



Etude de la diversité génotypique et phénotypique de la bactérie *Coxiella burnetti* chez les ruminants domestiques et les chevaux en France

Aurélien Joulié

► To cite this version:

Aurélien Joulié. Etude de la diversité génotypique et phénotypique de la bactérie *Coxiella burnetti* chez les ruminants domestiques et les chevaux en France. Agronomie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC055 . tel-01781700

HAL Id: tel-01781700

<https://theses.hal.science/tel-01781700>

Submitted on 30 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**École doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement de
Clermont-Ferrand - Université Blaise Pascal**

Thèse

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES

(SPÉCIALITÉ : ÉPIDÉMIOLOGIE MOLÉCULAIRE)

Soutenue publiquement le 13 octobre 2017

Étude de la diversité génotypique et phénotypique de la bactérie *Coxiella burnetii* chez les ruminants domestiques et les chevaux en France

Joulié Aurélien

Directrice de thèse : **Dr Jourdain Elsa**

Co-directrice de thèse : **Pr Leblond Agnès**

Co-encadrants : **Dr Sidi-Boumedine Karim & Dr Rousset Elodie**

Devant les membres du jury composé de :

Rapporteurs	David Fretin , Directeur de Recherche au Coda-Cerva de Bruxelles Pierre-Édouard Fournier , Professeur à la faculté de Médecine – Université Aix-Marseille
Examineurs	Emmanuelle Gilot-Fromont , Professeur à VetAgro Sup Lyon Anne Touratier , Chercheur - Vétérinaire à la FNGDS à Paris David Biron , Chercheur au CNRS - Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand
Directrices de thèse	Elsa Jourdain , Chargée de Recherche à l'INRA Auvergne-Rhône-Alpes de Theix Agnès Leblond , Professeur à VetAgro Sup Lyon
Encadrant de thèse	Karim Sidi-Boumedine , Chargé de projet de Recherche à l'ANSES de Sophia Antipolis

Unités d'accueil : UMR0346 - Épidémiologie des Maladies Animales et Zoonotiques, INRA Auvergne-Rhône-Alpes, Route de Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle & VetAgro Sup, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy L'Etoile / Unité fièvre Q animale, ANSES Sophia Antipolis, 105 Route des Chappes, 06902 Sophia Antipolis.

Étude de la diversité génotypique et phénotypique de la bactérie *Coxiella burnetii* chez les ruminants domestiques et les chevaux en France

Soutenue publiquement le 13 octobre 2017

À VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon

par

Aurélien Joulié

Né le 28 novembre 1989

Directrice de thèse : **Dr Jourdain Elsa**

Co-directrice de thèse : **Pr Leblond Agnès**

Co-encadrants : **Dr Sidi-Boumedine Karim & Dr Rousset Elodie**

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AOP	Appellation d'origine protégée
BSL3	Biosafety Level 3
<i>C. burnetii</i>	<i>Coxiella burnetii</i>
CNR	Centre National de Référence
cm	centimètres
°C	degrés Celsius
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA	Ethidium monoazide
EpiA	Épidémiologie des maladies animales et zoonotiques
FAM	6-Carboxyfluorescein
GE/ml	Génomes équivalents par millilitre
GDS	Groupement de défense sanitaire
HGDI	Index de diversité de Hunter-Gaston
HVE	Herpès virus équin
<i>icd</i>	isocitrate déshydrogénase
Ig	Immunoglobuline
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
i. p	Intra-péritonéal
IS	Séquence d'insertion
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
Lignées cell.	Lignées cellulaires macrophagiques
LCV	Forme en large cell variant
LNR	Laboratoire National de Référence
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lavage trachéal
MB	Mise bas
MGB	Minor Groove Binder

ml	Millilitre
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MLVA	Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis
MOI	Multiplicity of Infection
MST	Multispacer Sequence Typing
MV	Mucus vaginal
NM	Nine Mile RSA 493
OSCAR	Observatoire et suivi des causes d'avortements chez les ruminants
pb	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
p. i	post-infection
PMA	Propidium Monoazide
qPCR	PCR quantitative
RESPE	Réseau d'épidémio-surveillance en pathologie équine
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rt-PCR	PCR temps-réel
SCV	Small Cell Variant
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SFT	Cellules de thymus de moutons
µg	micro-grammes
µl	micro-litres
UMR	Unité mixte de recherche
VNTR	répétition en tandem polymorphe

Résumé

La fièvre Q est une zoonose de répartition mondiale due à une bactérie intracellulaire stricte, *Coxiella burnetii*. Les ruminants domestiques contaminent l'environnement en excréant la bactérie principalement dans les produits de parturition, le mucus vaginal et les fèces. L'Homme et l'animal s'infectent ensuite par inhalation de pseudo-spores circulantes dans l'environnement.

Des enjeux de santé publique et vétérinaires ont ainsi motivés la mise en place de ce projet de thèse afin de mieux maîtriser les infections par *C. burnetii* dans les élevages. Les objectifs de ce travail étaient de produire des connaissances épidémiologiques descriptives sur : (a) la dynamique de circulation de *C. burnetii* en élevage ovin naturellement infecté ; (b) la diversité génotypique des souches de *C. burnetii* circulantes dans les élevages de ruminants domestiques en France ; (c) la diversité phénotypique de ces souches *via* l'utilisation de deux modèles de virulence, un *in vivo* et un *in vitro* ; et (d) l'implication du cheval dans l'épidémiologie de la fièvre Q, en étudiant son exposition à *C. burnetii* ainsi qu'une potentielle symptomatologie.

Le suivi longitudinal réalisé en élevage ovin a permis de fournir des indicateurs pertinents à utiliser pour évaluer rapidement le risque de transmission de *C. burnetii* en contexte infectieux, en termes de lots d'animaux, d'outils diagnostics ou encore de périodes d'échantillonnage à privilégier. Par ailleurs, nous avons également identifié trois grands clusters génotypiques de souches circulantes dans les élevages de ruminants domestiques en contexte d'avortement fièvre Q en France. Deux clusters génotypiques regroupent majoritairement les petits ruminants, dont un principalement les ovins et l'autre les caprins. Le troisième cluster génotypique est composé quasi-exclusivement de bovins. Nous avons montré que le gène IS1111 impacte significativement la diversité génotypique MLVA observée. Nous avons également montré qu'en plus d'une spécificité d'espèce, les géotypes circulants en France sont stables d'un point de vue spatio-temporel. Pour l'étude phénotypique, nous avons mis au point deux modèles d'infection, l'un *in vivo* par inoculation dans le coussinet plantaire de souris mâle CD1 et l'autre *in vitro* par infection de deux lignées cellulaires macrophagiques : l'une bovine (SV40) et l'autre ovine (MoCl4). Ces modèles nous ont permis d'identifier 4 clusters phénotypiques, qui n'étaient pas systématiquement corrélés aux trois clusters génotypiques, identifiés *in vivo* à partir de l'analyse de la charge bactérienne dans la rate de souris, ni aux cinétiques de multiplication de *C. burnetii* observés *in vitro*. Enfin, les séroprévalences obtenues chez le cheval dans une zone considérée hyperendémique pour l'Homme (Camargue et Plaine de La Crau) suggèrent que les chevaux sont exposés à la fièvre Q dans cette région et

pourrait éventuellement être utilisés comme des indicateurs pertinents du risque zoonotique. Néanmoins, nos résultats ne nous permettent pas de conclure sur les formes cliniques potentiellement associées à la fièvre Q chez le cheval.

À l'avenir, les résultats obtenus dans ce travail de thèse permettront une meilleure compréhension de la dynamique de circulation et des conséquences de l'infection par *C. burnetii* en élevages de ruminants domestiques et de chevaux. Ces données permettront *in fine* d'améliorer la surveillance, le diagnostic ainsi que la mise en œuvre de mesures de gestion sanitaire de la fièvre Q en santé publique et vétérinaire.

Mots clés : Fièvre Q, brebis, vaches, chèvres, chevaux, MLVA, virulence, surveillance

Summary

Q fever is a worldwide zoonosis, due to a strict intracellular bacterium: *Coxiella burnetii*. Domestic ruminants mainly shed the bacteria in parturition products, vaginal mucus and feces. Humans and animals infect by inhalation of circulating pseudo-spores into the environment. Public and veterinary health issues therefore motivated the implementation of this PhD project in order to better control *C. burnetii* infections on farms. The objectives of this thesis were to provide descriptive epidemiological findings about: (a) circulation dynamics of *C. burnetii* in a naturally infected flock of sheep; (b) the genotypic diversity of circulating *C. burnetii* strains on domestic ruminant farms in France; (c) the phenotypic diversity of these strains as demonstrated by the use of two virulence models, one *in vivo* and one *in vitro*; and (d) the involvement of horses in the epidemiology of *C. burnetii*, by studying their exposure and a potential symptomatology.

Longitudinal follow-up in a flock of sheep provided relevant tools to rapidly assess the risk of *C. burnetii* transmission when a flock was identified as infected, in terms of animal pens, diagnostic tools, or sampling periods to be preferred. We also identified three main genotypic groups of circulating strains in domestic ruminant farms in France where Q fever abortion were recorded. Two genotypic groups mainly included small ruminants, with one group mainly composed of sheep and the other mainly composed of goats. The third genotypic group was comprised almost exclusively of cattle. We have shown that the IS1111 gene significantly impacts the genotypic MLVA diversity observed. In addition to this species specificity, we have shown that the circulating genotypes in France were also spatiotemporally stable.

We then developed two models of infection, one *in vivo* by inoculating CD1 male mice in the footpad of and one *in vitro* by infecting two macrophage cell lines: one bovine (SV40) and one ovine (MoCl4). These two models allowed us to show that the genotypic clusters were not systematically correlated with both the four phenotypic clusters identified *in vivo* from the analysis of the bacterial load in the mouse spleens and the analysis *in vitro* of the *C. burnetii* multiplication kinetics.

Finally, the seroprevalence observed in horses within hyperendemic areas for Q fever in humans (Camargue and Plain of La Crau) suggests that horses are exposed to the bacteria in the area and that they may be a relevant indicator of the zoonotic risk. Nevertheless, our results were inconclusive on the clinical forms associated with Q fever in horses.

In the future, the findings found in our work will allow a global understanding of the circulation dynamics of *C. burnetii* on domestic ruminant farms as well as in others animal species. Thus,

all these data will ultimately improve surveillance, diagnosis and management of Q fever in public and veterinary health.

Keys words: Q fever, sheep, cattle, goats, horses, MLVA, virulence, surveillance

Remerciements

- ✚ À ***Elsa Jourdain***, sans qui rien n'aurait commencé. Tu tiens dans mon parcours une place vraiment très spéciale. Tu as été ma capitaine et mon guide pendant plus de trois années et demies. Je te remercie pour tout le temps que tu m'as consacré et ce en toutes circonstances, pour l'enrichissement intellectuel incroyable que tu m'as apporté et pour ton écoute.
- ✚ À ***Agnès Leblond, Elodie Rousset et Karim Sidi-Boumedine*** pour la richesse des échanges que nous avons eus, leur honnêteté, leur rapidité de réponse, et leur soutien moral. Je vous remercie de m'avoir chaleureusement accueilli dans vos équipes respectives, de m'avoir accompagné et guidé tout au long de nos collaborations.
- ✚ À ***tous mes encadrants*** pour la confiance que vous m'avez témoignée, pour vos encouragements et pour m'avoir donné toutes les clés pour que je puisse m'épanouir dans ce travail pendant ces trois années de thèse.
- ✚ Aux deux structures de rattachement et à leurs directeurs pour m'avoir accueilli : ***Gwenaël Vourc'h*** à l'UMR EpiA (INRA Auvergne-Rhône-Alpes et VetAgro Sup Lyon) et ***Richard Thiery*** à l'unité de fièvre Q animale (ANSES de Sophia Antipolis).
- ✚ Aux membres de mes comités de thèse pour leurs conseils et leurs remarques toujours très constructives qui ont permis de faire évoluer mon projet : ***Annie Rodolakis, Karine Laroucau, Renée de Cremoux, Marcella Mori, Patrick Gasqui et David Biron***.
- ✚ À ***Pierre-Édouard Fournier et David Fretin*** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail, et ***David Biron, Anne Touratier et Emmanuelle Gilot-Fromont*** pour avoir accepté d'être examinateurs.
- ✚ À l'équipe de l'UMR EpiA pour leur soutien infailible à chaque étape de cette thèse, pour avoir répondu à mes questions et mes doutes, et pour tous les bons moments passés ensemble : ***Elsa Jourdain, Agnès Leblond, Séverine Barry, Valérie Poux, Séverine Bord, Sébastien Maseglier, Xavier Bailly, Gwenaël Vourc'h*** et bien d'autres.
- ✚ Tout particuliers :
 - ➔ Aux « ***deux Séverine*** » et à ***Valoche*** pour leur bonne humeur et leur aide si précieuse dans les petites et grandes tâches du quotidien.

➔ À mes acolytes thésards avec qui j'ai pu partager, outre nos discussions scientifiques, de francs moments de rigolade : **Cécile Adam, Sylvain Coly, Julie Cat et Arnaud Cougoule.**

✚ À l'équipe de l'unité fièvre Q animale de l'ANSES : **Elodie Rousset, Karim Sidi-Boumedine, Myriam Prigent, Elise Yang et Philippe Dufour** pour leur grand soutien technique au laboratoire et leur super efficacité, en particulier pendant les phases expérimentales dans le P3.

✚ Tout particuliers :

➔ À **Karim et Elise** qui se sont pleinement investis dans ce projet et sans qui l'avancée de mes travaux de thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui.

➔ À **Karim** pour ta compréhension, ton écoute et ton soutien indéfectible.

➔ À vous deux **Myriam et Elodie** d'avoir été présentes tout au long de cette aventure, nous avons réussi à créer une belle amitié qui dépasse la sphère professionnelle.

✚ À l'ensemble des personnes qui m'ont accompagnées sur le terrain pour leur réflexion et pour leur aide dans la saisie et la valorisation de ces données :

➔ En Auvergne : **Valérie Poux, Séverine Barry et Pauline Carrie.**

➔ En Camargue : **Agnès Leblond, Sophie Pradier, Isabelle Desjardins, Sylvie Lecollinet, Cécile Beck et aux stagiaires, Aurore Fourcot et Louis Szukalowski.**

✚ Aux éleveurs et aux propriétaires ayant acceptés de participer à ces différentes études.

✚ À l'ensemble des personnes impliquées dans la plateforme d'épidémiosurveillance de la fièvre Q animale, avec une pensée toute particulière pour **Elodie Rousset** qui a mis en place et géré l'ensemble du réseau de collecte des échantillons avec les laboratoires vétérinaires. Sans toi l'envergure de cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est !

✚ À mes amis de VetAgro Sup, les Oliviers, pour m'avoir accompagné et offert de superbes bouffées d'oxygène dans les moments où j'en avais le plus besoin : **Max, David, Matt, Nico, Kevino, Yo' et les deux Paul Nord et Sud**, sans oublier **Pierrot et Maëliiss.**

✚ Aux copains Aveyronnais, qui méritent également d'être amplement remerciés pour leur soutien fidèle depuis de nombreuses années dans chacune des étapes de ma vie : ***Camille, Kévin, Audrey, Eric, Beber, Justine, Katia, Clément, Julien, Fanny, Dorian, Tiffany, Romain, Amélie, Emilie*** et ***Chris***.

✚ Et enfin, à mes parents, ***Marilyne*** et ***Daniel*** ; ma sœur et mon beau-frère, ***Adeline*** et ***Arnaud*** ; et mes grands-mères, ***Irène*** et ***Thérèse***, pour leur amour, leur soutien et leur optimisme à chaque étape de cette belle et longue aventure.

Mes chers parents merci pour m'avoir toujours soutenu et fait confiance dans mes choix et surtout merci de me suivre encore dans mes nouvelles aventures... affaire à suivre donc !



« Chaque bonne réalisation, grande ou petite, connaît ses périodes de corvée et de triomphe ; un début, un combat et une victoire » **Gandhi**

Table des matières

CHAPITRE I - INTRODUCTION GÉNÉRALE- 1 - CONTEXTE ET ENJEUX - OBJECTIFS DE LA THÈSE -----	- 1 -
---	--------------

CHAPITRE II - CIRCULATION DE <i>COXIELLA BURNETII</i> EN ÉLEVAGE : DU GÉNOTYPE AU PHÉNOTYPE - ÉTAT DES CONNAISSANCES -----	- 13 -
---	---------------

II.1	Caractéristiques de l'agent étiologique	- 15 -
II.1.1	<i>Différenciation cellulaire et variations de phase</i>	- 15 -
II.1.2	<i>Potentiel infectieux</i>	- 16 -
II.2	Caractéristiques de l'infection chez l'animal	- 17 -
II.2.1	<i>Voies d'excrétion</i>	- 17 -
II.2.2	<i>Voies de contamination</i>	- 18 -
II.2.2.1	Voie aérienne.....	- 18 -
II.2.2.2	Voie alimentaire	- 18 -
II.2.2.3	Autres voies de transmission	- 18 -
II.2.3	<i>Réponse immunitaire</i>	- 19 -
II.2.4	<i>Réservoirs et espèces sensibles</i>	- 20 -
II.2.4.1	Réservoirs principaux : les ruminants domestiques	- 20 -
II.2.4.2	Autres espèces animales ; exemple du cheval	- 21 -
II.3	Méthodes diagnostiques	- 22 -
II.3.1	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	- 22 -
II.3.2	<i>Real-time PCR</i>	- 22 -
II.4	Prophylaxie.....	- 23 -
II.4.1	<i>Prophylaxie sanitaire</i>	- 23 -
II.4.2	<i>Prophylaxie médicale</i>	- 24 -
II.5	Étude de la diversité génotypique.....	- 26 -
II.5.1	<i>Typages moléculaires</i>	- 26 -
II.5.1.1	MLVA	- 26 -
II.5.1.2	MST	- 27 -
II.5.1.3	Élément d'insertion IS1111	- 28 -
II.5.1.4	SNP	- 28 -
II.5.1.5	RFLP.....	- 29 -
II.5.2	<i>Séquençage total du génome</i>	- 29 -
II.6	Caractérisation phénotypique	- 30 -
II.6.1	<i>Isolement à partir d'échantillons de terrain</i>	- 30 -

II.6.2	Test de viabilité : PCR avec ethidium ou propidium monoazide	- 31 -
II.6.3	Modèles d'infections	- 32 -
II.6.3.1	In vitro sur lignées macrophagiques	- 32 -
II.6.3.2	In vivo sur souris	- 32 -
II.6.3.3	Autres modèles	- 33 -
II.6.4	Virulence des souches séquencées	- 33 -

CHAPITRE III - DESCRIPTION ET CARACTERISATION DE LA DYNAMIQUE DE CIRCULATION DE *COXIELLA BURNETII* EN ELEVAGES DE RUMINANTS DOMESTIQUES NATURELLEMENT INFECTÉS----- 37 -

III.1	Dynamique de circulation de <i>Coxiella burnetii</i> en élevage ovin	- 40 -
III.1.1	Méthodologie générale – Choix de l'élevage	- 40 -
III.1.2	Article 1: <i>Coxiella burnetii</i> circulation in a naturally infected flock of dairy sheep: shedding dynamics, environmental contamination, and genotype diversity.....	- 43 -
III.1.2.1	Résumé	- 43 -
III.1.2.2	Article	- 45 -
III.1.3	Article 2: <i>Coxiella burnetii</i> circulation in a naturally infected flock of sheep: individual follow-up of antibodies in serum and milk.....	- 54 -
III.1.3.1	Résumé	- 54 -
III.1.3.2	Article	- 56 -
III.2	Description de la diversité génotypique des souches de <i>Coxiella burnetii</i> circulantes en élevages de ruminants domestiques en France	- 67 -
III.2.1	Méthodologie générale	- 67 -
III.2.1.1	Échantillonnage	- 67 -
III.2.1.1	Typage	- 68 -
III.2.2	Article 3: Molecular epidemiology of <i>Coxiella burnetii</i> in French livestock reveals the existence of three main genotype clusters and suggests species-specific associations as well as regional stability	- 70 -
III.2.2.1	Résumé	- 70 -
III.2.2.2	Article	- 72 -
III.2.3	Article 4: Copy number of the IS 1111 gene: links with host species, regions and MLVA genotypic diversity	- 81 -
III.2.3.1	Résumé	- 81 -
III.2.3.2	Article	- 83 -
III.3	Caractérisation de la diversité phénotypique des souches de <i>Coxiella burnetii</i> circulantes en élevages de ruminants domestiques en France	- 91 -
III.3.1	Méthodologie générale	- 91 -

III.3.1.1	Sélection des souches pour le modèle d'infection in vivo.....	- 91 -
III.3.1.2	Sélection des souches pour le modèle d'infection in vitro	- 92 -
III.3.2	<i>Article 5: In vitro and in vivo infectivity of Coxiella burnetii strains from French livestock</i>	- 92 -
III.3.2.1	Résumé	- 92 -
III.3.2.2	Article	- 94 -

CHAPITRE IV - EXPLORATION DE L'EXPOSITION DU CHEVAL À *COXIELLA BURNETII* ET LIENS POTENTIELS AVEC LA SYMPTOMATOLOGIE ----- - 111 -

IV.1	Liens entre certains syndromes inexpliqués et une potentielle infection par <i>C. burnetii</i> chez le cheval.....	- 114 -
IV.1.1	<i>Liens possibles avec la clinique chez le cheval à partir d'échantillons collectés dans le cadre de dispositifs de surveillance syndromique</i>	- 114 -
IV.1.1.1	Méthodologie.....	- 114 -
IV.1.1.2	Résultats.....	- 116 -
IV.1.1.3	Discussion.....	- 116 -
IV.2	Exposition des chevaux à <i>Coxiella burnetii</i> dans une zone décrite comme endémique pour les ruminants domestiques et l'Homme	- 119 -
IV.2.1	<i>Méthodologie générale</i>	- 119 -
IV.2.1.1	Choix de la zone d'étude : Camargue et Plaine de La Crau	- 119 -
IV.2.1.2	Sélection des écuries et des chevaux	- 119 -
IV.2.2	<i>Article 6: Is the horse a relevant indicator of Coxiella burnetii circulation in the vicinity of human Q fever cases?</i>	- 121 -
IV.2.2.1	Résumé	- 121 -
IV.2.2.2	Article	- 123 -

CHAPITRE V - DISCUSSION GENERALE - PERSPECTIVES ----- - 143 -

V.1	Synthèse des résultats	- 145 -
V.2	Enjeu de santé publique et vétérinaire : nécessité des suivis longitudinaux pour une meilleure compréhension de la circulation de <i>Coxiella burnetii</i> en élevage	- 146 -
V.2.1	<i>Évaluer le statut d'un troupeau via le suivi des femelles infectées</i>	- 146 -
V.2.2	<i>Évaluer le statut d'un troupeau via les contaminations environnementales</i>	- 146 -
V.3	Enjeu socio-économique : nécessité d'optimiser la caractérisation génotypique et phénotypique des souches de <i>Coxiella burnetii</i> afin d'adapter les mesures de lutte.....	- 148 -
V.3.1	<i>Caractérisation génotypique</i>	- 148 -
V.3.2	<i>Caractérisation phénotypique</i>	- 149 -

V.4	Enjeu épidémiologique : nécessité de mieux identifier les espèces animales exposées à <i>Coxiella burnetii</i>	- 149 -
V.4.1	<i>Le cheval, une espèce exposée</i>	- 149 -
V.4.2	<i>D'autres espèces animales sont potentiellement exposées</i>	- 150 -
V.5	Vers une meilleure surveillance pour une gestion intégrée de la maladie	- 150 -

