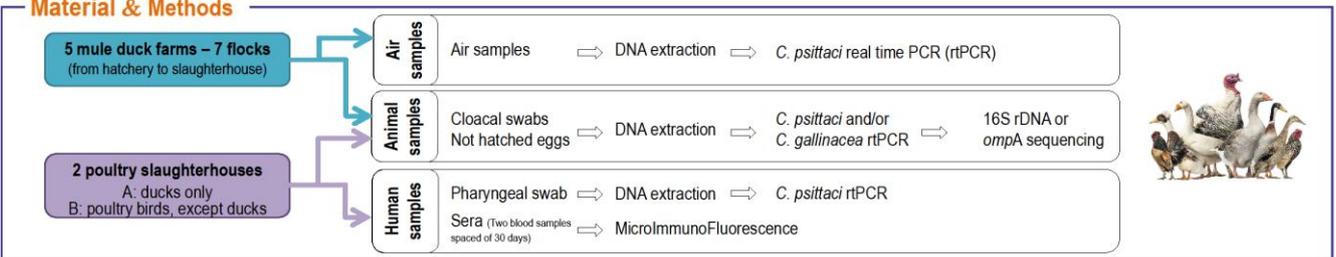


Hulin V¹, Bernard P², Oger S³, Vorimore F¹, Aaziz R¹, Cléva D⁴, de Barbeyrac B⁵, Berruchon J³, Robineau J⁶, Durand B⁷, Siarkou V⁸, Sachse K⁷, Laroucau K¹

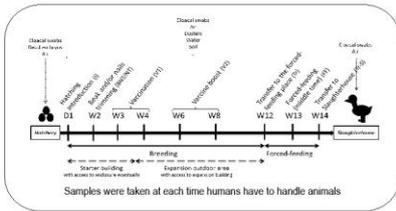
¹ Anses, Animal Health Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, Maisons-Alfort, France - ² National Veterinary School, Oniris, Nantes, France - ³ Regional hospital, Les Oudairies, La Roche-sur-Yon, France - ⁴ Veterinary practice, L'Oie, France - ⁵ National Reference Center for Chlamydia, University of Bordeaux, Bordeaux, France - ⁶ SAS Breheret, La Poitevineire, France - ⁷ University Paris-Est, Anses, Animal Health Laboratory, Epidemiology Unit, Maisons-Alfort, France - ⁸ Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece - ⁹ Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), Jena, Germany

Avian chlamydiosis is a factor of economic loss to the poultry industry as well as a risk for zoonotic transmission to human. *Chlamydia psittaci* is the primary avian chlamydial pathogen. Although being mainly asymptomatic in birds, it can cause a disease called "psittacosis" in humans, with severe atypical pneumonia that leads to death in the most severe cases. Persons affected are mainly those whose occupations put them in regular contact with birds, and a number of recent reports in France have confirmed that most of the human cases seemed to be linked to poultry. Currently there is evidence suggesting that avian chlamydiosis in poultry involves a new chlamydial agent, namely *C. gallinacea*. In order to evaluate the presence of *Chlamydiaceae* in poultry and the exposure of workers, surveys were conducted on seven mule duck flocks and in two French poultry slaughterhouses.

Material & Methods

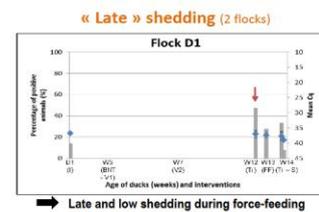
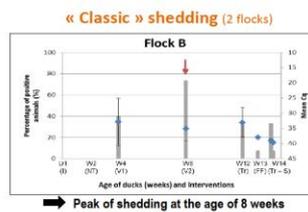
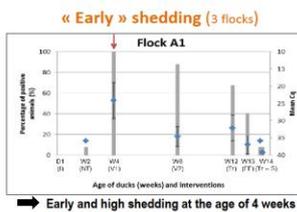


Follow up in mule duck farms



- 3 shedding patterns identified
- Shedder flocks mainly in farms, without clinical signs
- Only *C. psittaci*
- Air samples mainly positive when animals are highly shedders

unpredictable & invisible exposure of professionals to *C. psittaci*



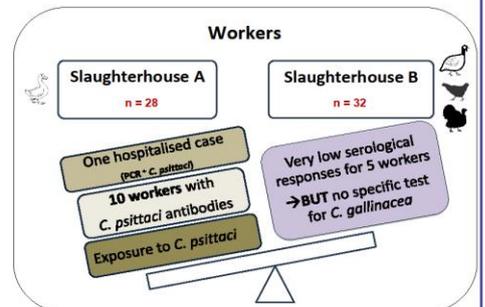
Slaughterhouses

Poultry birds						
Slaughterhouse	Species	Nb of flocks	Negative flocks	Positive flocks (at least one positive animal)	Including highly positive flocks (20% of positive animals with low Cq values)	Detected species
A	Fat duck	23	8	15	2	<i>C. psittaci</i> + atypical <i>Chlamydia</i>
	Thin duck	15	7	8	-	
	TOTAL	38	15	23 (60%)	2 (5%)	
B	Chicken	20	7	13	2	<i>C. gallinacea</i>
	Guinea fowl	8	3	5	-	
	Turkey	1	1	-	-	
	Rooster	1	1	-	-	
	TOTAL	35	12	23 (66%)	3 (7%)	