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 153 -
--	----------------

ANNEXES	- 179 -
----------------------	----------------

Liste des figures

Figure 1 : Principales évolutions possibles de l'infection par *C. burnetii* chez l'Homme ----- - 6 -

Figure 2 : Schéma représentatif des différentes études réalisées au cours de ce travail de thèse - 11 -

Figure 3 : Exemple d'analyse MLVA d'un locus de 3 souches de *C. burnetii* différentes ----- - 27 -

Figure 4 : Représentation schématique de la méthode PMA ou EMA rt-PVR ----- - 31 -

Figure 5 : Cycle épidémiologique de la fièvre Q au regard des connaissances actuelles sur cette maladie
----- - 35 -

Figure 6 : Schéma représentatif des matrices étudiées dans les différentes études réalisées au cours de ce travail de thèse----- - 42 -

Article 4

- **Figure 1** *art. 4* : Copy number of the IS1111 gene per genome depending on the host species--
----- - 86 -
- **Figure 2** *art. 4* : Distribution of the copy number of the IS1111 gene per genome depending on
the MLVA genotypic cluster----- - 87 -

Article 5

- **Figure 1** *art. 5* : Graphs showing the multiplication kinetics of *C. burnetii* on bovine (a) and
ovine (b) macrophage cell lines ----- - 103 -

Figure 7 : Cartographie de la distribution spatiale des écuries échantillonnées lors des enquêtes
transversales de 2015 et 2016 en Camargue et en Plaine de La Crau ----- - 120 -

Article 6

- **Figure 1** *art. 6* : Map showing the distribution of stables sampled in 2015 and 2016, the location
where human cases were diagnosed during both years, and the number of ruminants according
to the last agricultural census in France (2010) ----- - 126 -
- **Figure 2** *art. 6* : Map showing intra-stable seroprevalence in 2015 and 2016 ----- - 130 -

• Figure 3 <i>art. 6</i> : Circular diagrams showing the distribution of intra-stable seroprevalence depending on the number of seropositive horses-----	131 -
• Figure 4 <i>art. 6</i> : Histograms showing in 2015 and 2016: (a) overall horse seroprevalence and (b) horse seroprevalence for those sampled in the two consecutive years -----	132 -
• Figure 5 <i>art. 6</i> : Map showing the distribution of ticks and dust samples collected in 2015 and 2016 -----	133 -
Figure 8 : Schéma récapitulatif des principaux résultats présentés dans ce manuscrit -----	145 -

Liste des tableaux

Tableau 1 : Historique des principales épidémies humaines de fièvre Q rapportées en Europe depuis 1987 ----- - **4** -

Tableau 2 : Durées maximales de survie de *C. burnetii* dans différentes matrices ----- - **16** -

Tableau 3 : Durées maximales de détection de *C. burnetii* dans les trois principales voies d'excrétion lors d'infections expérimentale ou naturelle ----- - **17** -

Article 4

- **Table 1** *art. 4* : Number of analyzed samples in each species and cluster----- - **85** -

- **Table 2** *art. 4* : Diversity index depending on MLVA genotypic clusters ----- - **87** -

Article 5

- **Table 1** *art.5* : Table showing the characteristics of isolates selected to test on the *in vivo* and *in vitro* models depending on their originating host species, the geographic area of the farm and their genotypic cluster. ----- - **100** -

- **Table 2** *art.5* : Table showing the mean bacterial burdens quantified in the spleen of CD1 mice 10 days after inoculation ----- - **102** -

- **Table 3** *art.5* : Scoring related to the kinetics of multiplication of the ovine MoCl4 macrophages depending on the bacterial growth phases ----- - **104** -

- **Table 4** *art.5* : Scoring related to the kinetics of multiplication of the bovine SV40 macrophages depending on the bacterial growth phases ----- - **104** -

Tableau 4 : Détails du nombre d'échantillons par matrice analysés en qPCR, collectés sur des juments avortées ----- - **115** -

Tableau 5 : Détails du nombre d'échantillons par matrice analysés en qPCR, collectés sur des chevaux présentant des troubles respiratoires ----- - **116** -

Article 6

- **Table 1** *art. 6* : Number of positive and sampled ticks depending on their classification.- **133** -

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE CONTEXTE ET ENJEUX OBJECTIFS DE LA THÈSE

La fièvre Q fût décrite pour la première fois en 1935 par le Dr. Edward Derrick suite à l'apparition d'un syndrome grippal inexpliqué chez des ouvriers d'un abattoir de Brisbane en Australie (Derrick, 1983). Il nomma cette maladie *Q fever*, en référence à la première lettre du terme anglais *query* qui signifie « à élucider ». Il décida ensuite d'inoculer l'urine et le sang des patients infectés à des cobayes afin d'isoler l'agent responsable de ces fièvres inexpliquées, sans succès. Il adressa alors un broyat de foie d'un cobaye infecté au Dr. Franck Macfarlane Burnet à Melbourne, qui réussit à isoler un organisme proche des *Rickettsies*. Cet organisme fut dans un premier temps nommé *Rickettsia burnetii*.

Simultanément aux États-Unis, les Drs Herald Cox et Gordon Davis isolèrent un organisme en investiguant le rôle de vecteur potentiel des tiques dans la transmission de la fièvre des montagnes rocheuses et de la tularémie. La contamination accidentelle du personnel du laboratoire leur permit de faire le rapprochement avec les fièvres australiennes décrites précédemment. En hommage aux découvreurs de cet agent infectieux, *Rickettsia burnetii* fut renommée en 1948 par le Dr. Cornelius B. Philip, *Coxiella burnetii* (Philip, 1948). Depuis, les études sur ce pathogène se sont multipliées mais de nombreuses questions d'ordre phylogénétique ou métabolique restent encore aujourd'hui en suspens.

C. burnetii a d'abord été classée dans la famille des *Rickettsies*, de par leurs nombreuses propriétés physiologiques communes. Cependant, cette bactérie intracellulaire stricte a ensuite été re-classifiée dans le phylum des *Proteobacteria*, la classe des *Gammaproteobacteria*, l'ordre des *Legionellales* et la famille des *Coxiellaceae* dont l'espèce *burnetii* serait la seule dans le genre *Coxiella* (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). De récentes études ont toutefois remis en cause l'unicité d'espèce dans le genre *Coxiella* en décrivant des bactéries génétiquement très semblables à *C. burnetii*, dites *Coxiella*-like (Duron et al., 2015a; Duron et al., 2015b).

C. burnetii a été décrite chez de nombreux hôtes dont les mammifères domestiques et sauvages mais également chez les oiseaux et les arthropodes, en particulier chez les tiques (Duron et al., 2015b; Rousset et al., 2001). Chez la majorité des espèces la fièvre Q est le plus souvent asymptomatique, ce qui suggère probablement une sous-estimation des populations susceptibles à l'infection par *C. burnetii* (individus infectés mais pour lesquels la maladie ne s'est pas encore déclarée, ils s'opposent aux individus infectieux).

Les ruminants domestiques sont considérés comme le réservoir principal de l'infection pour l'Homme. L'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a d'ailleurs catégorisé la fièvre Q comme étant la deuxième maladie (sur 40) représentant un impact majeur pour les élevages de ruminants (ANSES, 2012), derrière la tuberculose à *M. bovis* et devant la salmonellose bovine clinique.

Cette maladie est une zoonose considérée aujourd'hui de répartition mondiale (Angelakis and Raoult, 2010; Gurtler et al., 2014; Kazar, 2005), exceptée en Nouvelle-Zélande. Les premiers cas européens de fièvre Q ont été décrits chez des soldats allemands cantonnés dans les Balkans, durant la deuxième guerre mondiale. Plusieurs épidémies de fièvre Q ont par la suite été rapportées en France, en Suisse, en Grande-Bretagne, en Allemagne ou encore aux Pays-Bas (*Tableau 1*). Avec plus de 4000 cas humains recensés entre 2007 et 2012, l'épidémie des Pays-Bas rappelle à quel point les conséquences de cette maladie peuvent être importantes en termes de santé publique.

Une particularité de la fièvre Q est la variabilité de son expression clinique chez l'Homme et son caractère fréquemment asymptomatique rendant ainsi son diagnostic difficile. Cette maladie est également largement sous diagnostiquée en raison de l'absence de système de surveillance permettant de mesurer son incidence en France. Une ancienne étude (Dupont et al., 1994) a montré que l'incidence de la fièvre Q aiguë en France était de 2,5 cas pour 100 000 habitants et sa prévalence de 50 cas pour 100 000 habitants (Frankel et al., 2011). Le nombre moyen annuel de nouveaux cas de fièvre Q aiguë diagnostiqués ou confirmés était de 217 (entre 2004 et 2010) selon le Programme de médicalisation des systèmes d'information (PMSI) et de 240 (entre 2009 et 2012) selon le Centre national de référence (CNR), (HCSP, 2013).

Tableau 1 : Historique des principales épidémies humaines de fièvre Q rapportées en Europe depuis 1987 (EFSA, 2010)

Années	Pays	Années	Nombre de cas	Références
1987-1988	Italie	Ovins	235	(Boschini et al., 1999)
1989-1996	France (Poitiers – 86)	Ruminants domestiques	80	(Caron et al., 1998)
1990-1995	France (Étang de Berre – 13)	Ovins	289	(Tissot-Dupont et al., 1999)
1992	Allemagne	Ovins	80	(Schneider et al., 1993)
1993	Bulgarie	Ovins	>1000	(Serbezov et al., 1999)
1993	Italie	Ovins	58	(Selvaggi et al., 1996)

1994	Allemagne	Ovins	>18	(Schulze et al., 1996)
1996	France (Briançon – 05)	Ovins	29	(Carrieri et al., 2002)
1996	Allemagne	Ovins	56	(Lyytikäinen et al., 1998)
1997	Bosnie-Herzégovine	Ovins	26	(EFSA, 2010)
1999	Allemagne	Fumiers d’ovins	82	(EFSA, 2010)
2000	France (Montoisson – 26)	Fumiers de caprins	10	(Rey et al., 2003)
2002	France (Chamonix – 74)	Ovins	88	(Rey et al., 2005)
2002	Royaume-Uni	Paille	95	(van Woerden et al., 2004)
2003	Allemagne	Ovins	299	(Porten et al., 2006)
2003	Italie	Petits ruminants	133	(Starnini et al., 2005)
2003	Espagne	ND	60	(García-Clemente et al., 2007)
2004	Bulgarie	Petits ruminants	220	(Panaiotov et al., 2009)
2004	Croatie	Ovins	14	(Medic et al., 2005)
2004	Espagne	Petits ruminants	22	(de los Ríos-Martín et al., 2006)
2005	Allemagne	Ovins	331	(Gilsdorf et al., 2008)
2005-2011	Pologne	Bovins	279	(Chmielewski and Tylewska- Wierzbanska, 2013)
2006	Royaume-Uni	Ovins	110	(Wilson et al., 2010)
2007-2012	Pays-Bas	Caprins	4108	(van Loenhout et al., 2012)
2007	Slovénie	Ovins	35	(Grilc et al., 2007)
2007	France (Florac - 48)	Ovins	18	(King et al., 2011)
2008	Allemagne	Ovins	>46	(EFSA, 2010)
2008	Allemagne	Ovins	>56	(EFSA, 2010)
2009	Allemagne	Ovins	5	(Henning et al., 2008)
2009	France (Chollet -85)	Abattoir (Bovins)	50	(Ollivier et al., 2009)
2012	Suisse	Ovins	14	(Bellini et al., 2014)
2013	Hongrie	Ovins	70	(Gyuranecz et al., 2014)
2014	France (Valréas – 84-26)	Ovins	45	(Boulogne et al., 2014)

ND (non déterminé)

En gras les cas humains groupés décrits en France

Ces études confirment le rôle majeur des ruminants domestiques (bovins, ovins et caprins) et plus particulièrement des petits ruminants dans la transmission de la maladie à l'Homme. Cependant, le potentiel risque zoonotique que représente la faune sauvage ainsi que d'autres espèces animales domestiques est encore aujourd'hui mal connu.

Chez l'Homme, le CNR estime qu'après une primo-infection 60% des personnes resteront asymptomatiques, avec observation uniquement d'une séroconversion et 40% développeront une forme symptomatique de la maladie (*Figure 1*), (Raoult et al., 2000). Les expressions cliniques aiguës les plus fréquemment décrites sont un syndrome pseudo-grippal spontanément résolutif, une hépatite, une pneumopathie ou une méningo-encéphalite.

Parmi les infections symptomatiques aiguës chez l'Homme, 1 à 5% évoluent vers une forme chronique avec nécessité d'hospitalisation du fait de leur gravité (Million et al., 2009). Les formes les plus sévères surviennent principalement chez des sujets présentant des facteurs aggravants. Il s'agit surtout de patients atteints de valvulopathies cardiaques, de personnes immunodéprimées ainsi que des femmes enceintes (*Figure 1*), (Carcopino et al., 2009). Cependant, la différenciation des formes aiguës et chroniques de la maladie est aujourd'hui controversées.

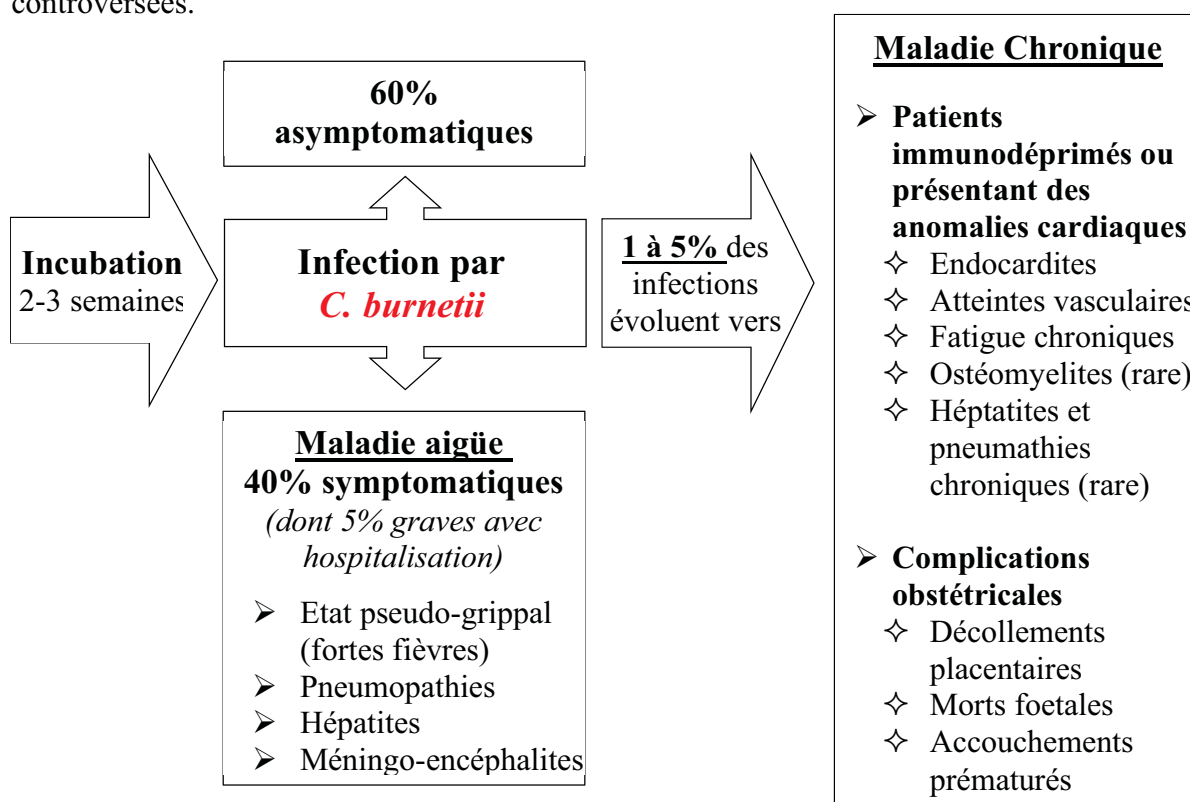


Figure 1 : Principales évolutions possibles de l'infection par *C. burnetii* chez l'Homme, d'après (Million et al., 2009; Raoult et al., 2000)

La fièvre Q chez les ruminants est, comme chez l'Homme, le plus fréquemment asymptomatique. Lors d'apparition de signes cliniques, elle se manifeste majoritairement par des avortements en fin de gestation, des mises bas prématurées, des naissances d'animaux chétifs ou mort-nés (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). Chez les bovins, la survenue d'autres troubles de la reproduction (infections utérines, infertilité, mortinatalité) a également été décrite mais nécessite d'être confirmée (Agerholm, 2013). Ces différences en termes d'expression clinique et de charges bactériennes excrétées entre les bovins, les ovins et les caprins suggèrent une possible diversité des souches circulantes chez ces espèces.

Bien que les avortements soient soumis à déclaration obligatoire en France dans le cadre de la surveillance de la brucellose, ils restent sous-déclarés notamment en élevages de petits ruminants (Bronner et al., 2014). La maladie est également fortement sous-diagnostiquée. En effet, les coûts inhérents aux analyses de laboratoire, la difficulté d'interprétation des résultats de diagnostic différentiel d'avortement et le manque de mesure de lutte efficace découragent le plus souvent les éleveurs à investiguer l'implication de *C. burnetii*.

Un dispositif de surveillance événementielle de la fièvre Q chez les ruminants domestiques a été mis en place de septembre 2012 à août 2015 dans dix départements pilotes (Hautes-Alpes, Aveyron, Finistère, Indre-et-Loire, Loire, Mayenne, Nièvre, Pyrénées-Atlantiques, Saône-et-Loire, Deux-Sèvres). Les séroprévalences ont été estimées à 22, 26 et 41% respectivement en troupeaux bovins, ovins et caprins (Gache et al., 2016). En Europe, des études récentes montraient des séroprévalences intra-troupeau variant entre 38 et 70% chez les bovins, 7 et 88% chez les caprins et 0 et 89% chez les ovins (EFSA, 2010). Toutefois, ces estimations très variables sont difficilement comparables car elles reposent sur des populations d'études, des critères de sélection des lots suivis et des méthodes d'analyses de laboratoire très divers. Ces estimations constituent de plus des mesures très imparfaites du statut sanitaire du troupeau et du risque potentiel de transmission entre les animaux et des animaux à l'Homme. En effet, les études de séroprévalence ne permettent pas d'estimer le nombre d'animaux excréteurs, qui pour certains ne présentent pas d'élévation significative des taux d'anticorps (Astobiza et al., 2011; Khaled et al., 2016).

Les enjeux

Enjeux de santé publique et vétérinaire. La contamination de l'Homme se faisant principalement par inhalation d'aérosols, la fièvre Q affecte majoritairement les personnes en contact avec des animaux infectés (Eldin et al., 2017; Million et al., 2009; Rousset et al., 2001). Toutefois, les cas humains groupés observés en France ces dernières années montrent que les

personnes vivant en milieu urbain ou péri-urbain seraient plus susceptibles aux infections par *C. burnetii* (Boulogne et al., 2014; Ollivier et al., 2009; Rey et al., 2005). De plus, la dynamique de circulation de cette bactérie est encore mal comprise. L'enjeu est donc d'identifier des prélèvements d'intérêt et des techniques automatisables pour rapidement évaluer le risque zoonotique. Bien que fastidieux et coûteux à mettre en œuvre, les suivis longitudinaux sont essentiels à une meilleure compréhension de la dynamique de circulation de *C. burnetii* en élevages de ruminants et des ruminants à l'Homme.

Il est également primordial d'investiguer le rôle potentiel dans l'épidémiologie de la fièvre Q d'espèces animales autres que les ruminants domestiques, se trouvant à l'interface entre des populations humaines naïves et des animaux infectieux. Dans ce contexte, un intérêt particulier devrait être accordé aux syndromes inexpliqués pouvant correspondre à la fièvre Q, chez d'autres espèces animales domestiques que les réservoirs principaux. Par exemple chez le cheval, de nombreux syndromes idiopathiques tels que des avortements, des fièvres ou des fatigues chroniques, ou des affections du système respiratoire inexpliquées sont répertoriés. Ces syndromes sont fréquemment décrits soit chez les ruminants domestiques, soit chez l'Homme en cas de fièvre Q aiguë ou chronique. Bien que la pathogénicité de *C. burnetii* chez les chevaux demeure méconnue, la question est d'estimer le potentiel rôle infectieux ou de réservoir du cheval dans l'épidémiologie de la fièvre Q. De plus, la forte concentration des structures équestres en zones urbanisées suggère le cheval comme un potentiel indicateur du risque zoonotique, notamment en raison d'une plus grande facilité à les prélever que les ruminants. Ainsi, l'objectif serait de montrer que cette espèce est un indicateur pertinent du risque zoonotique dans certaines zones où l'endémicité de la fièvre Q est connue.

Enjeux économiques. Comme toutes les zoonoses, la fièvre Q induit des pertes économiques majeures tant en élevages (Bronner et al., 2014; Bronner et al., 2015) qu'au niveau du système d'assurance maladie français (HCSP, 2013). Toutefois, l'absence de système de surveillance de la fièvre Q en santé publique et vétérinaire en France rend complexe l'estimation de ces pertes.

Inévitablement, les avortements chez les ruminants domestiques provoquent des pertes physiques et une baisse des performances zootechniques pour les éleveurs (Bronner et al., 2013). De plus, les différences en termes d'expression clinique et de charges bactériennes excrétées selon les espèces suggèrent une potentielle diversité des souches circulantes en élevage. Ainsi, les mesures de lutte proposées ne sont potentiellement pas adaptées aux différentes souches et nécessitent d'être optimisées afin de mieux cibler les mesures

prophylactiques pour les éleveurs. L'enjeu est de mieux comprendre la dynamique de circulation spatio-temporelle des souches afin de faciliter le diagnostic et de proposer des mesures de gestion adaptées.

Chez l'Homme, la fièvre Q est une maladie fortement débilitante notamment chez les personnes présentant des facteurs aggravants (valvulopathie, immunodépression, grossesse). De plus, l'extrême morbidité qu'induit cette maladie suggère des pertes économiques inévitables pour le système français d'assurance maladie. À terme, la mise en place d'un système de surveillance de la maladie est indispensable pour mieux maîtriser le risque zoonotique à travers notamment une meilleure connaissance de la diversité génotypique des souches circulantes entre l'animal et l'Homme.

Enjeux sociétaux. Bien que la France n'ait jamais été confrontée à des épizooties et/ou épidémies de fièvre Q de grande ampleur, le risque médiatique constitue un défi majeur dans la gestion d'une crise sanitaire. En effet, la communication sur les décisions politiques et juridiques prises sont déterminantes dans la mise en place des mesures de prévention. L'enjeu est d'informer correctement les différents acteurs afin qu'ils se sentent concernés pour adopter les bonnes pratiques de prévention. Ainsi, dans le futur la mise en place d'un système d'information vulgarisé et facile d'accès permettra de mieux sensibiliser les éleveurs et les vétérinaires à l'apparition de nouvelles crises sanitaires.

Ces divers enjeux de santé publique et vétérinaire, économique et sociétal ainsi que le manque de connaissances évident ont motivé la mise en place de ce projet de thèse.

Les objectifs

Cette thèse permettra de produire concomitamment des connaissances épidémiologiques descriptives sur la diversité génotypique et phénotypique de *C. burnetii*. Le but étant de : (i) évaluer la dynamique de circulation intra-élevage de *C. burnetii*, en prenant l'exemple d'un élevage ovin ; (ii) décrire la diversité génotypique des souches de *C. burnetii* dans les élevages de ruminants domestiques en France ; (iii) étudier la diversité phénotypique de ces souches ; et (iv) analyser les liens entre exposition et symptomatologie chez le cheval, suite à une infection potentielle.

Le plan

Après avoir détaillé l'état des connaissances actuelles sur la circulation de *C. burnetii* en élevages (Partie II) et avant d'aborder des éléments de discussion générale ainsi que des perspectives à ce travail (Partie V), nous détaillerons les différentes études réalisées au cours de ce travail de thèse (Parties III et IV). Pour faciliter le raisonnement, nous les avons synthétisées dans la *Figure 2*, ci-après.

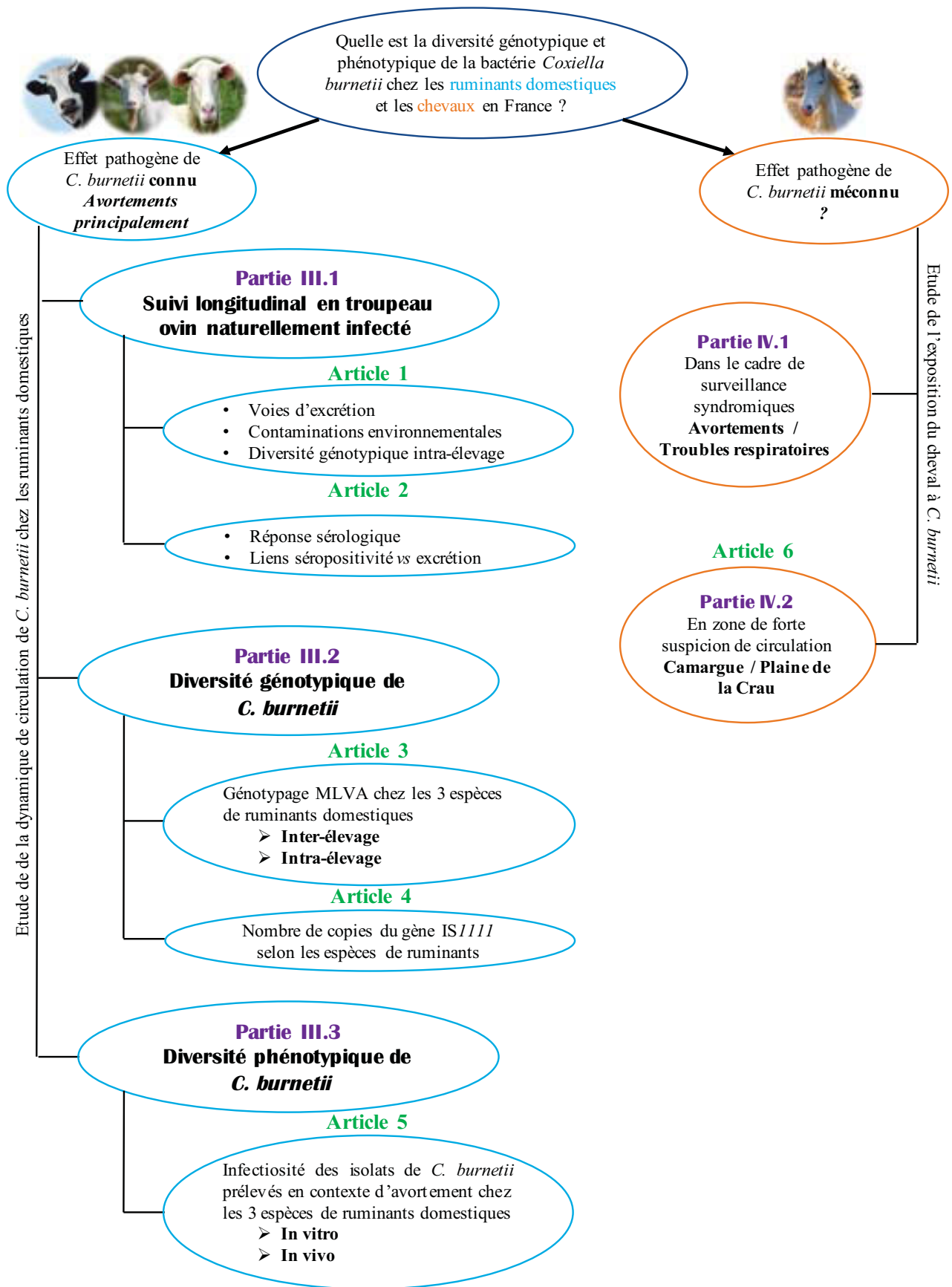


Figure 2 : Schéma représentatif des différentes études réalisées au cours de ce travail de thèse

CHAPITRE II

**CIRCULATION DE *COXIELLA BURNETII* EN
ÉLEVAGE :
DU GÉNOTYPE AU PHÉNOTYPE
- ÉTAT DES CONNAISSANCES -**

Dans la partie précédente, nous avons identifié les enjeux et les objectifs de ce travail de thèse. Dans cette partie bibliographique, nous allons préciser le contexte de ce projet en dressant un bilan des connaissances actuelles concernant la circulation de *C. burnetii* dans les élevages infectés. Dans un premier temps, les caractéristiques générales du pathogène puis de l'infection chez l'animal seront décrites, à la lumière d'études menées aussi bien en conditions expérimentales que d'élevage. Une troisième partie permettra d'aborder les outils disponibles pour diagnostiquer cette maladie tandis qu'une quatrième traitera des mesures prophylactiques possibles de mettre en œuvre dans les troupeaux. L'identification des souches circulantes entre les espèces infectées étant un point crucial pour maîtriser le risque zoonotique, une cinquième partie sera consacrée aux outils permettant de décrire la diversité des souches. En outre, la maîtrise de l'infection dans les élevages infectés repose classiquement sur des mesures de lutte adaptées, il apparaît donc indispensable de caractériser le pouvoir pathogène des souches bactériennes en cas d'infection. Une sixième partie décrira les intérêts et limites des modèles de virulence actuellement disponibles pour évaluer la pathogénicité des souches circulantes.

II.1 Caractéristiques de l'agent étiologique

II.1.1 Différenciation cellulaire et variations de phase

La bactérie *C. burnetii* est intracellulaire stricte et à Gram négatif. Les principales cellules cibles sont les macrophages localisés dans les tissus (lymphe et ganglions lymphatiques, rate, foie, poumons principalement) et les monocytes circulants du sang (Baca and Paretsky, 1983). D'une part, cette vie intracellulaire dans une niche protégée et la division asymétrique des cellules infectées sont à la base de la persistance de *C. burnetii* chez l'hôte. D'autre part, la bactérie semble apte à induire la mort programmée (ou apoptose) des macrophages (Zamboni and Rabinovitch, 2004). De nouveaux macrophages phagocytent les débris des macrophages morts et peuvent alors être infectés par *C. burnetii*.

Le lipopolysaccharide (LPS) exposé à la surface des bactéries est un antigène immunodominant. Ce LPS est soumis à une variation de phase, observée *in vitro* et causée par une délétion irréversible de gènes dans le chromosome. Le LPS complet de phase I devient un LPS incomplet (ou tronqué) de phase II. Seule la forme portant un LPS de phase I présente un fort pouvoir infectieux. Une population homogène de bactéries en phase II est avirulente et ne peut pas être retrouvée dans un organisme hôte.

De plus, plusieurs formes morphologiques de *C. burnetii* ont été décrites (Coleman et al., 2004; Heinzen et al., 1999). Ces formes sont de grande (LCV, « Large Cell Variant ») ou de petite

taille (SCV, « Small Cell Variant »). Elles sont respectivement associées à différents stades du cycle de développement de *C. burnetii* : multiplication (plus ou moins active) et dormance. Un cycle de développement comparable est connu chez quelques rares autres bactéries à Gram négatif, telles que *Chlamydophila*, *Anaplasma* et *Rickettsiella*. La pseudo-spore de *C. burnetii* est une forme petite et compacte, sa paroi est épaisse et sans LPS de surface. Elle est retrouvée à l'intérieur de la cellule infectée ou en condition extracellulaire. Cet état végétatif (ou dormance) confère à la bactérie une résistance élevée et une persistance durable dans l'environnement et dans certains tissus de l'hôte. Comme les spores des bactéries à Gram positif, cette forme est apte à se multiplier à nouveau si elle se retrouve dans des conditions favorables (Coleman et al., 2004). Ce sont les formes les plus probables à l'origine de la plupart des infections naturelles, elles sont donc d'une importance cruciale à considérer dans les mesures prophylactiques.

II.1.2 Potentiel infectieux

Le potentiel infectieux de *C. burnetii* est très élevé. Les doses infectieuses décrites dans les modèles expérimentaux sont très variables, allant de 1 à 10 bactéries, selon les modèles choisis et les voies d'inoculation utilisées (Brooke et al., 2013; La Scola et al., 1997; Tigertt et al., 1961). Bien que cette bactérie cible préférentiellement les monocytes circulants et les macrophages tissulaires, les formes extracellulaires excrétées par les animaux (pseudo-spores) possèdent la capacité de survivre à des conditions difficiles dans l'environnement. Ces durées de survie dans le milieu extérieur sont très variables pouvant aller jusqu'à plusieurs années (Tableau 2). Cependant, ces données sont anciennes et mériteraient d'être confirmées avec des techniques de détection plus sensibles afin de mieux quantifier les charges bactériennes détectées dans l'environnement, notamment des élevages infectés.

Tableau 2 : Durées maximales de survie de *C. burnetii* dans différentes matrices (EFSA, 2010; HCSP, 2013).

Matrice	Durée de survie (mois)
Sécrétions sèches	1
Urine sèche	1,5
Poussières	4
Sol	5
Sang de cobaye sec	6
Laine	12 à 16
Excréments de tiques secs	20
Lait réfrigéré (4 à 6°C)	42

II.2 Caractéristiques de l'infection chez l'animal

II.2.1 Voies d'excrétion

Les produits de parturition constituent les principales matières virulentes à l'origine de la transmission de la bactérie entre ruminants domestiques et des ruminants domestiques à l'Homme. *C. burnetii* est principalement excrétée au moment de l'avortement ou de la mise bas dans le placenta, le mucus vaginal ou l'avorton. Les fèces et le lait constituent également des voies potentielles d'excrétion (Van den Brom et al., 2015b). L'excrétion a été décrite aussi bien chez des femelles avortées que chez des femelles ayant mis bas à terme, et ce sur des longues durées (Tableau 3), (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Arricau-Bouvery et al., 2003; Guatteo et al., 2012; Rodolakis, 2006).

Tableau 3 : Durées maximales de détection de *C. burnetii* dans les trois principales voies d'excrétion lors d'infections expérimentale ou naturelle (Arricau-Bouvery et al., 2005; Astobiza et al., 2010; EFSA, 2010; Guatteo et al., 2012).

Espèce	Durée d'excrétion (jours)		
	Mucus vaginal	Fèces	Lait
Bovins	28 ¹	14 ⁴	13 ¹
Caprins	14 ²	20 ⁴	52 ²
Ovins	75 ³	149 ³	109 ³

¹(Guatteo et al. 2012)

²(Arricau-Bouvery et al. 2005)

³(Astobiza et al. 2010)

⁴(EFSA, 2010)

La diversité des voies d'excrétion et la persistance de l'excrétion dans le temps expliquent la forte contamination de l'environnement et le maintien de l'infection dans un troupeau (EFSA, 2010). Les niveaux d'excrétion à l'échelle individuelle sont très variables, cependant il semble que les charges bactériennes détectées dans les élevages cliniquement atteints de fièvre Q soient plus élevées que dans les élevages infectés asymptomatiques (Carrie, 2016; HCSP, 2013).

De plus, les durées et les voies d'excrétion décrites dans la littérature varient considérablement selon les espèces et le contexte épidémiologique. Ainsi, une meilleure compréhension de la dynamique de circulation de *C. burnetii* chez les animaux domestiques est indispensable. La mise en place d'études de cohorte ciblant à la fois des femelles saines et des femelles infectées permettront de compléter les connaissances actuelles. Ce type de suivi permettra aussi de mieux maîtriser les épizooties de fièvre Q et de fournir des outils pertinents d'estimation du risque zoonotique, sous réserve d'avoir accès à des données sur l'exposition humaine.

II.2.2 Voies de contamination

II.2.2.1 Voie aérienne

La forme extracellulaire (SCV) de *C. burnetii* constitue la forme infectieuse de la bactérie. La dissémination des SCV se fait principalement par voie aérienne, sur de longues distances allant de quelques mètres à plusieurs dizaines de kilomètres (Gilsdorf et al., 2008; Hawker et al., 1998; Tissot-Dupont et al., 2004). La voie de contamination principale des animaux et de l'Homme se fait par inhalation de particules contaminées provenant de femelles de ruminants infectées (EFSA, 2010; OIE, 2015).

Les conditions et les pratiques d'élevage influent directement sur la transmission aérienne de la bactérie. L'épandage de fumiers ou la manipulation de machines agricoles dans les bâtiments d'élevages favorisent sa dissémination dans l'environnement. Les quantités de bactéries excrétées étant massives en périodes de mises-bas ou en cas d'avortement en fin de gestation, les pressions infectieuses en intra-troupeaux augmentent considérablement durant ces périodes. Le manque de ventilation et la charge en bétail dans les bâtiments constitueraient aussi des facteurs de risque d'infection (Hatchette et al., 2001).

II.2.2.2 Voie alimentaire

La voie digestive serait également une voie de contamination possible pour les ruminants domestiques. L'infection peut se faire par léchage ou par ingestion de fourrages souillés par des produits de parturition ou au pâturage (Boarbi et al., 2016; Rousset et al., 2001). Toutefois, l'inhalation d'une quantité importante de bactéries se réalisant concomitamment (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; OIE, 2015), la transmission par voie alimentaire est aujourd'hui largement contestée et des investigations complémentaires sont nécessaires pour mieux évaluer ce risque de transmission.

II.2.2.3 Autres voies de transmission

L'implication des tiques dans la transmission de la fièvre Q est difficile à évaluer. En effet, plusieurs études suggèrent que les tiques peuvent jouer un rôle de vecteur dans la transmission de la bactérie (Duron et al., 2015). Cependant, la transmission vectorielle a été évaluée expérimentalement en laboratoire mais reste difficile à étudier dans les conditions naturelles. En outre, les tiques pourraient également entretenir un cycle sylvatique et être impliquées dans la transmission de *C. burnetii* de la faune sauvage aux animaux domestiques et notamment aux ruminants.

La transmission par voie verticale ou vénérienne serait également possible chez les ruminants domestiques (Kruszewska et al., 1996; Kruszewska and Tylewska-Wierzbanska, 1997; Ruiz-Fons et al., 2014) mais potentiellement d'importance mineure par rapport à la voie aérienne.

Les voies vectorielle et vénérienne mériteraient néanmoins d'être investiguées plus précisément, notamment chez les mâles reproducteurs.

II.2.3 Réponse immunitaire

Les résultats sérologiques présentés dans ce manuscrit porteront sur la détection d'anticorps spécifiques de *C. burnetii* dans le sérum des ruminants et des chevaux, le but étant d'utiliser les taux d'anticorps comme un indicateur du statut sanitaire d'un élevage. J'ai ainsi fait le choix de ne présenter que succinctement dans cette partie la réponse à médiation humorale et de ne pas aborder la réponse à médiation cellulaire lors d'une infection par *C. burnetii*.

Bien que la pénétration de la bactérie dans l'organisme stimule les défenses immunitaires, elles ne permettront pas toujours son élimination, notamment en cas de formes chroniques de fièvre Q. Toutefois, bien que l'immunité humorale soit généralement considérée comme moins importante dans le contrôle de l'infection, une étude chez la souris lui confère un rôle non-négligeable (Zhang et al., 2007). Ainsi, l'élimination de *C. burnetii* nécessite certes l'intervention de l'immunité cellulaire, mais serait également favorisée par l'immunité humorale (Humphres and Hinrichs, 1981; Rodolakis, 2009; Zhang et al., 2007).

L'étude de l'immunité humorale repose principalement sur la composition de la membrane externe responsable de la lymphoprolifération (Heinzen et al., 1999). La phagocytose des bactéries pathogènes (phase I) induit une forte production d'anticorps mais ne permet l'élimination que d'une infime partie des bactéries. Chez les animaux domestiques, peu d'études se sont intéressées aux délais d'activation de la réponse, à la persistance des anticorps ou à l'implication de l'immunité humorale dans l'élimination de la bactérie. De plus, des études plus précises sur le rôle de l'immunité cellulaire et de l'immunité humorale manquent cruellement, chez les ruminants domestiques notamment.

Chez l'Homme, la séroconversion s'observe en général entre sept et quatorze jours après l'apparition des symptômes. Les patients atteints de fièvre Q chronique présentent le plus souvent des forts taux d'IgG et IgA et très peu voire pas d'IgM (Eldin et al., 2017; Raoult et al., 2005). Les IgM possèdent la durée de vie la plus longue (2ans post-infection).

Lors d'une infection expérimentale chez des cobayes, la production d'anticorps anti-phase II ainsi que ceux fixant le complément a d'abord été observée, suivie des anticorps anti-phase I dont le pouvoir protecteur serait plus élevé (Baca and Paretsky, 1983).

II.2.4 Réservoirs et espèces sensibles

Aujourd'hui, nous manquons encore de données sur la spécificité des signes cliniques associés à une infection par *C. burnetii* en médecine vétérinaire. En effet, l'implication de *C. burnetii* dans des avortements semblent être majoritaires, toutefois elle n'est que très rarement investiguée dans des fièvres ou des troubles cardiaques et respiratoires inexpliqués chez les animaux de rente ou de loisirs, notamment par manque de moyens de la part des éleveurs ou des propriétaires.

II.2.4.1 Réservoirs principaux : les ruminants domestiques

Les infections par *C. burnetii* sont généralement asymptomatiques (Rousset et al., 2001). Toutefois, à la faveur d'une dissémination par le sang et le système lymphatique, différents organes peuvent être infectés. La fièvre Q peut ainsi être à l'origine de troubles de la reproduction tels que des avortements, de la mortinatalité, des nouveau-nés chétifs, des infections utérines ou des placentites. Les avortements sont observés généralement en fin de gestation (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005) mais ces avortements tardifs sont aussi mieux repérés sur le terrain. De fait, des avortements précoces peuvent survenir sans que les causes soient précisément investiguées (Agerholm, 2013). Une étude suggère également des avortements répétés imputables à *C. burnetii* sur une même femelle (Berri et al., 2001). Toutefois, aucun protocole de diagnostic différentiel d'avortement n'avait à l'époque permis d'associer de façon certaine ces avortements à la fièvre Q.

L'infection est généralement enzootique dans les zones d'élevages de ruminants domestiques (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). Les caprins constituent l'espèce la plus sensible à la fièvre Q, avec dans certains élevages jusqu'à 90% des femelles qui avortent (Parisi et al., 2006). Les vagues d'avortements sont principalement observées chez les petits ruminants et ne sont que très rarement évoquées en élevages bovins. Plusieurs facteurs sont susceptibles d'expliquer certaines de ces différences : la saisonnalité des mises bas chez les petits ruminants, des différences de pathogénicité liée éventuellement à des réponses immunitaires différentes ou encore des différences de souches circulantes entre les trois espèces de ruminants (Agerholm, 2013; Saegerman et al., 2015).

Chez les bovins, l'implication de *C. burnetii* dans d'autres troubles de la reproduction ou dans des cas de mortinatalité ou de naissance de veaux chétifs reste controversée (Agerholm, 2013,

2014; EFSA, 2010). En effet, la mise en évidence de *C. burnetii* dans le microbiote utérin de vaches en bonne santé (Jeon et al., 2015), l'absence de lot témoin et de recherche simultanée d'autres pathogènes ne permet pas aujourd'hui d'associer de façon précise les troubles observés à une infection par *C. burnetii* chez les bovins. Il est donc nécessaire de confirmer le lien entre la présence de *C. burnetii* et la dégradation des performances de reproduction des vaches (Agerholm, 2013; Garcia-Ispuerto et al., 2013; Garcia-Ispuerto et al., 2014). Enfin, des auteurs suggèrent une association entre excrétion de *C. burnetii* dans le lait et mammites subcliniques chroniques chez la vache laitière (Barlow et al., 2008) mais, là encore, des études complémentaires sont nécessaires.

II.2.4.2 Autres espèces animales ; exemple du cheval

L'infection par *C. burnetii* a été mise en évidence chez de nombreuses autres espèces animales, depuis l'amibe jusqu'au chameau. Les ongulés sauvages, les porcs, les oiseaux, les chevaux ou encore les rongeurs peuvent être infectés sans que la clinique exacte qui en résulte soit réellement connue. Comme évoqué précédemment, un portage a également été décrit chez des arthropodes et plus spécifiquement chez des tiques.

En condition expérimentale, l'infection de *C. burnetii* peut-être induite chez un grand nombre d'espèces animales de laboratoire : souris, rat, lapin, cobaye et singe. L'expression clinique chez ces animaux de laboratoire est très variable : l'infection peut être asymptomatique ou entraîner de la fièvre et la formation de granulomes, voire la mort (Eldin et al., 2017).

L'implication des chevaux dans l'épidémiologie de la fièvre Q reste incertaine (Roest et al., 2013a). Les séroprévalences décrites dans la littérature sont variables, allant de 0 à 52,5% de chevaux séropositifs (Joshi et al., 1978; Marenzoni et al., 2013). Les signes cliniques associés à la fièvre Q sont également méconnus chez cette espèce et méritent d'être investigués plus précisément. Des études récentes ont tout de même montré que l'ADN de *C. burnetii* pouvait être détecté dans des placentas ou des organes de fœtus provenant de juments avortées, mais les charges bactériennes détectées ne permettent pas de conclure sur l'implication de *C. burnetii* dans ces avortements (Leon et al., 2012; Runge et al., 2012). Une étude a également rapporté la détection par PCR de *C. burnetii* dans le sang ou l'urine, mais là encore les charges détectées étaient faibles et sur un nombre limité de chevaux (Seo et al., 2016; Tozer et al., 2014). De fait, à ce jour, aucun isolat de *C. burnetii* n'a été décrit à partir d'échantillons provenant de chevaux potentiellement infectés.

II.3 Méthodes diagnostiques

Aujourd'hui les techniques les plus couramment utilisées dans la détection de *C. burnetii* en élevages sont l'ELISA et la rt-PCR. Les tests sérologiques ne permettent pas d'établir un diagnostic, de dater l'exposition de l'animal au pathogène (infection active ou ancienne), ni de déterminer si l'animal a été vacciné ou s'il s'est infecté naturellement. *A contrario*, la rt-PCR est quant à elle utilisée pour le diagnostic individuel (ou de groupe chez les petits ruminants) d'avortement.

II.3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

La technique ELISA est aujourd'hui la méthode de diagnostic indirect la plus sensible et la plus spécifique (Horigan et al., 2011; OIE, 2015). Cette méthode est entièrement automatisée et permet rapidement d'analyser de grandes séries d'échantillons à faible coût (OIE, 2015; Sidi-Boumedine et al., 2010). Bien que la spécificité des kits ELISA sur le sérum et le lait diffère selon les fabricants, à l'heure actuelle cette méthode sérologique est la plus adaptée à l'évaluation des taux d'infection des troupeaux (OIE, 2015). Toutefois, cette technique nécessite d'être complétée par des analyses en rt-PCR afin d'évaluer le statut infectieux d'un élevage.