→ Majority of positive flocks, some highly positive flocks
→ *C. psittaci* is predominant in ducks
→ Atypical *Chlamydia* detected in two ducks flocks from the same farm (16S rDNA sequences almost identical to a *Chlamydia* detected in seabirds)

→ Majority of positive flocks, some highly positive flocks
→ Only *C. gallinacea*

- Host preference: Ducks (*C. psittaci*) - Other poultry species (*C. gallinacea*)
- Frequent worker exposure to *C. psittaci* and *C. gallinacea*



Conclusion

- host preference of *C. psittaci* and *C. gallinacea* for the ducks or other poultry species, respectively, in French flocks, and
- permanent but invisible exposure to *C. psittaci* for workers during all the poultry breeding process stages.

La chlamydie aviaire, causée par la bactérie *Chlamydia psittaci*, représente un risque zoonotique important. L'infection chez l'animal est principalement asymptomatique, mais chez l'Homme elle peut entraîner des pneumopathies atypiques sévères et causer la mort dans les cas les plus graves. Les personnes infectées sont principalement celles exposées régulièrement à des oiseaux, particulièrement dans le cadre professionnel. En France, de nombreux cas humains sont liés à une exposition à des canards Mulard, espèce utilisée pour la production du foie gras. Afin d'évaluer la prévalence des *Chlamydiaceae* chez les volailles et de caractériser les souches circulantes, des suivis ont été réalisés à différents stades de l'élevage (couvoir, pré-gavage et gavage pour la filière canard, et abattoirs impliqués dans l'abattage de différentes espèces aviaires). Des prélèvements d'air et de poussières ainsi que des suivis sérologiques et biologiques de personnels volontaires ont été effectués en parallèle afin d'évaluer l'exposition des professionnels travaillant au contact des volailles. Des prélèvements environnementaux ainsi que des essais *in vitro* visant à étudier la survie de *C. psittaci* ont été réalisés afin de tenter de mieux caractériser les voies de contamination des oiseaux, ce qui pourrait, à terme, permettre de maîtriser le risque de contamination par *C. psittaci* chez l'animal et donc de réduire l'exposition des professionnels. Les résultats ont démontré une prévalence importante de *C. psittaci* chez le canard Mulard, au contraire des autres volailles qui hébergent très majoritairement *C. gallinacea*. L'exposition des professionnels aux *Chlamydia* est réelle, tout au long du processus d'élevage des volailles, mais plus particulièrement en élevages de canards Mulard et à l'abattoir, aussi il convient pour les professionnels de se protéger à chaque contact avec les animaux. L'hypothèse d'une contamination environnementale des animaux se fait de plus en plus claire, avec notamment la mise en évidence d'un lien existant entre les procédures de nettoyage et désinfection et l'excrétion des canards, la description de la survie de *C. psittaci* en dehors de tout hôte vivant, ou encore la mise en évidence d'une possible survie de *C. psittaci* au sein d'*A. castellanii*. La mise au point de moyens de lutte efficaces permettant de réduire voire de supprimer l'excrétion chez les volailles est également nécessaire, dans le but de diminuer l'exposition des professionnels.

Mots clés : *Chlamydiaceae*, *C. psittaci*, psittacose, chlamydie, canard Mulard, volailles, *C. gallinacea*, abattoir, couvoir, amibe, survie

Circulation of *Chlamydiaceae* in poultry industries, worker exposure and study of the survival of *Chlamydia psittaci*

Avian chlamydiosis is a factor of economic loss to the poultry industry as well as a risk for zoonotic transmission to human. *Chlamydia psittaci* is the primary avian chlamydial pathogen with zoonotic potential. Although being mainly asymptomatic in birds, it can cause a disease called "psittacosis" in humans, with severe atypical pneumonia that leads to death in the most severe cases. Persons affected are mainly those whose occupations put them at risk of exposure, and a number of recent reports in France have confirmed that most of the human cases seemed to be linked to poultry, especially mule ducks. Currently there is evidence suggesting that avian chlamydiosis in poultry involves a new chlamydial agent, namely *C. gallinacea*. In order to evaluate the presence of *Chlamydiaceae* in poultry and the exposure of workers, we conducted four studies in the poultry industries, in duck hatchery, breeding farms and slaughterhouse, as well as a study in two poultry slaughterhouses including samples from voluntary workers. Results showed an important asymptomatic carriage of *C. psittaci* by mule ducks and a real, invisible and unpredictable exposure of workers. The species *C. gallinacea* was really prevalent in poultry other than ducks and we still ignore its impact on human. Contamination of animals on farm seems to be mainly made via the environment. *In vitro* studies have been done to examine the survival of *C. psittaci* as a function of temperature in a non-nutritive medium and showed that viable bacteria were still detectable after two months. Finally, the possible interactions between *C. psittaci* and an amoeba, *Acanthamoeba castellanii*, were studied and seem to show that the bacteria was able to enter the amoeba but we still ignore if it can survive or not.

Key words : *Chlamydiaceae*, *C. psittaci*, psittacosis, chlamydiosis, mule duck, poultry, *C. gallinacea*, slaughterhouse, hatchery, amoeba, survival