II.3.2 Real-time PCR

La rt-PCR permet d'évaluer le risque zoonotique plus précisément que l'ELISA en quantifiant les charges excrétées par les femelles infectées. En effet, la rt-PCR permet de mettre en évidence l'ADN des pathogènes, elle est rapide à mettre en œuvre, partiellement automatisée et peut-être appliquée à un nombre d'échantillons important et sur des matrices très diverses (mucus vaginal ou endocervical, placenta, organes d'avorton, fèces, lait, poussière, air).

Les séquences les plus communément ciblées pour la détection de l'ADN de *C. burnetii* sont soit des séquences plasmidiques (QpH1 ou QpRS), (Jager et al., 2002; Lautenschlager et al., 2000)) ; soit des gènes monocopies (tels que *icd*, *com1*, *sod*) ; soit un gène multicopie correspondant à l'élément d'insertion IS1111 (Seshadri et al., 2003). Cette dernière séquence est la plus utilisée vu son grand nombre de répétitions sur le génome de *C. burnetii* (variant entre 7 et 110 copies), permettant ainsi une forte sensibilité de détection (Klee et al., 2006). Bien que la quantification obtenue ne soit pas absolue, le gène IS1111 constitue pour le moment la cible des kits PCR commercialisés auprès des laboratoires d'analyses vétérinaires. Les kits sont calibrés par rapport à une souche de référence (souche *C. burnetii* Nine Mile RSA 493) comportant 20 copies du gène IS1111. Ainsi, pour chaque échantillon analysé les

quantifications obtenues sont pondérées par rapport à un nombre moyen de 20 copies et les résultats sont exprimés en nombre de génomes équivalents ou de bactéries *C. burnetii* Nine Mile RSA 493 par millilitre (Rousset et al., 2012).

Dans le cadre de la surveillance évènementielle de la fièvre Q entre 2012 et 2015, le seuil de positivité clinique a été fixé à dire d'experts à 10^4 bactéries par millilitre pour le mucus vaginal ou endocervical, le placenta ou les organes d'avortons. En cas d'analyse de mélange (pratiquée uniquement chez les petits ruminants), le seuil a été abaissé à 10^3 bactéries par millilitre. La détection de bactérie dans l'avorton permet de conclure à son implication dans l'avortement chez les ruminants domestiques (Rousset et al., 2012). Cependant, la rt-PCR classique ne permet pas aujourd'hui de distinguer les bactéries vivantes des mortes.

L'estimation du nombre de bactéries vivantes, dans les prélèvements environnementaux notamment, est cruciale pour estimer rapidement le risque infectieux dans l'environnement d'un élevage.

Par ailleurs, plusieurs fabricants ont aujourd'hui développé des kits PCR multiplex ciblant plusieurs agents pathogènes (*C. burnetii*, *Neospora caninum*, *Chlamydia* spp. entre autres). Ces outils simplifient les procédures lors de diagnostic différentiel d'avortement chez les ruminants et réduisent les coûts (Guatteo et al., 2014; Tramuta et al., 2011).

II.4 Prophylaxie

Dans les élevages infectés, des mesures de maîtrise peuvent être mises en place afin de réduire la transmission de l'infection entre les animaux du troupeau, de limiter la transmission aux élevages voisins, mais aussi de réduire le risque de contamination à l'Homme (EFSA, 2010). Les mesures de maîtrise peuvent être de deux ordres : sanitaires ou médicales.

II.4.1 Prophylaxie sanitaire

Les principales mesures de lutte non médicales concernent des mesures d'hygiène. Ces mesures ne sont pas spécifiques et peuvent être mises en œuvre dans tous les élevages confrontés à des problèmes d'avortements. L'utilisation de locaux spécifiques pour la mise bas (box de vêlage, cases d'agnelage ou de chevrotage), la désinfection des locaux et du matériel utilisés, l'isolement des femelles avortées entre autres constituent des leviers d'actions possibles mais complexes à mettre en œuvre surtout en troupeaux de petits ruminants en raison des pratiques d'élevages inhérentes à ces espèces. Les mesures de lutte passent également par la destruction des placentas et des avortons, par incinération ou par appel de l'équarrissage. Cette destruction

doit être immédiate afin de limiter l'ingestion et la dispersion des bactéries par des animaux domestiques et sauvages à partir des déchets infectants (EFSA, 2010; OIE, 2015).

Par ailleurs, l'excrétion intermittente de *C. burnetii* dans les fèces des ruminants domestiques ainsi que le déroulement des mises bas sur aire paillée (liquides de parturition et placentas), font des effluents d'élevage (fumiers et lisiers) des sources de contaminations majeures pour les espèces animales et pour l'Homme. De fait, l'aérosolisation de la bactérie ainsi que sa dispersion vont être conditionnées par les pratiques d'épandage mises en œuvre (Berri et al., 2005; Berri et al., 2003). La fermentation naturelle, le compostage et le brassage des effluents d'élevage constitueraient des procédés d'inactivation thermique. Toutefois, aucune étude n'a actuellement permis de prouver leur efficacité vis-à-vis de *C. burnetii*. Ces procédés sont également controversés compte tenu du risque de dispersion d'aérosols contaminés lors des brassages inhérents à ces techniques.

Il est également possible de traiter chimiquement les lisiers au cyanamide calcique à 0,6% (Arricau-Bouvery et al., 2001). La nature liquide des lisiers permet un traitement chimique homogène tandis que la réalisation est plus complexe pour les fumiers. En outre, des questions d'ordre environnemental subsistent concernant la dispersion d'un produit chimique sur les sols. Au final, l'efficacité de chaque mesure d'action demeure aujourd'hui méconnue en raison d'un manque crucial d'études. Aussi, à l'heure actuelle la maîtrise de l'infection fait majoritairement appel à des mesures d'ordre médical.

II.4.2 Prophylaxie médicale

Antibiothérapie. L'utilisation d'antibiotiques a pendant un temps été préconisée afin de réduire le nombre d'avortements ainsi que les charges bactériennes excrétées par les femelles infectées par la fièvre Q (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). Les antibiotiques les plus couramment employés sont les tétracyclines, et plus particulièrement l'oxytétracycline. Cependant, leur efficacité est aujourd'hui controversée. En effet, chez les ovins une étude (Astobiza et al., 2013) a montré que l'injection d'oxytétracycline ne permettait pas de réduire le nombre d'avortements ni les charges bactériennes excrétées dans les principales voies d'excrétion connues (mucus vaginal, fèces ou lait). Chez les bovins, l'oxytétracycline permettrait de réduire l'excrétion individuelle au moment de la mise bas (Taurel et al., 2012) mais ne permettrait pas de la diminuer à l'échelle du troupeau lorsque la charge bactérienne est mesurée dans le lait de tank (Taurel et al., 2014).

Vaccination. Il existe deux vaccins contre la fièvre Q en France pour les ruminants domestiques. Un vaccin contenant des bactéries en phase II (CHLAMYVAX FQ[®], Merial) et un contenant des bactéries en phase I (COXEVAC[®], Ceva Santé-Animale). Le CHLAMYVAX FQ[®] possède l'autorisation de mise sur le marché (AMM) uniquement pour les petits ruminants alors que le COXEVAC[®] possède l'AMM pour les bovins et les caprins mais pas pour les ovins. Le vaccin CHLAMYVAX FQ[®] n'est actuellement plus produit pour des raisons de problèmes de fabrication.

Les vaccins en phase I permettent de prévenir les avortements et de réduire les charges bactériennes excrétées chez des femelles infectées par *C. burnetii* alors que les vaccins en phase II sont inefficaces contre les avortements et la réduction des charges bactériennes excrétées (Arricau-Bouvery et al., 2005; EFSA, 2010; Rousset et al., 2009). Chez les trois espèces de ruminants domestiques, les effets de la vaccination ne semblent pas immédiats, que les femelles soient saines ou infectées. En effet, la vaccination avant la mise à la reproduction des femelles saines diminue fortement pour celles-ci le risque de devenir excrétrices en cas de contamination pendant la gestation. En revanche, chez les bovins naturellement infectés la vaccination ne permet pas de diminuer les charges bactériennes excrétées (Guatteo et al., 2008).

Les programmes de vaccination doivent être appliqués sur plusieurs années afin d'éviter la réémergence de vagues d'avortements, surtout chez les petits ruminants (Astobiza et al., 2011; de Cremoux et al., 2012a; Rousset et al., 2009). Il est également conseillé de vacciner préférentiellement le troupeau de renouvellement à partir de 4 mois d'âge ainsi que les animaux nouvellement introduits dans le troupeau (Astobiza et al., 2011; de Cremoux et al., 2012a; Rousset et al., 2009).

II.5 Étude de la diversité génotypique

Pour une meilleure compréhension de la dynamique de circulation interspécifique de *C. burnetii*, il est indispensable de discriminer les souches circulantes à partir des différents outils de typage moléculaire disponibles.

II.5.1 Typages moléculaires

Il existe de nombreuses méthodes de génotypage de *C. burnetii* (Sidi-Boumedine and Rousset, 2011). L'analyse de répétitions en tandem polymorphe sur plusieurs loci (MLVA) est considérée aujourd'hui comme la méthode la plus discriminante pour différencier plusieurs souches de *C. burnetii* (Sidi-Boumedine and Rousset, 2011). Cependant, des protocoles normalisés sont particulièrement attendus pour permettre une standardisation et une comparaison internationale des données de génotypage.

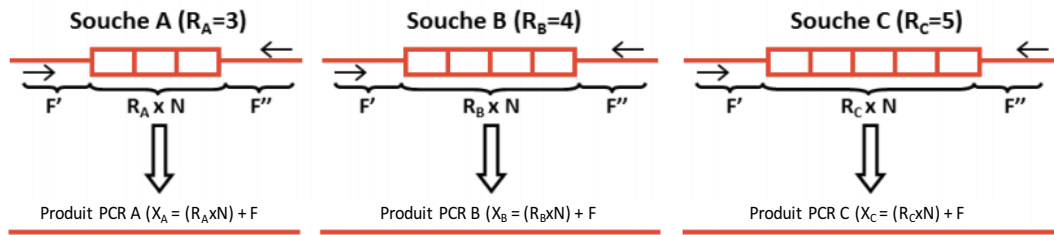
II.5.1.1 MLVA

Le génotypage MLVA cible différents loci du génome des microorganismes, appelés aussi marqueurs, caractérisés par des séquences nucléotidiques répétées en tandem polymorphes (VNTR), et de longueurs variables. Cette variabilité est à l'origine d'un polymorphisme propre à chaque pathogène (Figure 3). Chez *C. burnetii*, 17 marqueurs (mini-satellite, noté ms) ont été identifiés comme étant des régions du génome bactérien les plus polymorphes (Arricau-Bouvery et al., 2006; Svraha et al., 2006). Le protocole MLVA décrit en 2006 par Arricau-Bouvery et al., utilise ces 17 marqueurs sur 42 isolats de *C. burnetii* permettant ainsi l'identification de 36 génotypes différents.

La MLVA permet aujourd'hui de caractériser précisément la circulation des souches selon la localisation géographique et l'espèce d'hôte sur lesquelles elles ont été prélevées. À ce jour, les données de MLVA pour *C. burnetii* sont dérivées d'un nombre limité d'échantillons, notamment ceux ayant servi à la mise au point de la méthode. De plus, les études qui ont été réalisées ces dernières années (Astobiza et al., 2012; Chmielewski et al., 2009; Frangoulidis et al., 2014; González-Barrio et al., 2016; Gonzalez-Barrio et al., 2016; Pinero et al., 2015) sont difficilement comparables en raison : d'erreurs typographiques, de l'utilisation de définitions ou nomenclature différentes, de la présence de séquences se chevauchant pour certains marqueurs VNTR ou encore du choix des motifs répétés. Bien que des ressources électroniques sur Internet soient disponibles gratuitement pour faciliter l'harmonisation des protocoles (<http://mlva.u-psud.fr/MLVANet/spip.php?rubrique50>) ou pour interroger les bases de données

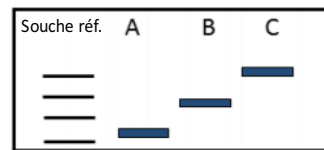
existantes (<http://minisatellites.u-psud.fr>), des progrès sont attendus pour décrire la circulation des souches à grande échelle.

1) Amplification spécifique par PCR d'un locus (VNTR)



2) Migration sur gel d'électrophorèse des 3 produits PCR obtenus

N = Nombre de répétitions
 $F = F' + F''$



3) Déduction à partir du gel d'électrophorèse du nombre de répétitions en tandem sur le locus ciblé et pour chacune des 3 souches, par rapport à une souche de référence (dans notre cas Nine Mile RSA 493)

4) Analyses des 17 loci connus à ce jour

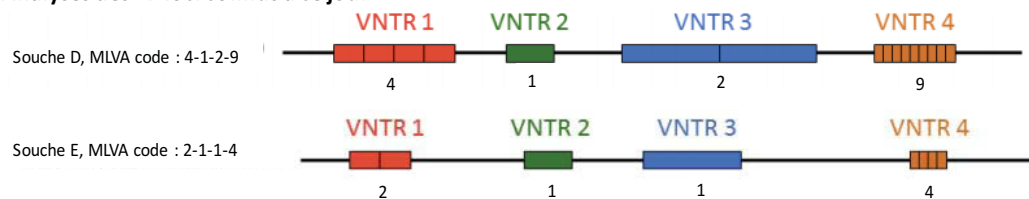


Figure 3 : Exemple d'analyse MLVA d'un locus de 3 souches de *C. burnetii* différentes, d'après (Sobral et al., 2012).

Le principal avantage de la MLVA est qu'elle peut être mise en œuvre sur des échantillons prélevés sur le terrain, pour autant que la charge bactérienne soit suffisante. De plus, l'automatisation de la méthode permet d'obtenir des résultats rapides et à moindre coût.

II.5.1.2 MST

Une étude (Glazunova et al., 2005) a proposé un test MLST (*Multiple Loci Sequence Typing*) pour différencier les souches de *C. burnetii*. La méthode était basée sur le séquençage de 10 régions inter géniques courtes, dits gènes de ménage. Cent soixante-treize isolats d'origine diverse ont pu être séparés en 30 types de séquence différents. Cependant, le MLST cible des régions codantes et utilise des variations qui s'accumulent très lentement dans la population afin de décrire la situation épidémiologique sur une longue échelle de temps, telle que chez des bactéries comme *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli* entre autres. Pour *C. burnetii*, une variabilité faible a ainsi été retrouvée sur ses gènes de ménage.

Ainsi, la méthode de typage *Multispacer Sequence Typing* (MST) a été privilégiée à la MLST pour *C. burnetii* (Di Domenico et al., 2014; Glazunova et al., 2005; Santos et al., 2012). Cette variante de la MLST est basée sur l'étude de séquences de régions du génome entre deux cadres de lecture ouverts (ORF) étant donné que les séquences inter géniques sont considérées comme potentiellement plus variables que celles des gènes codants, car soumises à une plus faible pression sélective.

La MST est une approche moins discriminante que la MLVA mais les deux sont complémentaires (Sidi-Boumedine and Rousset, 2011).

II.5.1.3 Élément d'insertion IS1111

La présence de 29 séquences d'insertion (IS) dont l'IS1111 codant une transposase, a été observée sur les génomes de *C. burnetii*, suggérant une plasticité génomique élevée. En 2006, Klee et al. proposaient une méthode de quantification relative du nombre d'éléments insérés sur le génome de *C. burnetii*. Puis en 2007, Denison et al. a établi un système de génotypage ciblant par PCR quatre de ces séquences d'insertion (Denison et al., 2007). L'algorithme proposé par Denison et al. a permis une classification des isolats en 5 groupes génomiques (I à V), parmi les six groupes déjà décrits par différents auteurs. L'avantage de cette méthode est sa grande reproductibilité et répétabilité inter-laboratoire. Une version améliorée de cette méthode utilise la variation du nombre de répétitions dans les régions en amont des éléments IS1111 et a permis d'augmenter la puissance discriminatoire de la méthode (Hanczaruk et al., 2009). Cependant, le pouvoir discriminant de cette méthode reste bien inférieur à ceux des méthodes MST et MLVA décrites précédemment.

II.5.1.4 SNP

Le génotypage par Single-Nucleotid Polymorphism (SNP) se base sur la détection des polymorphismes dus au changement d'une seule base nucléotidique dans les séquences des génomes des souches analysées. Un nouveau test a été développé, basé sur l'utilisation d'une méthode qPCR mettant en concurrence deux sondes TaqMan-MGB (Minor Groove Binder) qui diffèrent entre-elles par un nucléotide et leur fluorochrome (FAM ou HEX), (Huijsmans et al., 2011). Un panel de dix SNP, sept situés sur des gènes monocopies et trois situés sur un gène multicopies (IS1111), a permis la distinction de neuf génotypes SNP parmi 28 souches de *C. burnetii*.

Bien qu'une bonne performance du typage SNP ait été constatée, 14 types MLVA différents ont été décrits dans le même groupe SNP d'isolats testés (Sidi-Boumedine and Rousset, 2011). En revanche, la méthode SNP présente l'avantage d'être utilisable avec des échantillons

vétérinaires faiblement chargés en *C. burnetii* (Huijsmans et al., 2011) et de fournir des informations spécifiques sur les relations évolutives entre les souches de *C. burnetii*.

II.5.1.5 RFLP

Aujourd'hui, les nouvelles techniques de typage décrites précédemment sont préférées à la méthode par Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), qui nécessite d'être appliquée sur de l'ADN de haute qualité et de travailler sur des échantillons très fortement chargés en ADN génomique. De plus, les temps de manipulation et d'attente, les difficultés d'hybridation des sondes et l'utilisation de systèmes de détection basés soit sur des isotopes radioactifs soit sur des réactifs biochimiques constituent des contraintes supplémentaires.

Les fragments d'ADN obtenus, nommés fragments de restriction, *via* l'action d'une enzyme de restriction sont ensuite séparés selon leur longueur par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel obtenu est ensuite analysé par Southern Blotting et révélé avec une ou plusieurs sondes. L'analyse ancienne des polymorphismes de longueur des fragments de restriction sur le génome de *C. burnetii* a révélé une grande hétérogénéité dans les profils de bandes d'électrophorèse obtenus. Ce résultat est synonyme d'une potentielle diversité génétique entre les isolats de *C. burnetii*. En effet, cette méthode (Hendrix et al., 1991) a permis de catégoriser 32 isolats bactériens en six groupes génomiques distincts (I à VI). Une variance génomique supplémentaire a ensuite été décrite par (Jager et al., 1998) *via* l'analyse de 80 isolats supplémentaires. La différenciation de *C. burnetii* a également été obtenue par analyse séquentielle et/ou par PCR-RFLP ciblant les gènes monocopie *icd* (codant isocitrate déshydrogénase - (Andoh et al., 2004; Van Nguyen and Hirai, 1999), *comI* (codant une protéine immunoréactive associée à une membrane externe - (Hendrix et al., 1991; Sekeyova et al., 1999) et *mucZ* (connu pour conférer une propriété mucoïde aux bactéries - (Sekeyova et al., 1999)).

II.5.2 Séquençage total du génome

L'analyse des génomes complets est à ce jour la méthode la plus complète, à court ou moyen termes, dans la description des souches de *C. burnetii*. En revanche, cette analyse est fastidieuse et coûteuse à mettre en oeuvre, et l'analyse des résultats est longue et complexe.

Le premier génome de *C. burnetii*, la souche RSA493 isolée d'une tique en 1935, a été séquencé en 2003 (Seshadri et al., 2003). Le génome de cette souche est composé d'un plasmide QpH1 de 37 393 pb et d'un chromosome de 1 995 275 pb. Depuis, six génomes complets de *C. burnetii* sont disponibles dans GenBank (Beare et al., 2009; D'Amato et al., 2015; D'Amato et al., 2014c) et seize génomes incomplets peuvent également être trouvés (D'Amato et al., 2014a; D'Amato

et al., 2014b; D'Amato et al., 2014c; Rouli et al., 2012; Sidi-Boumedine et al., 2014; Walter et al., 2014).

En 2009, Beare et al. ont effectué une analyse génomique comparative de quatre souches et ont trouvé un total de 125 pseudogènes, dont 65 étaient hautement conservés, et 8 familles de séquences d'insertion (Beare et al., 2009). Ces caractéristiques étaient cohérentes avec la réduction du génome due à l'adaptation récente de *C. burnetii* à un mode de vie intracellulaire. Plus récemment, D'Amato et al., (2014) ont effectué une analyse pangénomique des souches séquencées de *C. burnetii* (D'Amato et al., 2014c). Cette analyse a révélé que certaines souches contenaient soit l'un des plasmides QpRS, QpH1 ou QpDV, soit que leur séquence plasmidique était intégrée au chromosome bactérien. Cette variabilité suggère des différences génétiques liées à une potentielle plasticité plasmidique des souches de *C. burnetii*.

Au total, 13 542 gènes de base sont partagés par toutes les souches, 498 gènes accessoires ont été trouvés sur certaines souches et 88 gènes uniques sur une seule souche (D'Amato et al., 2014c). Les souches de *C. burnetii* partagent donc une forte similarité génomique, avec un pangénome proche. Cependant, les particularités observées sur certaines souches suggèrent des liens possibles entre leurs caractéristiques génomiques et leurs virulences.

II.6 Caractérisation phénotypique

Au-delà de la caractérisation génotypique des souches circulantes entre les différentes espèces animales, il est indispensable de définir la pathogénicité de ces souches afin d'optimiser les mesures de contrôle de la fièvre Q. En effet, une meilleure connaissance de la clinique chez les animaux domestiques et chez l'Homme ainsi que sur modèles expérimentaux en laboratoire, permettra une meilleure caractérisation phénotypique des isolats de *C. burnetii*. Plusieurs protocoles sont déjà décrits dans la littérature et des données de virulence sur certaines souches de référence sont également disponibles.

II.6.1 Isolement à partir d'échantillons de terrain

C. burnetii étant une bactérie intracellulaire, son isolement et sa culture en laboratoire sont long et fastidieux et doivent être réalisés en zone de confinement L3 (Biosafety Level 3 : BSL3). De plus, l'isolement de *C. burnetii* ne fonctionne qu'à partir d'œufs embryonnés, d'animaux de laboratoire ou de cultures de cellules de mammifères.

L'isolement par broyage d'organes d'animaux de laboratoire infectés (rate le plus souvent) constitue généralement une première étape avant de passer sur culture cellulaire (type HEL ou SFT). Récemment, le premier isolement de *C. burnetii* sur milieu axénique à partir d'une

valvule cardiaque d'un patient a été rapporté en utilisant du milieu acidifié par du citrate de cystéine (Boden et al., 2015). Cette nouvelle possibilité pourrait faciliter considérablement la culture de *C. burnetii* à partir d'échantillons cliniques. Néanmoins, seules peu de souches ont été isolées dans le monde, dont l'immense majorité proviennent de cas humains.

II.6.2 Test de viabilité : PCR avec ethidium ou propidium monoazide

Dans le cadre des modèles d'infection, la détermination de la dose infectante doit nécessairement être calibrée. Plusieurs méthodes ont été décrites afin d'estimer le nombre de bactéries vivantes et donc potentiellement infectantes dans l'inoculum. Celles-ci combinent la qPCR classique avec l'utilisation d'un agent intercalant : l'éthidium monoazide (EMA) ou le propidium monoazide (PMA). Cet agent intercalant pénètre sélectivement dans les cellules mortes ou présentant des dommages membranaires. Une photolyse de l'EMA ou du PMA permet la formation de nitrènes qui forment ensuite des liaisons covalentes avec les brins d'ADN des cellules mortes ou endommagées. Ainsi, seul l'ADN libéré des cellules intactes, considérées comme viables, sera amplifié. Parallèlement, une analyse de l'échantillon en qPCR classique permet de quantifier le nombre de bactéries totales dans l'échantillon et ainsi déterminer le ratio de cellules viables et non viables (Figure 4).

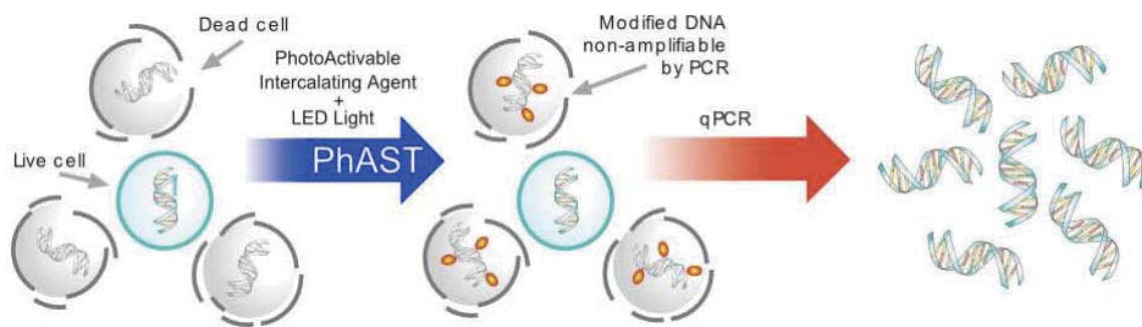


Figure 4 : Représentation schématique de la méthode PMA ou EMA rt-PVR (GenIUL)

Les bactéries ayant une membrane intacte (en bleu sur le schéma) ne permettent pas à l'agent intercalant de pénétrer. Ainsi, la détection de l'ADN par rt-PCR n'est pas perturbée contrairement aux bactéries ayant une membrane endommagée (en gris sur le schéma).

Ces tests de viabilité sont largement utilisés pour d'autres espèces bactériennes : *Pseudomonas aeruginosa* (Rieder et al., 2008), *Mycobacterium tuberculosis* (Pholwat et al., 2011),

Campylobacter jejuni (He and Chen, 2010), *Zygosaccharomyces bailii* (Rawsthorne and Phister, 2009) entre autres.

Toutefois, une récente étude sur *C. burnetii* a montré une nette différence de marquage des cellules entre les deux agents intercalants. Dans les échantillons traités au PMA, 50 à 60% des cellules vivantes étaient détectées, alors que dans les échantillons traités au EMA, seules quelques cellules (1 à 2%) étaient détectées viables sur la base de l'amplification d'ADN par rapport aux échantillons non traités (Kuley et al., 2015). La mise au point d'outils spécifiques et sensibles des bactéries vivantes manque cruellement aujourd'hui afin d'estimer plus précisément le risque infectieux et zoonotique des élevages.

II.6.3 Modèles d'infections

II.6.3.1 In vitro sur lignées macrophagiques

Les systèmes *in vitro* basés sur la culture cellulaire restent limités pour *C. burnetii*, essentiellement en raison de la transformation rapide de la bactérie en forme dite avirulente. En effet, la phase II est caractérisée par la perte d'une partie du LPS considérée comme un des facteurs d'avirulence caractérisant les bactéries, contrairement aux bactéries en phase I (paragraphe II.1.1). Le problème majeur dans la comparaison des modèles d'infection *in vitro* à *C. burnetii* est le manque de protocoles standardisés en termes de lignées cellulaires à utiliser ou de multiplicité d'infection cellulaire (MOI) à appliquer selon les lignées cellulaires sélectionnées. De plus, le nombre d'études testant la cinétique de multiplication de *C. burnetii* sur culture cellulaire est extrêmement limitée (Kuley et al., 2015; Mori et al., 2013).

II.6.3.2 In vivo sur souris

Les souris A/J et CD1 sont décrites comme plus sensibles à l'infection par *C. burnetii*, avec un taux de mortalité plus élevé que chez les souris BALB/c ou C57L/6 (Scott et al., 1987). Le modèle souris A/J peut être utilisé pour évaluer la réponse immunitaire à l'infection par *C. burnetii* et l'efficacité de vaccins (Scott et al., 1987). Les souris BALB/c et C57BL/6 présentent des signes d'infection transitoires sans aucun décès, ces lignées sont donc considérées comme résistantes à l'infection par *C. burnetii*. En revanche, les souris « nude » et SCID présentent des signes durables et sévères de la maladie allant le plus souvent jusqu'au décès. Ces deux lignées peuvent être utilisées pour évaluer le rôle de l'immunité à médiation cellulaire dans la défense de l'hôte contre la fièvre Q (Kishimoto et al., 1978). Enfin, les souris transgéniques interleukine-10 (IL-10), qui sur-expriment l'IL-10 dans leurs macrophages, peuvent être employées pour étudier l'infection persistante de *C. burnetii* (Ghigo et al., 2001; Meghari et al., 2008).

II.6.3.3 Autres modèles

Depuis les années 1960, en plus des souris, plusieurs modèles animaux tels que des cobayes, des lapins ou des primates non humains, ont été utilisés pour décrire la pathogénicité de *C. burnetii* (Bewley, 2013; Kishimoto et al., 1981; Marchette et al., 1962; Sidwell and Gebhardt, 1962). Cependant, aucun de ces modèles n'est représentatif de la maladie chez les ruminants domestiques ou chez l'Homme. Les cobayes sont globalement les plus sensibles aux infections par *C. burnetii*, et conduisent le plus souvent à la mort de l'animal. Ils sont fréquemment utilisés pour étudier la virulence, la dissémination et l'infection persistante de *C. burnetii* (La Scola et al., 1997; Russell-Lodrigue et al., 2009; Russell-Lodrigue et al., 2006). Les lapins ont également été utilisés pour étudier la capacité des souches Priscilla et Nine Mile RSA 493 à induire des endocardites. Enfin, le modèle sur singes cynomolgus a montré une réponse à l'infection par *C. burnetii* très proche de celle observée chez l'Homme. Cette espèce a été utilisée pour étudier l'efficacité du vaccin vis-à-vis de *C. burnetii* (Gonder et al., 1979; Kishimoto et al., 1981; Kishimoto et al., 1978; Waag et al., 1999).

Plusieurs études (Russell-Lodrigue et al., 2006; Waag et al., 1991) suggèrent les souris comme modèle de choix pour étudier l'infection par *C. burnetii*. Les souris mâles sont considérées comme plus sensibles aux infections par *C. burnetii* que les souris femelles. En effet, les hormones femelles et notamment le 17 β -oestradiol ont des effets protecteurs (Leone et al., 2004).

L'utilisation de systèmes *in vitro* à base de macrophages reste limitée étant donné que la bactérie perd son pouvoir pathogène au bout de 5 passages (Mori et al., 2013).

II.6.4 Virulence des souches séquencées

A ce jour, seule la virulence de 3 souches (Cb 175, DOG UTAD, Z3055) sur les 298 isolats disponibles dans le monde a actuellement été partiellement investiguée. La souche Cb175 isolée chez un patient atteint d'endocardite à Cayenne en Guyane française se caractérise par une délétion de 6 105 pb. Cette délétion n'a été observée sur aucun autre isolat provenant d'autres régions du monde (Harris et al., 2013). Cb175 appartient au groupe génotypique MST 17, dans lequel d'autres souches de Guyane française correspondraient aux souches les plus virulentes jamais décrites. En effet, la plus haute prévalence de pneumonies humaines dues à *C. burnetii* a été décrite dans cette région du globe. De façon intéressante, cette réduction du génome a déjà été observée chez de nombreuses souches fortement épidémiques (Merhej and Raoult, 2011), par exemple chez des espèces bactériennes comme *Rickettsia* ou *Mycobacterium* spp. où

l'hyperpathogénicité est induite par la suppression de gènes non-virulents plutôt que par l'acquisition de facteurs de virulence (Cole et al., 2001; Fournier et al., 2009). Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires afin de vérifier si cette hyper virulence est réellement liée à la délétion décrite précédemment.

Aux Pays-Bas, où la plus grande épidémie a été recensée à ce jour, un clone hyper-virulent (NL-3262) aurait circulé de façon prédominante entre 2009 et 2012. La séquence complète de son génome n'est pas encore disponible mais le sera très prochainement (Kuley et al., 2016). Cependant, une souche proche appartenant au même génotype (MST 33) a été isolée d'une brebis allemande (la souche Z3055) puis séquencée. Comparée à d'autres génomes de *C. burnetii* (GenBank), de nombreuses mutations ont été observées sur les gènes codant des protéines du domaine répétitif ankyrine ou encore impliquées dans la traduction et la transcription (D'Amato et al., 2014c). De façon hypothétique, la rapide propagation du clone aux Pays-Bas serait liée à des mutations des antigènes de surface bactériens conduisant à une absence de reconnaissance immunitaire chez une population naïve.

Au Canada, la majorité des souches isolées appartiennent au génotype MST 21. Ces souches ont été décrites chez des patients ayant été potentiellement exposées à *C. burnetii* lors des mises bas de leurs animaux de compagnie (chats ou chiens) (Buhariwalla et al., 1996; Marrie et al., 1988). La souche DOG UTAD a été isolée à partir de la muqueuse utérine d'une chienne ayant mis bas naturellement et étant à l'origine d'une épidémie familiale de fièvre Q (D'Amato et al., 2014a). L'ensemble du génome de la souche DOG UTAD, était très proche de la souche Q212, isolée d'un patient atteint d'endocardite due à *C. burnetii* au Canada aussi. La virulence de la souche DOG UTAD serait liée à l'absence de plasmides caractéristiques des souches isolées au Canada actuellement (D'Amato et al., 2014a).

Enfin, une ancienne étude avait suggéré qu'une corrélation existait entre les types de plasmides contenus dans les souches et leur virulence. En effet, les souches contenant un plasmide QpH1 étaient associées à une "fièvre Q aiguë" alors que les souches avec un plasmide QpRS étaient associées à une "fièvre Q chronique" (Hendrix et al., 1991). Cependant, cette hypothèse est aujourd'hui contestée car chacun des plasmides a pu être détecté chez des patients atteints de fièvre Q chronique pour QpH1 et aiguë pour QpRS. De plus, un nouveau plasmide, appelé QpDV, serait associé aux deux formes de la maladie. Néanmoins, dans une étude récente, Angelakis et al. ont montré en 2013 que ce plasmide correspondrait à des souches provoquant en majorité des fausses couches (Angelakis et al., 2013). Cette corrélation nécessite encore d'être confirmée par des études complémentaires.

Résumé et annonce de la partie suivante

Au regard des questions encore en suspens sur l'épidémiologie moléculaire de *C. burnetii*, nous avons dans un premier temps évalué la dynamique de circulation de la bactérie en élevages de ruminants domestiques en France. Pour cela, nous avons réalisé un suivi longitudinal en troupeau ovin (espèce la plus fréquemment impliquée dans l'apparition de cas humains en France ; (OIE, 2015), déterminé la diversité génotypique des souches circulantes chez les ruminants domestiques et leur virulence à partir de deux modèles, un *in vivo* et un *in vitro*. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'exposition à *C. burnetii* d'une espèce animale autre que les réservoirs principaux. Pour cela, nous avons pris l'exemple du cheval afin de déterminer si cette espèce est susceptible de constituer une espèce sentinelle pertinente pour l'Homme (Figure 5).

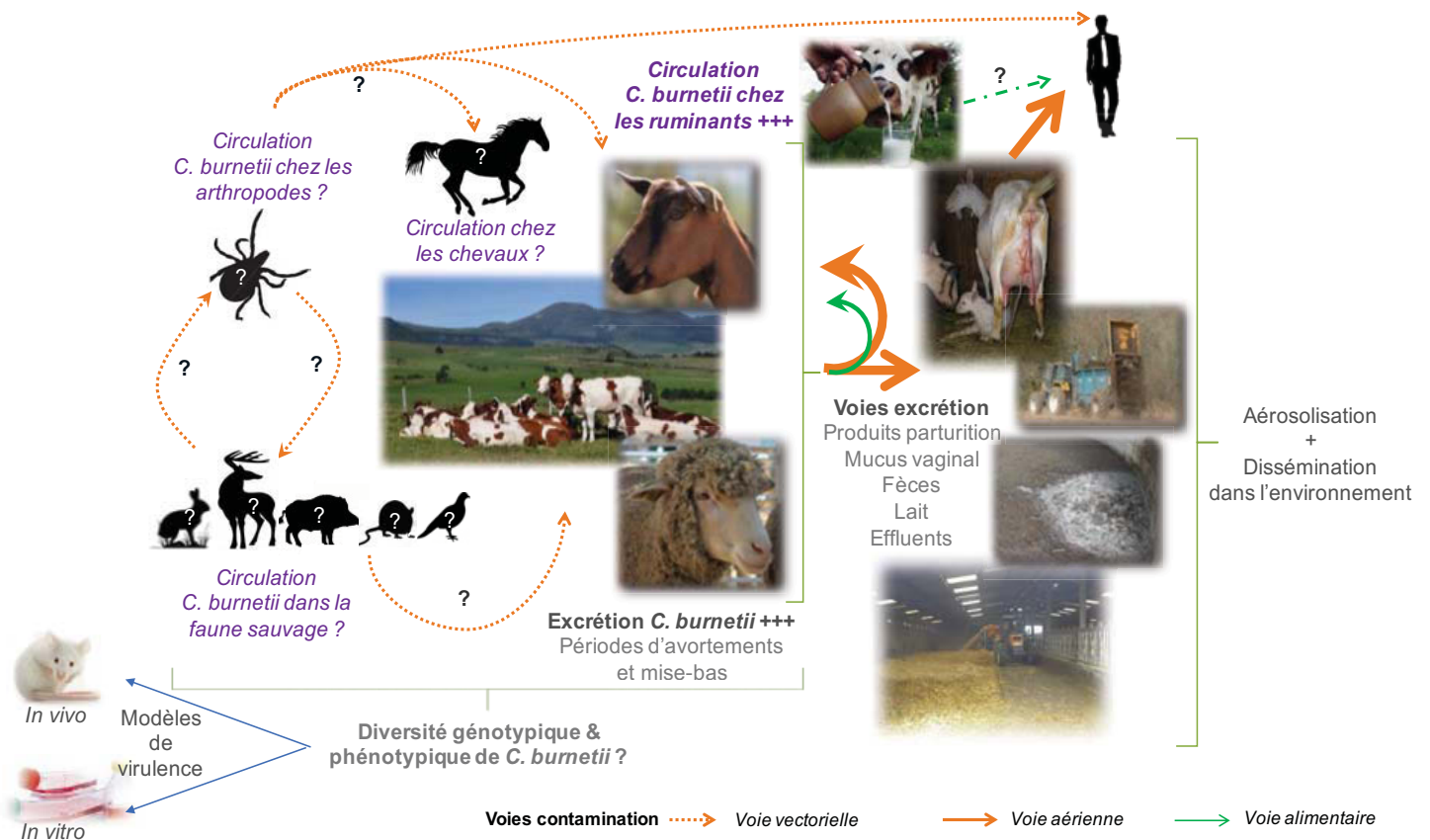


Figure 5 : Cycle épidémiologique de la fièvre Q au regard des connaissances actuelles sur cette maladie.

CHAPITRE III

**DESCRIPTION ET CARACTERISATION DE LA
DYNAMIQUE DE CIRCULATION DE *COXIELLA*
BURNETII EN ELEVAGES DE RUMINANTS
DOMESTIQUES NATURELLEMENT INFECTÉS**

L'identification des femelles et des troupeaux infectés présentant une excrétion active de *C. burnetii* est un préalable indispensable à la mise en place de mesures de contrôle de l'infection. Chez les ruminants, différentes voies d'excrétion ont été décrites dans la littérature, dont les principales sont les produits de parturition et le mucus vaginal (Berri et al., 2002; de Cremoux et al., 2012b; Rousset et al., 2009), les fèces (Berri et al., 2002) et le lait. Toutefois, les experts s'accordent aujourd'hui pour considérer le lait comme une voie secondaire dans l'épidémiologie de la fièvre Q au regard des faibles charges détectées (Guatteo et al., 2006a; Guatteo et al., 2007; OIE, 2015; Rodolakis et al., 2007). De plus, peu d'études se sont intéressées à la dynamique d'excrétion (intensité et cinétique) au cours du temps dans ces différentes voies et de façon concomitante, notamment en troupeaux ovins. Ainsi, nous manquons clairement de connaissances sur les sources d'infection et les modalités de dissémination de la bactérie dans les troupeaux. Dans ce contexte, il est difficile d'estimer précisément la prévalence des animaux infectés et/ou excréteurs afin de mesurer l'étendue de l'infection et de suivre son évolution au cours du temps. Des indicateurs biologiques (lots de femelles à cibler, voies d'excrétion à investiguer, périodes de prélèvements à privilégier et méthodes d'analyses à envisager) pertinents à utiliser sur le terrain sont pourtant nécessaires afin d'améliorer la surveillance, faciliter le diagnostic et optimiser la gestion sanitaire de la fièvre Q dans les élevages.

L'évaluation du risque de transmission de *C. burnetii*, entre les trois espèces de ruminants domestiques et *in fine* le risque de transmission à l'Homme, doit également intégrer des connaissances génotypiques relatives à la circulation des souches dans les élevages. Dans ce cadre, la technique MLVA apparaît aujourd'hui comme une méthode de choix pour différencier les souches de *C. burnetii* (Sidi-Boumedine and Rousset, 2011). L'automatisation de la technique permet ainsi d'obtenir des résultats rapides et de moins en moins coûteux, potentiellement utilisables à terme en routine. Ces informations sont cruciales pour comprendre la dynamique de circulation de la bactérie et évaluer la potentielle transmission zoonotique des souches.

Comme précisé précédemment, l'infection est le plus fréquemment asymptomatique chez les ruminants domestiques (OIE, 2015) et chez l'Homme (Eldin et al., 2017). Toutefois, en cas de formes cliniques, peu d'études se sont intéressées à la virulence des souches selon les espèces, bien que des différences en termes de signes cliniques ont été décrites sur le terrain (EFSA, 2010). Une meilleure caractérisation phénotypique des souches pourrait ainsi faciliter la détection, le suivi puis la mise en place de plan de gestion de la fièvre Q dans les élevages et rationaliser les coûts vétérinaires pour les éleveurs.

Ainsi, l'objectif de cette partie est triple :

- Caractériser la dynamique de circulation de la bactérie dans un élevage ovin naturellement infecté : détection d'anticorps spécifiques de *C. burnetii* dans le sang et le lait des femelles suivies ; détection de l'ADN bactérien dans le mucus vaginal, les fèces et le lait de ces femelles, et dans l'air et les poussières des bâtiments d'élevage ; et description de la diversité des génotypes circulants dans cet élevage.
- Caractériser d'un point de vue génotypique les souches de *C. burnetii* circulantes dans des élevages de ruminants domestiques naturellement infectés à partir de produits de parturition collectés en contexte d'avortement.
- Caractériser d'un point de vue phénotypique les souches les plus représentatives de la diversité génotypique en France *via* deux modèles de virulence : un modèle *in vivo* sur souris et un modèle *in vitro* sur lignées macrophagiques ovine et bovine.

III.1 Dynamique de circulation de *Coxiella burnetii* en élevage ovin

Dans ce paragraphe, nous étudierons la dynamique de circulation de *C. burnetii* dans un élevage ovin naturellement infecté. Bien que les ovins soient souvent impliqués dans l'apparition de cas humains groupés (OIE, 2015), peu d'études se sont intéressées à la dynamique de circulation de la bactérie chez les ovins. Cette étude vise donc principalement à fournir des outils essentiels pour évaluer rapidement et à moindre coût l'infectiosité des élevages de petits ruminants domestiques.

III.1.1 Méthodologie générale – Choix de l'élevage

En 2010, un troupeau ovin naturellement infecté, situé en Aveyron dans la zone d'appellation d'origine protégée (AOP) « Roquefort », a été ciblé pour l'étude de la circulation intra-troupeau de *C. burnetii* (Figure 6).

Plusieurs motivations ont conduit au recrutement de cet élevage. Premièrement, un diagnostic différentiel d'avortement sur 4 des 11 femelles laitières avortées a permis d'imputer les avortements à *C. burnetii*. Deuxièmement, l'intervention du même vétérinaire traitant sur cet élevage depuis 1999 permettait d'avoir accès à l'historique sanitaire détaillé de ce troupeau. De plus, l'élevage avait déjà fait l'objet d'un suivi longitudinal entre 2008 et 2009 dans le cadre d'une thèse relative à la Chlamydie, suite à des vagues d'avortements imputables à des Chlamydiae en 2008.

Enfin, cet élevage se compose de deux troupeaux, un allaitant et un laitier, suggérant une possible transmission de la fièvre Q d'un troupeau à l'autre. En effet, les deux troupeaux sont conduit en parallèle avec des mises-bas à des périodes distinctes et les brebis laitières réformées sont généralement transférées dans le troupeau allaitant, facilitant ainsi la circulation de la bactérie dans les bâtiments constitutifs de cet élevage.

Pour toutes ces raisons, un suivi longitudinal a été mis en place entre mi-novembre 2010, soit 3 semaines après le début d'une nouvelle vague d'avortements, et décembre 2011 afin de mieux comprendre la dynamique de circulation de *C. burnetii* dans un élevage naturellement infecté.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai analysé les résultats sérologiques et PCR obtenus au cours de ce suivi longitudinal (articles 1 et 2).

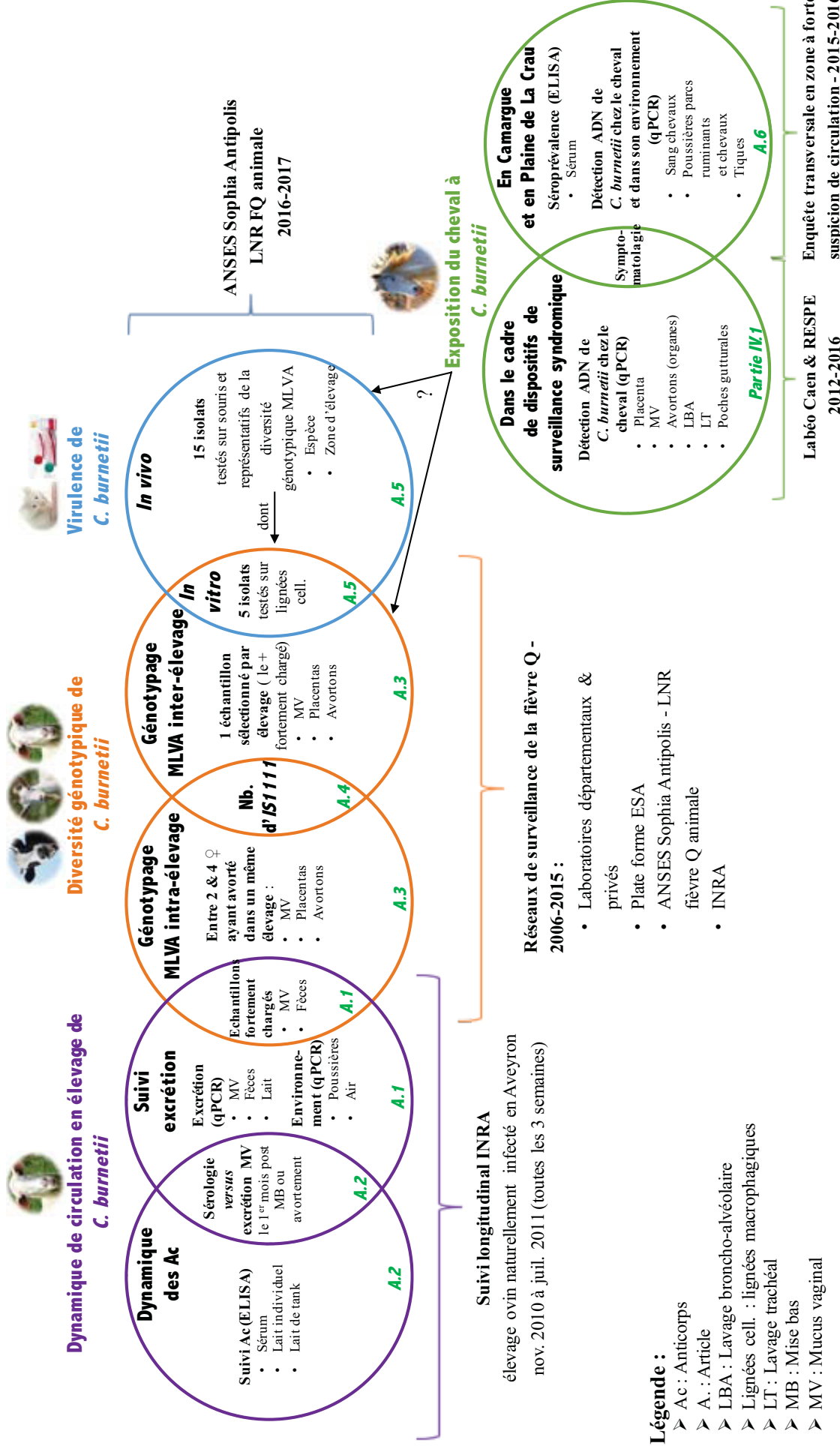


Figure 6 : Schéma représentatif des matrices étudiées dans les différentes études réalisées au cours de ce travail de thèse

III.1.2 Article 1: *Coxiella burnetii* circulation in a naturally infected flock of dairy sheep: shedding dynamics, environmental contamination, and genotype diversity

III.1.2.1 Résumé

Contexte. Pour prévenir et contrôler les maladies infectieuses, il est crucial de comprendre les interactions entre agents infectieux et leur hôte. Pour la fièvre Q, la majorité des cas humains recensés ces dernières années en Europe semblent être associés à des contacts directs ou indirects avec des ruminants domestiques et en particulier avec des petits ruminants. Bien que la maladie ait déjà fait l'objet d'études approfondies en troupeaux caprins, notamment à la suite de l'épizootie entre 2007 et 2012 aux Pays-Bas, son cycle épidémiologique global est très complexe et un manque évident de connaissances subsiste. Des études ont également été réalisées en troupeaux bovins (Agerholm, 2013; Guatteo et al., 2006b; Guatteo et al., 2012; Guatteo et al., 2011; Ruiz-Fons et al., 2011), toutefois la dynamique de circulation de *C. burnetii* en troupeaux ovins reste largement mal comprise.

Objectifs. Par conséquent, nous avons réalisé une étude dans un troupeau ovin naturellement infecté sur une cohorte de femelle laitières afin de : (i) décrire la cinétique et l'intensité de l'excrétion individuelle (charges bactériennes et proportions de femelles excrétrices) à travers différentes voies (mucus vaginal, fèces et lait) ; (ii) comparer les profils d'excrétion observés selon les différentes catégories de femelles suivies (femelles avortées *versus* femelles non-avortées et femelles multipares *versus* femelles primipares) ; (iii) évaluer la diversité génotypique MLVA des souches de *C. burnetii* circulant en intra-élevage; et (iv) déterminer les niveaux de contamination environnementale des bâtiments d'élevage dans l'air et les poussières par détection de l'ADN de *C. burnetii*.

Résultats. Nous avons confirmé, dans cette étude, que les charges de *C. burnetii* étaient plus élevées dans le mucus vaginal et les fèces que dans le lait. Les plus fortes charges ont été détectées durant les trois premières semaines après l'avortement ou la mise-bas. Les femelles avortées ont tendance à excréter *C. burnetii* plus longtemps et à des niveaux de charges plus élevées que les femelles non-avortées dans le mucus vaginal, les fèces et le lait. Nous observons la même tendance entre les femelles non-avortées primipares et les femelles non-avortées multipares dans les trois voies d'excrétion investiguées. Pour certaines femelles l'excrétion semble être intermittente dans les fèces.

De plus, six sous-groupes génotypiques ont été identifiés dans cet élevage. Pour une même femelle nous avons détecté la présence de différents profils génotypiques selon la période et la voie de prélèvement ; les sous-groupes génotypiques identifiés étaient indépendants du statut clinique de la femelle.

Enfin, *C. burnetii* a été détectée dans tous les échantillons d'air et de poussière, avec des charges bactériennes plus élevées dans les prélèvements de poussières.

Conclusions. Il s'agit ici de la première étude qui compare l'excrétion concomitamment dans les 3 voies d'excrétion chez les ovins. Ce suivi fournit des indicateurs essentiels à une gestion intégrée de la fièvre Q dans les troupeaux afin de limiter l'apparition de cas humains dans l'environnement des élevages infectés. Toutefois, ce suivi souligne également la difficulté d'évaluer le statut excréteur d'une brebis sur la base d'un résultat PCR obtenu à partir d'un seul type d'échantillon biologique. En effet, l'intermittence d'excrétion observée au cours du temps peut potentiellement biaiser l'interprétation du statut excréteur d'une femelle selon la voie d'excrétion considérée.



III.1.2.2 Article

Circulation of *Coxiella burnetii* in a Naturally Infected Flock of Dairy Sheep: Shedding Dynamics, Environmental Contamination, and Genotype Diversity

A. Joulé,^{a,b} K. Laroucau,^c X. Bailly,^a M. Prigent,^d P. Gasqui,^a E. Lepetitcolin,^e B. Blanchard,^f E. Rousset,^d K. Sidi-Boumedine,^d E. Jourdain^a

French National Institute for Agricultural Research, UR0346 Animal Epidemiology Unit, Saint-Genès Champanelle, France^a; VetAgro Sup Veterinary Campus, Marcy l'Etoile, France^b; Anses, Laboratory of Maisons-Alfort, Bacterial Zoonosis Unit, Maisons-Alfort, France^c; Anses, Laboratory of Sophia-Antipolis, Animal Q Fever Unit, Sophia-Antipolis, France^d; Unicor, Millau, France^e; AdiaGene, Saint Brieuc, France^f

Q fever is a worldwide zoonosis caused by *Coxiella burnetii*. Domestic ruminants are considered to be the main reservoir. Sheep, in particular, may frequently cause outbreaks in humans. Because within-flock circulation data are essential to implementing optimal management strategies, we performed a follow-up study of a naturally infected flock of dairy sheep. We aimed to (i) describe *C. burnetii* shedding dynamics by sampling vaginal mucus, feces, and milk, (ii) assess circulating strain diversity, and (iii) quantify barn environmental contamination. For 8 months, we sampled vaginal mucus and feces every 3 weeks from aborting and nonaborting ewes ($n = 11$ and $n = 26$, respectively); for lactating females, milk was obtained as well. We also sampled vaginal mucus from nine ewe lambs. Dust and air samples were collected every 3 and 6 weeks, respectively. All samples were screened using real-time PCR, and strongly positive samples were further analyzed using quantitative PCR. Vaginal and fecal samples with sufficient bacterial burdens were then genotyped by multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) using 17 markers. *C. burnetii* burdens were higher in vaginal mucus and feces than in milk, and they peaked in the first 3 weeks post-abortion or postpartum. Primiparous females and aborting females tended to shed *C. burnetii* longer and have higher bacterial burdens than nonaborting and multiparous females. Six genotype clusters were identified; they were independent of abortion status, and within-individual genotype diversity was observed. *C. burnetii* was also detected in air and dust samples. Further studies should determine whether the within-flock circulation dynamics observed here are generalizable.

Q fever is a widespread zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, a Gram-negative intracellular bacterium that has been reported in a broad range of host species. Livestock, especially small ruminants, are the main sources of human infections (1–3). In domestic ruminants, Q fever's major clinical manifestations are abortions and stillbirths, whose occurrence may translate into significant economic losses (1, 3). In humans, *C. burnetii* infections range from asymptomatic to severe. Acute forms of the disease may result in high fevers and severe pneumonia or hepatitis, and chronic forms are strongly debilitating and may be fatal when endocarditis develops in patients with underlying heart disease (4–6).

Animals and humans become infected essentially through the inhalation of airborne particles contaminated with *C. burnetii* (3, 7, 8). Contaminated dust particles may remain infectious for long periods of time due to the capacity of the bacterium to differentiate into highly resistant spore-like forms (9, 10). Consequently, knowledge of *C. burnetii*'s sources and shedding dynamics is essential to assessing the risks of disease transmission and pathogen persistence. On livestock farms, *C. burnetii* DNA has been found in various environmental matrices, such as dust (11–13) and aerosols (14–16). However, studies that examine the relationship between environmental contamination levels and the clinical status and shedding dynamics of ruminant herds are lacking.

Although it is known that *C. burnetii* may be shed by infected domestic ruminants via birth products, vaginal secretions, feces, and milk (1, 17–22), studies looking at the duration of individual shedding and the relative importance of the different shedding routes have yielded inconsistent results (3, 17–19, 21, 23). How-

ever, longitudinal follow-up studies performed on cattle (18, 24) and goat (21, 25–27) farms have been particularly valuable in providing descriptive data on individual shedding patterns and revealing the factors that may affect shedding dynamics. To date, no such study exists for sheep, despite the fact that sheep are frequently associated with clusters of human Q fever cases in European countries (28–30).

This study aimed to better characterize the dynamics of *C. burnetii* circulation in a naturally infected flock of sheep. First, we described the kinetics and intensity of individual shedding (i.e., bacterial burdens and relative numbers of shedders) via different routes (i.e., vaginal mucus, feces, and milk). Second, we compared the shedding patterns observed for different categories of females (i.e., females that had aborted versus females that had not aborted and multiparous females versus primiparous females). Third, we

Received 3 July 2015 Accepted 31 July 2015

Accepted manuscript posted online 7 August 2015

Citation Joulé A, Laroucau K, Bailly X, Prigent M, Gasqui P, Lepetitcolin E, Blanchard B, Rousset E, Sidi-Boumedine K, Jourdain E. 2015. Circulation of *Coxiella burnetii* in a naturally infected flock of dairy sheep: shedding dynamics, environmental contamination, and genotype diversity. *Appl Environ Microbiol* 81:7253–7260. doi:10.1128/AEM.02180-15.

Editor: J. Björkroth

Address correspondence to E. Jourdain, elsa.jourdain@clermont.inra.fr.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.02180-15

assessed within-flock diversity of *C. burnetii* strains using multi-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA). Finally, we determined overall environmental contamination in the study barns by screening air and dust samples for *C. burnetii* DNA.

MATERIALS AND METHODS

Field sampling. (i) **Flock selection.** The study was carried out using a flock of 360 purebred Lacaune dairy sheep that contained 10 multiparous ewes that had recently aborted (here referred to as aborting females). Differential diagnosis of four of the aborting females suggested that *C. burnetii* was the etiologic agent. Furthermore, all results were negative for toxoplasmosis, chlamydiosis, listeriosis, salmonellosis, campylobacteriosis, and border disease. The females had not been vaccinated against Q fever before the start of the study. However, the farmer administered an inactivated vaccine (Coxevac; CEVA-Santé animale, Libourne, France) to each female in the flock, including ewe lambs, 2 months before they were mated. This occurred approximately 5 months into the study (i.e., from week 19 to 27 postpartum, depending on the particular ewe). The sheep were housed in three different barns referred to as A, B, and C; the above-mentioned abortions occurred in barn A, where the multiparous females were housed. Ten days after this abortion peak, the 10 aborting females were transferred to barn B, where a flock of 250 cross-bred meat ewes was housed. Another abortion occurred about 3 weeks after the start of the study, in barn C, where the primiparous ewes had been placed for their first lambing. All the primiparous ewes were then transferred into barn A with the multiparous females. Barn C was then solely dedicated to housing lambs.

(ii) **Animal sampling.** Overall, 37 adult females (11 aborting and 26 nonaborting; the latter group comprised 19 multiparous and 7 primiparous ewes) were followed for 8 months. In addition, nine ewe lambs, born to nine of the multiparous females being studied, were followed from the age of 3 months until their first lambing. Vaginal mucus and feces were collected from all the adult ewes; vaginal mucus was also obtained from the nine juvenile ewes. Milk was collected from the 26 lactating females. We aimed to sample each female every 3 weeks, but this was not always possible in practice. Also, for logistical reasons, we were able to obtain feces from only 17 of the 37 females during the first sampling period (i.e., 1 week after the start of the study). We also sampled vaginal mucus from 18 nonaborting females and 8 ewe lambs during the subsequent lambing season, which occurred 1 year after the start of the study. Dry and sterile cotton wool swabs were used to collect vaginal mucus from inside the ewes' vaginas. Feces samples were transferred directly from the ewes' rectums to individual plastic bags. Milk was collected in sterile flasks after the females' udders had been cleaned with alcohol wipes.

(iii) **Environmental sampling.** Dust sampling started 3 weeks after the abortion by the primiparous female (which corresponds to 7 weeks after the last abortion by a multiparous female). Dust samples were collected from each barn every 3 weeks using two different methods targeting cumulative and newly deposited dust. First, 16- by 10-cm cloths moistened with distilled water (SodiBox, France) were used to wipe up 100-cm² areas along 5 different fences or window ledges (80,000 cm² of surface area in total). Second, we used 9-cm sterile petri dishes to collect newly deposited dust; two petri dishes were used in barn A (241 cm² of dust sampled in total), and three petri dishes were used in barns B and C (361 cm² of dust sampled in total in each). Air samples were collected from all the barns the week that the primiparous female aborted. Afterwards, only barn A was sampled every 6 weeks for 7 months. Samples were collected using a Coriolis μ air sampler (Bertin Technologies, France) placed 30 cm above the litter. The airflow rate was set so as to collect 300 liters of air per minute. The sampling time ranged from 5 to 10 min, which meant that the mean sampling volume varied between 1.5 and 3.0 m³. All samples were stored at -80°C.

Laboratory analyses. (i) **DNA extraction and PCR assays.** A QIAamp DNA purification minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) was used to extract DNA from all the samples except the dust samples. For the latter, a

MagVet Universal isolation kit (Thermo Fisher Scientific/Life Technologies, Lissieu, France) was employed. All the DNA samples were then processed using nonquantitative PCR (nqPCR). For the vaginal mucus, feces, milk, and air samples, an Adiaet Cox real-time kit (AES-Chemunex/Adiagène, France) was employed. For the dust samples, an LSI VetMAX *Coxiella burnetii* Feces Environment real-time PCR kit (Thermo Fisher Scientific/Life Technologies, Lissieu, France) was used. Both kits targeted *C. burnetii*'s IS1111 multicopy insertion sequence and provide comparable results for vaginal mucus samples (31). The kits included an internal positive control, which allowed us to verify the efficiency of the DNA extractions and confirm the absence of PCR inhibitors. A real-time quantitative PCR method (qPCR) that targets the aforementioned IS1111 gene (31) was then used to quantify DNA burdens in all positive vaginal mucus and feces samples that displayed a cycle threshold (C_T) value of less than 30.5 (given the fact that a mean C_T value of 30.8 corresponds to 5 genome equivalents [GE]/ μ l according to the Adiaet Cox real-time kit validation report). We used two calibrated standards prepared from the Nine Mile phase II RSA 493 isolate (Anses Sophia-Antipolis, France). First, a suspension of quantified purified bacteria was used to check the reproducibility of the complete method (i.e., DNA extraction and PCR). Second, serial dilutions of genomic DNA reference material were used as quantitative standards. The limit of quantification (LOQ) of the method was assessed at 5×10^2 GE/ml according to the French standards NF-U47-601 and NF-U47-601 following an accuracy profile experiment (3 independent qPCR assays of 2 replicates with different known bacterial concentrations) as previously described (31). Then, for each matrix, we extrapolated a quantification threshold per unit volume (or mass or surface area) as follows: 1×10^3 GE/ml per swab, 6.6×10^3 GE per gram of feces, 0.15 GE per cm² of cloth, and 3.3 GE per cm² of petri dish. A similar approach was used to estimate the maximum LOQ per unit volume (LOQ_{max}) for the samples using the highest concentration of the Nine Mile standard (5×10^6 GE/ml): 5×10^6 GE per swab, 3.3×10^7 GE per gram of feces, 1.5×10^3 GE per cm² of cloth, and 3.3×10^4 GE per cm² of petri dish. A sheep was said to be a *C. burnetii* shedder on a given sampling day if at least one of its samples (i.e., vaginal mucus, feces, or milk) had DNA levels that were above the quantification thresholds.

(ii) **Genotyping methods.** MLVA typing was performed using 17 variable-number tandem-repeat (VNTR) markers from panels 1 and 2, as previously described elsewhere (32). DNA from the Nine Mile phase II strain (RSA 493 isolate) was used as a reference. For each marker, the number of repeats was determined by comparing the fragment length of the sample to the fragment length of the reference strain. Electrophoresis was performed using an Agilent DNA 7500 kit and an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Les Ulis, France) as described elsewhere (33). Only samples with bacterial burdens of greater than 10^4 GE per milliliter ($>10^4$ GE per swab and $>6.7 \times 10^4$ GE per gram of feces) were selected for genotyping. A total of 26 vaginal mucus samples and 2 feces samples obtained from 20 females met this requirement. Unfortunately, due to low DNA volumes, only 10 markers were tested in the case of 4 vaginal mucus samples. Repeats of unexpected size were sequenced to detect insertions and deletions as described previously (34). The coding of the MLVA markers was based on the methodology of Arricau-Bouvery et al. (32) and the new UPSUD MLVA recommendations (<http://mlva.upsud.fr/MLVAnet/spip.php?rubrique50>). We considered that strains displayed distinct genotypes when their number of repeats differed by at least one. We used a parsimony network to represent the distribution of genotype diversity at each locus.

(iii) **Statistical tests.** All the statistical analyses were carried out in R (R version 3.1.0). Our alpha level for statistical significance was set at 0.05. Relative numbers of shedders were compared using chi-square tests or using a Fisher exact test when one of the groups contained fewer than six shedders. Because parturition and abortion dates varied among ewes and because sampling was performed every 3 weeks, shedding duration was defined by observational period. For each female, the first week of the observational period was the week during which the female gave birth or

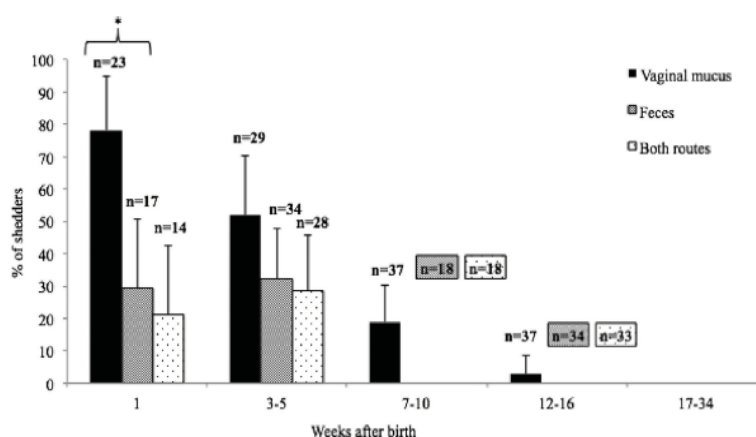


FIG 1 Frequency histogram showing the relative numbers of females shedding *Coxiella burnetii* during the weeks following parturition ($n = 26$) or abortion ($n = 11$). *, significant difference between vaginal and fecal shedding; 95% confidence intervals are represented with error bars. From week 17 to 34, the sample size varied from 17 to 26, depending on sampling routes.

aborted. Differences in shedding patterns for aborting versus nonaborting females and for primiparous versus multiparous females were tested for each observational period using the results for the vaginal mucus and feces samples.

RESULTS

A total of 423 vaginal mucus samples were obtained: 108 from the aborting females, 256 from the nonaborting females, and 59 from the juvenile females. After screening via nqPCR, 57 samples were further tested using qPCR, and 26 could be genotyped. Unfortunately, only 230 of the 357 feces samples could be analyzed via nqPCR for logistical reasons; of these, 15 were further tested using qPCR, and 2 were genotyped (another sample contained sufficient bacterial burdens but could not be genotyped due to low DNA volume). Finally, 93 milk samples were analyzed using nqPCR.

Coxiella burnetii shedding in vaginal mucus, feces, and milk.

While the milk samples all contained low bacterial burdens (all C_T values obtained with the nqPCR were <30.5), burdens were much higher in the vaginal mucus and feces samples: 9 vaginal and 15 fecal samples contained bacterial burdens equal to or higher than 5×10^6 GE per swab and 3.3×10^7 GE per gram of feces, respectively. Overall, shedding occurred via both the vaginal and fecal routes for 16 females (3 aborting and 13 nonaborting), but some females shed solely via their vaginal mucus ($n = 14$ [2 aborting and 12 nonaborting]). The first week following parturition/abortion, a significantly higher percentage of females shed *C. burnetii* via vaginal mucus (78%; $n = 23$) than via feces (29%, $n = 17$) (chi-square test, $P = 0.05$). However, this difference was no longer significant at 3 to 5 weeks postpartum (Fig. 1).

***Coxiella burnetii* shedding dynamics.** *C. burnetii* DNA was detected at high levels and in a large percentage of females during the first week following parturition/abortion; then, both bacterial burdens and the percentage of shedding females decreased, for both vaginal mucus and feces samples (Fig. 2 and 3). Unexpectedly, for some females, the nqPCR results were positive during the second sampling period even though they had been negative the first week postpartum ($n = 4$) or postabortion ($n = 1$). Overall, *C. burnetii* DNA was detected at levels above 6.6×10^3 GE per gram of feces in fecal samples and 1.0×10^3 GE per swab in vaginal mucus up to 7 and 12 weeks, respectively, following parturition/

abortion. Low levels of DNA (below 6.6×10^3 GE per gram of feces) were still present at up to 33 weeks in the feces of 3 nonaborting females. All the prelambing mucus samples obtained from the juvenile females were negative. However, for one of them, *C. burnetii* shedding was detected ($<1.0 \times 10^3$ GE per swab) on the lambing day.

Shedding patterns according to abortion and parity status.

Ewes that differed in abortion and parity status did not differ statistically in their shedding durations or bacterial burdens; nonetheless, some statistical trends were observed among the sampled females. In particular, compared to nonaborting females, aborting females tended to shed *C. burnetii* longer in their vaginal mucus (up to 7 weeks post abortion) and tended to have higher bacterial burdens ($>5 \times 10^6$ GE per swab) (Fig. 2a). Similarly, mean fecal bacterial burdens tended to be higher for aborting than for nonaborting females; however, both groups stopped fecally shedding bacteria after week four (Fig. 3a). Interestingly, among females that lambd normally, bacterial burdens in the vaginal mucus and feces during the first week postpartum tended to be higher for primiparous than for multiparous females (Fig. 2b and Fig. 3b). Unfortunately, because we were not able to sample all females during the first week postabortion (only 6 out of 11) or after normal lambing (only 18 out of 26), we missed the opportunity to fully describe the initial shedding dynamics of all the ewes studied.

***C. burnetii* strain diversity.** MLVA typing was performed on 28 qPCR-positive vaginal mucus ($n = 26$) and fecal ($n = 2$) samples whose bacterial burdens were high ($>10^4$ GE per swab or 6.7×10^4 GE per gram of feces, respectively) (Table 1). We obtained fragments of the expected lengths according to the literature (32) for all but three markers (Table 1): one (Ms26) with a fragment deletion and two (Ms23 and Ms33) with an IS1111 insertion (34). For 16 samples, incomplete MLVA profiles were obtained due to amplification failures of unknown origin (i.e., repeatedly negative results on some markers) (Table 1). Overall, we observed diverse genetic profiles compared to that of the Nine Mile reference strain, except for the 2D genotype. The parsimony network (Fig. 4) revealed the cocirculation of six different genotype clusters that were not related to female abortion status. Interestingly, within-individual diversity was observed in several samples whose burdens

Joulié et al.

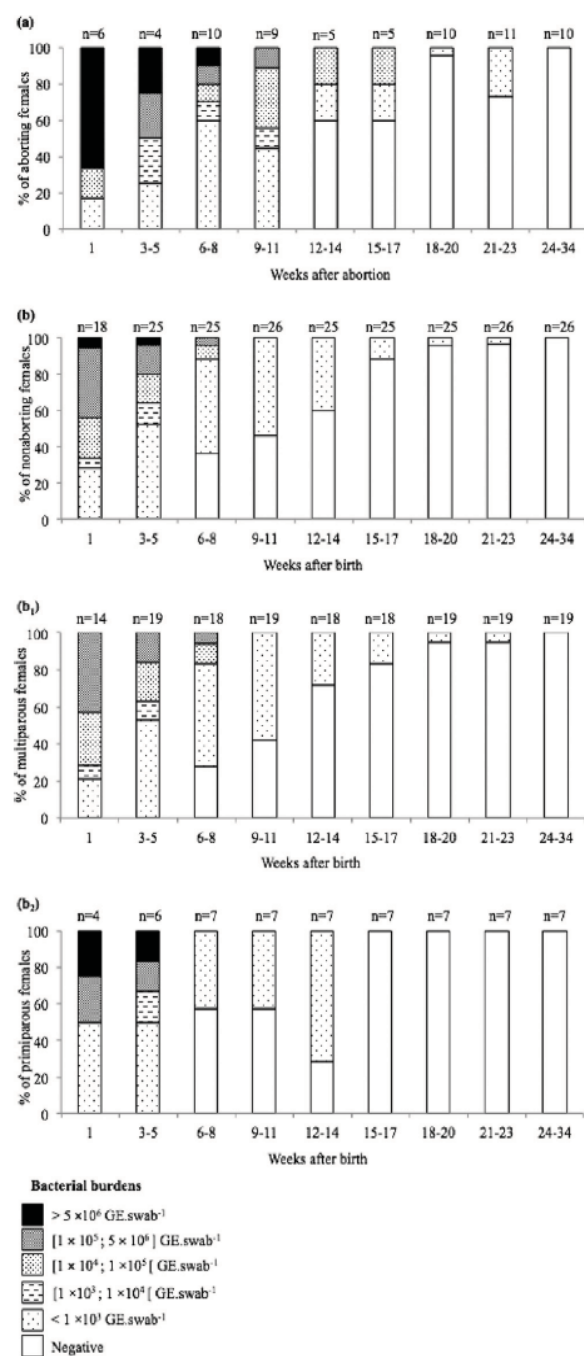


FIG 2 Frequency histograms showing the relative numbers of females shedding *Coxiella burnetii* in vaginal mucus during the weeks following abortion (a) or parturition (b). For nonaborting females, the relative numbers are further detailed depending on their parity: multiparous (b₁) or primiparous (b₂). The sample size for each sampling period is specified above each chart bar.

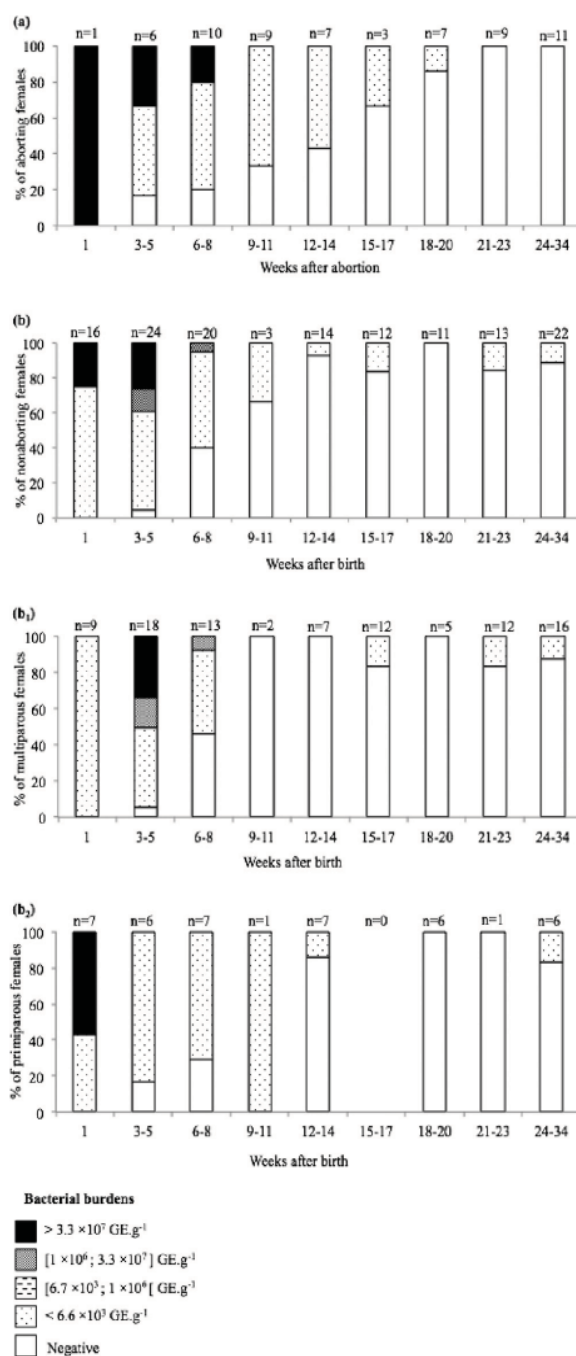


FIG 3 Frequency histograms showing the relative numbers of females shedding *Coxiella burnetii* in feces during the weeks following abortion (a) or parturition (b). For nonaborting females, the relative numbers are further detailed depending on their parity: multiparous (b₁) or primiparous (b₂). The sample size for each sampling period is specified above each chart bar.

allowed genotyping ($n = 3$). Conversely, the two feces samples, collected from two distinct females, clustered together.

Detection of *C. burnetii* DNA in barn environmental samples. *C. burnetii* DNA was detected at levels above 0.15 GE/cm² in

all 24 of the cloth samples; in 5 samples, levels exceeded 1.5×10^3 GE/cm² (Fig. 5). The highest bacterial load (about 1.09×10^8 GE per cm² of cloth) was detected on a cloth sample from barn C taken in the month following the primiparous female's abortion.

TABLE 1 MLVA genotyping results for *C. burnetii* samples collected from vaginal mucus and feces in a French ovine flock between 2010 and 2011

			Genotyping result ^c																
			Panel 1 (Ms01 to Ms36)									Panel 2 (Ms23 to Ms34)							
Ewe ^a	Matrix ^b	Sampling ^f	Ms01	Ms03	Ms07	Ms12	Ms20	Ms21	Ms22	Cox3, Ms26	Ms30	Ms36	Ms23	Cox4, Ms24	Cox2, Ms27	Cox5, Ms28	Cox7, Ms31	Cox6, Ms33	Cox1, Ms34
1 ^d	VM	1	1	4	7	7	7	15	6	NA	12	6	99	15	3	4	3	99	4
	F	5	4	7	8	7	15	6	6	—1	12	4	99	14	2	4	3	99	3
	VM	8	4	7	8	7	15	6	6	—1	12	4	99	NA	3	3	3	99	3
2 ^d	VM	1	4	7	7	7	15	6	6	—1	12	4	99	15	3	4	3	99	4
	F	1	4	7	8	7	15	6	8	—1	12	4	99	14	2	4	4	99	3
	VM	4	4	7	7	7	15	6	6	—1	12	4	99	15	3	4	3	99	4
	VM	7	4	7	8	7	15	6	6	4	12	4	99	14	3	4	3	99	4
	VM	10	4	7	8	7	15	6	6	—1	12	4	99	14	3	3	3	99	3
	VM	13	4	7	8	7	15	6	6	—1	12	4	99	14	3	4	3	99	4
3 ^d	VM	9	NT	NT	NT	4	NT	NT	NT	NT	12	NA	99	15	3	4	4	99	4
4 ^d	VM	5	NA	7	8	7	15	6	6	—1	12	4	99	NA	3	5	3	99	4
5 ^d	VM	1	4	7	7	7	15	6	6	—1	12	4	99	15	3	4	3	99	4
6 ^d	VM	1	4	7	7	7	15	6	6	—1	12	4	99	15	3	4	3	99	4
7 ^d	VM	7	NT	NT	NT	7	NT	NT	NT	NT	12	4	99	15	3	4	3	99	4
8 ^d	VM	6	NA	7	8	7	15	6	6	—1	12	4	99	NA	3	3	3	99	3
9	VM	4	9	4	7	NA	7	15	6	6	12	6	99	9	NA	4	3	99	3
10	VM	1	10	4	7	8	7	15	6	6	12	6	99	NA	3	4	3	99	3
11	VM	1	NT	NT	NT	7	NT	NT	NT	NT	12	4	99	15	4	4	4	99	4
12	VM	6	4	7	NA	7	15	6	6	—1	12	4	99	NA	3	4	3	99	3
13	VM	1	4	7	7	7	15	6	NA	—1	12	4	99	15	3	4	3	99	4
	VM	3	NT	NT	NT	7	NT	NT	NT	NT	NA	NA	99	NA	3	4	4	99	4
14	VM	1	NA	7	NA	7	15	6	6	—1	12	4	99	15	3	4	3	99	4
15	VM	1	NA	7	8	7	15	6	6	—1	12	4	99	14	3	4	3	99	4
16	VM	1	4	7	8	NA	15	6	6	—1	12	4	99	7	3	4	3	99	3
17	VM	1	NA	7	NA	NA	15	6	6	—1	10	4	99	NA	3	4	3	99	3
18	VM	1	NA	7	NA	7	15	4	6	—1	10	4	99	NA	3	5	3	99	4
19	VM	1	NA	7	NA	7	15	6	6	—1	12	NA	99	NA	3	4	3	99	3
20	VM	1	4	7	8	7	15	6	6	—1	12	4	99	14	2	4	3	99	3
Ref ^e			4	7	8	8	15	6	6	4	12	4	9	27	4	6	5	9	5

^a Ewes 4, 9, 10, and 20 are primiparous; all others are multiparous.
^b VM, vaginal mucus; F, feces.
^c Panels are as described by Arricau-Bouvery et al. (32). —1, deletion; 99, insertion of IS1111 gene; NT, not tested due to low DNA volumes (partial genotypes, only 10 markers tested); NA, not amplified. Ms nomenclature is as described by Arricau-Bouvery et al. (32); Cox nomenclature is as described by Svraka et al. (54).
^d Aborting female.
^e Nine Mile RSA 493 reference (Ref) strain.
^f Sampling period is shown as the week after abortion/parturition.

High bacterial burdens were also observed in barn B, which housed the 10 multiparous aborting females. Interestingly, at 8 and 9 months after the abortion by the primiparous and the multiparous females, respectively, *C. burnetii* DNA was still detected at levels above 0.15 GE/cm² in all the barns (Fig. 4). Not surprisingly, *C. burnetii* DNA was also detected in the petri dish samples. Levels were both above (*n* = 53) and below (*n* = 11) 3.3 GE per cm² (Fig. 4): the results varied greatly depending on the barn and

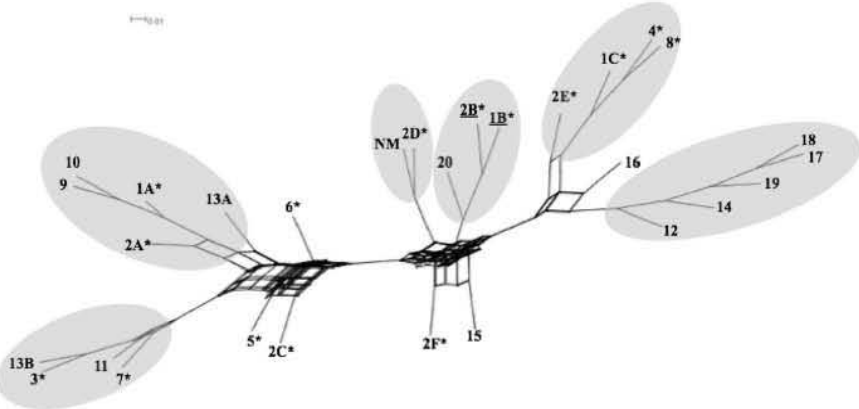


FIG 4 Consensus parsimony tree showing the genotype diversity of *C. burnetii* for each of the 17 MLVA markers, considering vaginal mucus (*n* = 26) and feces (*n* = 2) samples from 20 females. Numbers from 1 to 8 (marked with an asterisk) correspond to aborting females and from 9 to 20 to nonaborting females. Letters (ordered alphabetically so as to represent the sampling chronology) are used when females were sampled several times. Genotypes 1B and 2B correspond to feces samples.

Joulié et al.

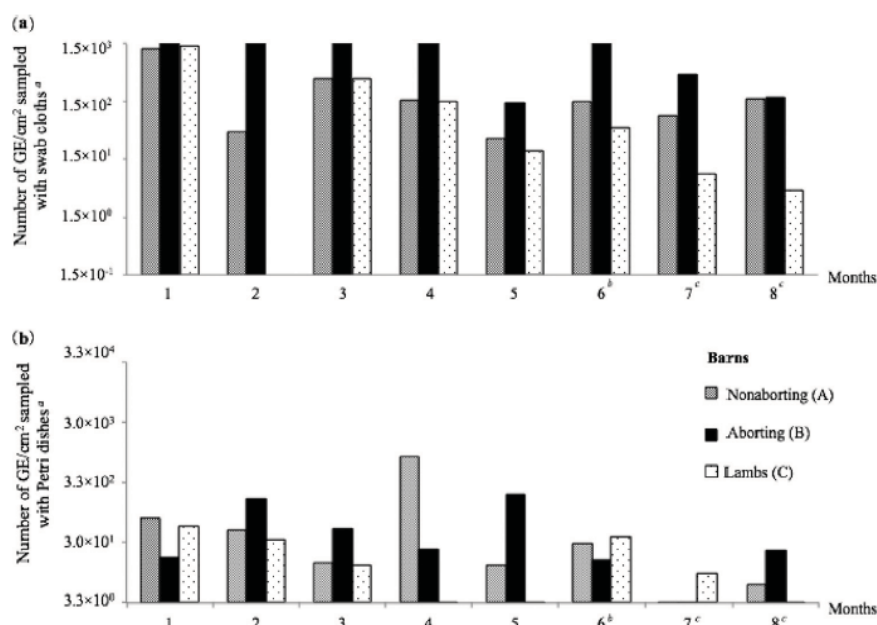


FIG 5 Histograms indicating the bacterial burdens detected monthly in dust collected from barns A, B, and C using cloths (a) and petri dishes (b). The sampling started 3 weeks after the abortion by the last female. a, decimal logarithmic scale. b, the results of two sampling periods have been averaged. c, for the two last sampling sessions, 2 dishes were erroneously placed in barn B and 3 in barn A.

the sampling period. Finally, low levels of *C. burnetii* DNA were detected in the air of all the barns. They remained detectable for 8 months in barn A, but the C_T increased over time, suggesting that bacterial burdens decreased.

DISCUSSION

It is currently difficult to evaluate the medical and sanitary measures being implemented in farms infected with *C. burnetii* because background knowledge and convenient management tools are lacking. It is therefore essential to learn more about *C. burnetii* shedding in ruminants to efficiently control Q fever infections at the herd level. To our knowledge, this is the first longitudinal study using a naturally infected flock of sheep that concomitantly describes (i) the intensity and kinetics of *C. burnetii* shedding via three different routes, (ii) barn environmental contamination, and (iii) within-flock strain genotype diversity. Of course, because we considered a single flock, we ignore whether our findings can be extrapolated to other flocks.

We found that the relative number of shedders was higher during the first days following abortions or normal lambing. Bacterial burdens in vaginal mucus and, to a lesser extent, in feces were also higher. These results are consistent with those previously obtained for sheep (17, 20, 21, 35), goats (19, 27, 36), and cows (18). Low levels of *C. burnetii* DNA were also detected in milk ($C_T > 30.5$), which fits with the prevailing opinion among experts that sheep shed lower burdens of *C. burnetii* in milk than do cows and goats (3). We also confirmed that vaginal and fecal shedding durations varied among ewes (17, 20) and that shedding may be discontinuous, as in goats (19, 23, 25, 26, 37) and cows (18, 24). The latter finding suggests that the number of *C. burnetii* shedders may be underestimated if only one shedding route is investigated and/or if the animals are not repeatedly tested over time. How-

ever, for the purposes of an epidemiological survey or differential diagnosis, sampling vaginal mucus from several females on a single day may be sufficient to reveal the presence of *C. burnetii* shedders at the flock scale.

Overall, *C. burnetii* burdens remained high in feces and vaginal mucus ($> 3 \times 10^7$ GE per gram of feces or 10^3 GE per swab) for 2 and 3 months, respectively, after the lambing period. In addition, low levels of DNA ($< 6.6 \times 10^3$ GE per gram) were still present in the feces of some females more than 4 months after the lambing period. These results, when taken with previous findings from Astobiza et al. (17) and Rodolakis et al. (21), suggest that feces may represent a significant source of bacterial contamination in the barn environment. Given that DNA levels remained high ($> 3.3 \times 10^7$ GE per gram of feces) at 7 weeks postabortion for some females and that an adult ewe produces an average of 690 g of fresh feces per day (38), we hypothesize that, over 7 weeks, aborting females may have shed more than 1.3×10^{12} GE of *C. burnetii* into the environment through their feces.

Accordingly, we found that *C. burnetii* DNA was present in both the air and dust of the barns where infected ewes had been housed, which is consistent with the results of previous studies performed on ruminant farms (11–13, 15, 16, 39). Bacterial burdens estimated using cloth sampling were higher and steadier over time than those estimated using petri dishes. We suggest that cloth sampling may be an easy means of following barn contamination over long time periods. Accordingly, in our study, *C. burnetii* was present in dust and air samples for as long as 8 months, whereas shedding by individual sheep stopped being detectable 12 weeks after the last abortion occurred. Given that the farmer scraped out manure but did not thoroughly clean the barns (e.g., fences and walls), it is not surprising that *C. burnetii* DNA was detected for long periods of time. However, because PCR screening does not

reveal the viability of the *C. burnetii* present, future research must focus on quantifying the proportion of viable bacteria in environmental samples. Interestingly, Kersh et al. (12) showed that viable *C. burnetii* is present in dust samples: the researchers succeeded in experimentally infecting mice with Q fever after intraperitoneal injection of dust samples.

Using parsimony analysis, we also discovered the concomitant circulation of distinct genotypes, which grouped into six different clusters. These genotypes differed dramatically, mainly in three markers (Ms23, Ms26, and Ms33), from those documented in animal and human samples in previous MLVA studies carried out in Europe (32, 40–44). The fact that within-individual genotype diversity was observed for three females suggests that coinfection may occur.

Our findings support the management measures most often applied on small-ruminant farms to limit *C. burnetii* transmission (3, 45–47). First, aborting and primiparous females, which tend to have higher bacterial burdens and shed *C. burnetii* for longer than nonaborting and multiparous females, respectively, need to be quickly identified and separated from the rest of the flock, even via culling, to limit the dissemination of *C. burnetii* (3, 27, 48). Abortifemales in particular release such large bacterial burdens into the environment that they may act as “superspreaders,” according to Porten et al. (49). Second, uninfected females, especially lambs and primiparous ewes, should be the primary targets of vaccination efforts in order to gradually immunize the entire flock (3, 27, 48, 50). Finally, the viability of *C. burnetii* in litter and manure contaminated by infected birth products and feces may be reduced by composting such materials prior to their application (51, 52).

In conclusion, we found that the circulation dynamics of *C. burnetii* within a single sheep flock can be highly complex: both aborting and nonaborting females were involved, the environment was contaminated for a long period of time, and several strains were cocirculating simultaneously. Further research should be conducted on other farms to better characterize the shedding profiles of individual ewes and the diversity of genotypes that circulate within flocks. To this end, MLVA analyses need to be harmonized to facilitate the exchange of knowledge on the geographic and temporal distribution of *C. burnetii* strains (53). Finally, we suggest that environmental samples could be used as complementary tools to help characterize the sanitary status of farms. In particular, they could prove useful when evaluating the efficiency of control measures and assessing human exposure risks.

ACKNOWLEDGMENTS

Life Technologies kindly provided support for the DNA extraction and PCR analysis of dust samples. We thank the farmer for providing access to his sheep and barns and for his involvement in collecting samples; we also thank Sabine Atger, Jennifer Maiano, Marina Beral, and Valérie Poux for help in the field, Lucie Deruyter, Fabien Vorimore, and Patrice Gracieux for PCR assays, and Ghislaine Le Gall, Raphaël Guatteo, and Renée de Crémoux for advice regarding dust sampling and analysis.

This study received technical support from Life Technologies and Adigène.

REFERENCES

1. Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res* 36:327–349. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2005010>.
2. Rodolakis A. 2009. Q fever in dairy animals. *Ann N Y Acad Sci* 1166:90–93. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04511.x>.

3. EFSA Panel on Animal Health and Welfare. 2010. Scientific opinion on Q fever. *EFSA J* 8:1593–1709.
4. ECDC. 2010. Risk assessment on Q fever. ECDC Tech Rep <http://dx.doi.org/102900/28860>.
5. Anderson A, Bijlmer H, Fournier PE, Graves S, Hartzell J, Kersh GJ, Limonard G, Marrie TJ, Massung RF, McQuiston JH, Nicholson WL, Paddock CD, Sexton DJ. 2013. Diagnosis and management of Q fever—United States, 2013 Recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *MMWR Recomm Rep* 62:1–28.
6. Kampschreur LM, Delsing CE, Groenwold RHH, Wegdam-Blans MCA, Bleeker-Rovers CP, de Jager-Leclercq MGL, Hoepelman AIM, van Kasteren ME, Buijs J, Renders NHM, Nabuurs-Franssen MH, Oosterheert JJ, Wever PC. 2014. Chronic Q fever in the Netherlands 5 years after the start of the Q fever epidemic: results from the Dutch chronic Q fever database. *J Clin Microbiol* 52:1637–1643. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03221-13>.
7. Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D. 2004. Wind in November, Q fever in December. *Emerg Infect Dis* 10:1264–1269. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1007.030724>.
8. van Leuken JPG, van de Kassteele J, Sauter FJ, van der Hoek W, Heederik D, Havelaar AH, Swart AN. 2015. Improved correlation of human Q fever incidence to modelled *Coxiella burnetii* concentrations by means of an atmospheric dispersion model. *Int J Health Geogr* 14:14. <http://dx.doi.org/10.1186/s12942-015-0003-y>.
9. McCaul TF, Williams JC. 1981. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J Bacteriol* 147:1063–1076.
10. Scott GH, Williams JC. 1990. Susceptibility of *Coxiella burnetii* to chemical disinfectants. *Ann N Y Acad Sci* 590:291–296. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb42235.x>.
11. Yanase T, Muramatsu Y, Inouye I, Okabayashi T, Ueno H, Morita C. 1998. Detection of *Coxiella burnetii* from dust in a barn housing dairy cattle. *Microbiol Immunol* 42:51–53. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.1998.tb01969.x>.
12. Kersh GJ, Fitzpatrick KA, Self JS, Priestley RA, Kelly AJ, Lash RR, Marsden-Haug N, Nett RJ, Bjork A, Massung RF, Anderson AD. 2013. Presence and persistence of *Coxiella burnetii* in the environments of goat farms associated with a Q fever outbreak. *Appl Environ Microbiol* 79:1697–1703. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03472-12>.
13. Kersh GJ, Wolfe TM, Fitzpatrick KA, Candee AJ, Oliver LD, Patterson NE, Self JS, Priestley RA, Loftis AD, Massung RF. 2010. Presence of *Coxiella burnetii* DNA in the environment of the United States, 2006 to 2008. *Appl Environ Microbiol* 76:4469–4475. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00042-10>.
14. Astobiza I, Barandika JF, Ruiz-Fons F, Hurtado A, Povedano I, Juste RA, García-Pérez AL. 2011. Four-year evaluation of the effect of vaccination against *Coxiella burnetii* on reduction of animal infection and environmental contamination in a naturally infected dairy sheep flock. *Appl Environ Microbiol* 77:7405–7. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.05530-11>.
15. Astobiza I, Barandika JF, Ruiz-Fons F, Hurtado A, Povedano I, Juste RA, García-Pérez AL. 2011. *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Res Vet Sci* 91:e58–e63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.11.014>.
16. Hogerwerf L, Borlee F, Still K, Heederik D, van Rotterdam B, de Bruin A, Nielsen M, Wouters IM. 2012. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in inhalable airborne dust samples from goat farms after mandatory culling. *Appl Environ Microbiol* 78:5410–5412. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00677-12>.
17. Astobiza I, Barandika JF, Hurtado A, Juste RA, García-Pérez AL. 2010. Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. *Vet J* 184:172–175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.01.017>.
18. Guatteo R, Beaudou F, Berri M, Rodolakis A, Joly A, Seegers H. 2006. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet Res* 37:827–833. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2006038>.
19. Rousset E, Berri M, Durand B, Dufour P, Prigent M, Delcroix T, Rodolakis A. 2009. *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Appl Environ Microbiol* 75:428–433. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00690-08>.
20. Berri M, Souriau A, Crosby M, Crochet D, Lechopier P, Rodolakis A.

2001. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Vet Rec* 148:502–505. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.148.16.502>.
21. Rodolakis A, Berri M, Hechard C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, Blanchard B, Camuset P, Devillechaise P, Natorp JC, Vadet JP, Arricau-Bouvery N. 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *J Dairy Sci* 90:5352–5360. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-815>.
22. Gale P, Kelly L, Mearns R, Duggan J, Snary EL. 2015. Q fever through consumption of unpasteurised milk and milk products—a risk profile and exposure assessment. *J Appl Microbiol* 118:1083–1095. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12778>.
23. Berri M, Rousset E, Hechard C, Champion JL, Dufour P, Russo P, Rodolakis A. 2005. Progression of Q fever and *Coxiella burnetii* shedding in milk after an outbreak of enzootic abortion in a goat herd. *Vet Rec* 156:548–549. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.156.17.548>.
24. Guatteo R, Beaudeau F, Joly A, Seegers H. 2007. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet Res* 38:849–860. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2007038>.
25. Arricau-Bouvery N, Souriau A, Bodier C, Dufour P, Rousset E, Rodolakis A. 2005. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine* 23:4392–4402. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.04.010>.
26. Berri M, Rousset E, Champion JL, Russo P, Rodolakis A. 2007. Goats may experience reproductive failures and shed *Coxiella burnetii* at two successive parturitions after a Q fever infection. *Res Vet Sci* 83:47–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.11.001>.
27. Rousset E, Durand B, Champion JL, Prigent M, Dufour P, Forfait C, Aubert MF. 2009. Efficiency of a phase I vaccine for the reduction of vaginal *Coxiella burnetii* shedding in a clinically affected goat herd. *Clin Microbiol Infect* 15:188–189. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02220.x>.
28. Carrieri M, Tissot-Dupont H, Rey D, Brousse P, Renard H, Obadia Y, Raoult D. 2002. Investigation of a slaughterhouse-related outbreak of Q fever in the French Alps. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21:17–21. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-001-0645-5>.
29. Dupuis G, Petite J, Péter O, Vouilloz M. 1987. An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine valley. *Int J Epidemiol* 16:282–287. <http://dx.doi.org/10.1093/ije/16.2.282>.
30. van der Hoek W, Hunink J, Vellema P, Droogers P. 2011. Q fever in the Netherlands: the role of local environmental conditions. *Int J Environ Health Res* 21:441–451. <http://dx.doi.org/10.1080/09603123.2011.574270>.
31. Rousset E, Prigent M, Ameziane G, Brugidou R, Martel I, Grob A, Gall GL, Kerninon S, Delaval J, Chassin A, Vassiloglou B SA, Valogne A, Ogier M, Audeval C, Colucci F, Perennes S, Cazalis L, Nicollet P, CM C, Sidi-Boumedine K. 2012. Adoption by a network's laboratories of a validated quantitative real-time PCR method for monitoring Q fever abortions in ruminant livestock. *Euroreference* 8:21–28.
32. Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier C, Souriau A, Meyer H, Neubauer H, Rodolakis A, Vergnaud G. 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol* 6:38. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-6-38>.
33. Prigent M, Rousset E, Yang E, Thiery R, Sidi-Boumedine K. Validation study for using lab-on-chip technology for *Coxiella burnetii* multi-locus-vntr-analysis (MLVA) typing. *Microbes Infect*, in press.
34. Sidi-Boumedine K, Duquesne V, Prigent M, Yang E, Joulié A, Thiery R, Rousset E. Impact of IS1111 insertion on the MLVA genotyping of *C. burnetii*. *Microbes Infect*, in press.
35. Berri M, Souriau A, Crosby M, Rodolakis A. 2002. Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. *Vet Microbiol* 85:55–60. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00480-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00480-1).
36. de Cremoux R, Rousset E, Touratier A, Audusseau G, Nicollet P, Ribaud D, David V, Le Pape M. 2012. *Coxiella burnetii* vaginal shedding and antibody responses in dairy goat herds in a context of clinical Q fever outbreaks. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64:120–122. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00893.x>.
37. Arricau-Bouvery N, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A. 2003. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet Res* 34:423–433. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2003017>.
38. Jarrige R. 1995. Nutrition des ruminants domestiques: ingestion et digestion. Editions Quae, Versailles, France.
39. de Bruin A, de Groot A, de Heer L, Bok J, Wielinga PR, Hamans M, van Rotterdam BJ, Janse I. 2011. Detection of *Coxiella burnetii* in complex matrices by using multiplex quantitative PCR during a major Q fever outbreak in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 77:6516–6523. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.05097-11>.
40. Chmielewski T, Sidi-Boumedine K, Duquesne V, Podsiadly E, Thiery R, Tytlewska-Wierzbanska S. 2009. Molecular epidemiology of Q fever in Poland. *Pol J Microbiol* 58:9–13.
41. Roest HJ, Ruuls RC, Tilburg J, Nabuurs-Franssen MH, Klaassen CHW, Vellema P, van den Brom R, Dercksen D, Wouda W, Spierenburg MAH, van der Spek AN, Buijs R, de Boer AG, Willemsen PTJ, van Zijderveld FG. 2011. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 17:668–675. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1704.101562>.
42. Frangoulidis D, Walter MC, Antwerpen M, Zimmermann P, Janowetz B, Alex M, Bottcher J, Henning K, Hilbert A, Ganter M, Runge M, Munsterkotter M, Spletstoeser WD, Hanczaruk M. 2014. Molecular analysis of *Coxiella burnetii* in Germany reveals evolution of unique clonal clusters. *Int J Med Microbiol* 304:868–876. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.06.011>.
43. Pinero A, Barandika JF, Garcia-Perez AL, Hurtado A. 2015. Genetic diversity and variation over time of *Coxiella burnetii* genotypes in dairy cattle and the farm environment. *Infect Genet Evol* 31:231–235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.02.006>.
44. Racic I, Spicic S, Galov A, Duvnjak S, Zdelar-Tuk M, Vujnovic A, Habrun B, Cvetnic Z. 2014. Identification of *Coxiella burnetii* genotypes in Croatia using multi-locus VNTR analysis. *Vet Microbiol* 173:340–347. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.016>.
45. Seegers H, Bareille N, Guatteo R, Joly A, Chauvin A, Chartier C, Nusinovic S, Peroz C, Roussel P, Beaudeau F, Ravinet N, Relun A, Taurer AF, Fourichon C. 2013. Epidemiology and levels for control of some major diseases in dairy herds. *INRA Prod Anim* 26:157–175.
46. Rodolakis A. 2014. Zoonoses in goats: how to control them. *Small Ruminant Res* 121:12–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.01.007>.
47. Roest HJ, Bossers A, van Zijderveld FG, Rebel JML. 2013. Clinical microbiology of *Coxiella burnetii* and relevant aspects for the diagnosis and control of the zoonotic disease Q fever. *Vet Q* 33:148–160. <http://dx.doi.org/10.1080/01652176.2013.843809>.
48. de Cremoux R, Rousset E, Touratier A, Audusseau G, Nicollet P, Ribaud D, David V, Le Pape M. 2012. Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii*-inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64:104–106. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00892.x>.
49. Porten K, Rissland J, Tigges A, Broll S, Hopp W, Lunemann M, van Treck U, Kimmig P, Brockmann SO, Wagner-Wiening C, Hellenbrand W, Buchholz U. 2006. A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. *BMC Infect Dis* 6:147. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-6-147>.
50. Taurer AF, Guatteo R, Lehebel A, Joly A, Beaudeau F. 2014. Vaccination using phase I vaccine is effective to control *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy cattle herds. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 37:1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2013.10.002>.
51. Hermans T, Jeurissen L, Hackert V, Hoebe C. 2014. Land-applied goat manure as a source of human Q-fever in the Netherlands, 2006–2010. *PLoS One* 9:e96607. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0096607>.
52. Berri M, Rousset E, Champion JL, Arricau-Bouvery N, Russo P, Pepin M, Rodolakis A. 2003. Ovine manure used as a garden fertiliser as a suspected source of human Q fever. *Vet Rec* 153:269–270. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.153.9.269>.
53. Sidi-Boumedine K, Rousset E. 2011. Molecular epidemiology of Q fever: a review of *Coxiella burnetii* genotyping methods and main achievements. *Euroreference* 5:30–38.
54. Svraka S, Toman R, Skultety L, Slaba K, Homan WL. 2006. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Lett* 254:268–274. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00036.x>.

Principaux résultats

- ✚ Les femelles **avortées** et les femelles **primipares** présentent une **excrétion** dans le mucus vaginal **significativement plus élevée** que les femelles multipares non-avortées durant le premier mois post mise bas ou avortement.
- ✚ Les **charges bactériennes** excrétées sont **significativement plus élevées dans le mucus vaginal** que dans les fèces ou le lait au cours du temps
- ✚ Les **poussières d'élevages** sont un **meilleur indicateur** sur le long terme **du statut infectieux** de l'élevage comparativement aux prélèvements d'air.
- ✚ Les **génotypes de *C. burnetii* circulants dans cet élevage diffèrent** au cours du temps chez une même femelle et selon la voie d'excrétion.

III.1.3 Article 2: *Coxiella burnetii* circulation in a naturally infected flock of sheep: individual follow-up of antibodies in serum and milk

III.1.3.1 Résumé

Contexte. Dans ce deuxième article, nous avons étudié l'évolution des taux en anticorps dans le sérum et le lait de brebis naturellement infectées par *C. burnetii* puis vaccinées, avec un vaccin phase I inactivé (Coxevac®, Ceva), indépendamment de notre protocole expérimental. Le suivi a été réalisé dans le même troupeau ovin que celui décrit précédemment, les périodes (de novembre 2010 à juillet 2011) et fréquences (toutes les 3 semaines) d'échantillonnage sont également identiques à celles décrites dans l'article 1. Une prise de sang et des prélèvements de mucus vaginal, fèces et lait ont été réalisés sur les femelles laitières, alors qu'une unique prise de sang a été réalisée sur un lot de femelles allaitantes et d'agnelles.

Objectifs. L'objectif cette étude était de : (i) évaluer les relations entre excrétion de la bactérie et séropositivité à l'échelle individuelle le premier mois post mise-bas ou avortement chez les femelles laitières ; et sur l'ensemble des femelles échantillonnées de (ii) évaluer la stabilité des anticorps dans le temps et les réponses à la vaccination ; (iii) suivre la dynamique des anticorps maternels dans le sang chez les agnelles et (iv) comparer les taux d'anticorps obtenus dans le lait et le sérum chez les femelles laitières sur les 8 mois de suivi.

Résultats. Dans cette étude, nous avons montré que les taux d'anticorps sont stables dans le temps et que la séropositivité n'est pas clairement corrélée à l'excrétion vaginale de la bactérie le premier mois post mise-bas ou avortement. En revanche, les taux d'anticorps dans le lait sont fortement corrélés avec ceux détectés dans le sérum des femelles avortées ou non-avortées. De plus, nous montrons que les taux d'anticorps détectés dans le lait de tank sont cohérents avec les variations observées dans le sérum des femelles laitières au cours du temps. Nous rapportons également l'existence d'une transmission maternelle d'anticorps aux agnelles. Nous observons que la présence d'anticorps maternels à la naissance n'a pas d'impact sur la réponse sérologique à la vaccination à l'âge de 4 mois. Enfin, nous n'avons remarqué aucun effet indésirable de la vaccination pendant la gestation des femelles allaitantes.

Conclusions. Ces résultats confirment la nécessité d'utiliser des indicateurs pertinents d'évaluation du risque sanitaire en élevages. En effet, le manque de données sur la dynamique d'excrétion de la bactérie en contexte infectieux rend la compréhension de l'épidémiologie de la maladie difficile. Ainsi, à travers ces deux études (i.e. articles 1 et 2), nous fournissons des

données épidémiologiques descriptives quant aux (i) lots de femelles à prélever, (ii) matrices à collecter, (iii) analyses à effectuer et (iv) périodes d'échantillonnage optimales à respecter. De fait, nous suggérons pour de futures études de privilégier le suivi de l'excrétion par qPCR dans le mucus vaginal des femelles avortées et des primipares le premier mois post-mise bas ou avortement. Le suivi sérologique dans le lait est également un bon indicateur de l'exposition du troupeau.

L'ensemble de ces résultats sont nécessaires à une meilleure gestion et à une surveillance optimisée de la fièvre Q.

III.1.3.2 Article



Applied and Environmental
Microbiology®

ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY



Coxiella burnetii Circulation in a Naturally Infected Flock of Sheep: Individual Follow-Up of Antibodies in Serum and Milk

A. Joulé,^{a,b,c} E. Rousset,^c P. Gasqui,^a E. Lepetitcolin,^d A. Leblond,^{a,b}
K. Sidi-Boumedine,^c E. Jourdain^a

EPIA, INRA, VetAgro Sup, Saint-Genès-Champagnelle, France^a; EPIA, INRA, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France^b; ANSES, Laboratory of Sophia Antipolis, Animal Q Fever Unit, Sophia Antipolis, France^c; UNICOR, Millau, France^d

ABSTRACT The control of Q fever, a zoonotic disease caused by the *Coxiella burnetii* bacterium, remains a scientific challenge. Domestic ruminants are considered the main reservoir, shedding *C. burnetii* essentially through parturition products during abortion or birth. Sheep are particularly frequently associated with human outbreaks, but there are insufficient field data to fully understand disease dynamics and to instigate efficient control measures. A longitudinal follow-up study of a naturally infected sheep flock was performed (i) to investigate relationships between seropositivity and bacterial shedding in the vaginal mucus, (ii) to describe the kinetics of antibodies, including responses to vaccination, (iii) to monitor maternal antibodies in ewe lambs, and (iv) to compare serological results for milk and serum samples. For 8 months, we collected blood samples every 3 weeks from 11 aborting and 26 non-aborting dairy ewes, 20 nonaborting suckler ewes, and 9 ewe lambs. Individual milk samples were also obtained from lactating females. All serum and milk samples were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), whereas vaginal swabs were tested by quantitative PCR. We found that some dairy females did not seroconvert despite shedding *C. burnetii* in their vaginal mucus. Overall, antibody levels in adult females were found to remain stable over time, with exceptions during the mating and lambing periods. Maternal antibodies decreased during the first month after birth. Interestingly, antibody levels in milk were correlated with those in serum. This study provides valuable field data that will help improve Q fever surveillance and within-flock management measures.

IMPORTANCE Field data are necessary to improve the surveillance, diagnosis, and sanitary management of Q fever in livestock. Here, we provide extensive serological data obtained from serum and milk samples from infected and vaccinated ewes belonging to a naturally infected flock of sheep. We show that antibody levels are stable over time and seropositivity and vaginal shedding are not clearly correlated, whereas antibody levels in milk are strongly correlated with those in serum. Accordingly, we find that antibody levels in bulk tank milk are consistent with the variations observed in the serum of dairy females over time. We report the existence of maternal antibody transmission to ewe lambs and we show that the presence of maternal antibodies at birth does not prevent the development of a serological response to vaccination at the age of 4 months. Finally, we report that adult ewes generally seroconvert after vaccination, including during pregnancy.

KEYWORDS Q fever, ruminant, ELISA, serology, cohort study, zoonosis, maternal antibody

Received 8 February 2017 Accepted 9 April 2017

Accepted manuscript posted online 28 April 2017

Citation Joulé A, Rousset E, Gasqui P, Lepetitcolin E, Leblond A, Sidi-Boumedine K, Jourdain E. 2017. *Coxiella burnetii* circulation in a naturally infected flock of sheep: individual follow-up of antibodies in serum and milk. Appl Environ Microbiol 83:e00222-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00222-17>.

Editor Johanna Björkroth, University of Helsinki

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to E. Jourdain, elsa.jourdain@inra.fr.

Q fever is a widespread zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, a Gram-negative intracellular bacterium that has been reported in a broad range of host species. Livestock is the main source of human infections, with small ruminants being the most frequently involved (1–4). Both animals and humans become infected mainly through the inhalation of airborne particles contaminated with *C. burnetii* (4–6). In humans, *C. burnetii* infections range from asymptomatic to severe. The clinical signs are polymorphic and nonspecific; acute Q fever most often results in a flu-like illness, hepatitis, or pneumonia, whereas chronic Q fever may develop in patients with predisposing factors, with the most severe manifestation being endocarditis (7). The major clinical manifestations of Q fever in ruminants, in contrast, are abortions, stillbirths, and delivery of weak offspring, leading to significant economic losses (1, 3, 4). However, infected ruminants are most often asymptomatic, even while shedding infectious bacteria. Assessing the Q fever status of livestock farms may thus prove very challenging (3, 4).

PCR assays are commonly used to detect *C. burnetii* directly in biological materials, such as placentas, genital swabs, feces, or milk samples, and they reveal the existence of ongoing infections associated with bacterial shedding (8). In contrast, serological assays are used to detect specific antibodies, and they reveal any past exposure to the bacterium. They are typically used to perform serosurveys, which are designed to provide epidemiological data on Q fever at a relatively low cost, or to complement the results of direct laboratory tests in order to confirm the diagnosis of Q fever abortion at the flock level (3, 4). At an individual level, however, serological responses, bacterial shedding, and clinical signs are not clearly correlated (4). Overall, despite a few experimental infections (9–11), Q fever pathogenesis is still poorly understood. It is necessary to investigate the relationships between bacterial shedding and antibody responses within infected flocks to improve Q fever diagnosis and monitoring at the farm level.

The few longitudinal follow-up studies performed with cattle (12–15), goats (15–18), or other ruminant species (19) have been particularly valuable in providing descriptive data on individual shedding patterns and serological responses. Fewer data exist for sheep (15, 20, 21) than for the aforementioned species, despite the fact that sheep are frequently associated with clusters of human Q fever cases (22–24).

The purpose of this study was to provide extensive serological data from an infected flock of sheep. The aims were (i) to describe individual relationships between shedding and seropositivity, (ii) to assess the stability of antibodies over time and the responses to vaccination, (iii) to monitor maternal antibodies in ewe lambs, and (iv) to compare serological results from milk and serum samples.

RESULTS

Samples. A total of 564 blood samples and 235 milk samples were obtained from the 66 females studied, as detailed in Table 1. Additionally, 37 vaginal swabs were collected at the beginning of the study, from the 37 dairy females investigated.

Postabortion or postlambing seropositivity and shedding. We found that most of the aborting dairy females (9/11 females) and nonaborting dairy females (17/26 females) were seropositive (or highly seropositive) about 1 month postabortion or postlambing, respectively; however, the remaining aborting dairy females (2/11 females) and nonaborting dairy females (9/26 females) were seronegative or had doubtful results, although most of them (10/11 females) shed *C. burnetii* in their vaginal mucus (Fig. 1). Overall, seropositive females were more frequently PCR positive for *C. burnetii* in their vaginal mucus during the first month postabortion or postlambing than were seronegative females (Fig. 1), although the difference between the two groups was not significant (Fisher's exact test, $P = 0.08$). Indeed, no vaginal shedding was detected for 6 seropositive ewes (including 5 highly seropositive ewes) (Fig. 1). Similarly, we did not observe any significant difference in the proportions of seropositive shedders between aborting and nonaborting ewes or between nonaborting primiparous and multiparous ewes (Fisher's exact test, $P > 0.05$). However, we found that most

TABLE 1 Numbers of serum and milk samples tested by ELISA, according to the pen and aborting status of the investigated females

Animals Investigated (no. sampled)	No. of sampling campaigns	No. of blood samples	No. of milk samples
Aborting dairy females ($n = 11$)	10	105	18 ^a
Nonaborting dairy females ($n = 26$)	8	193	235 ^b
Nonaborting suckler females ($n = 20$)	8	169	0
Ewe lambs ($n = 9$)	10	97	0
Total ^c	10	564	253

^aOnly 2 aborting females were monitored; the other 9 were transferred to the suckler pen.^bSome females were occasionally sampled between sampling campaigns.^cSome females could not be sampled at every sampling campaign, for technical reasons.

ewes that shed $>10^4$ *C. burnetii* genome equivalents in their vaginal swabs were seropositive (13/17 females), while those that shed $>5 \times 10^6$ *C. burnetii* genome equivalents per swab were highly seropositive (5/37 females) (Fig. 1).

Variations in S/P values over time. Sample/positive (S/P) values remained stable for both seronegative and seropositive aborting females, including the vaccinated primiparous ewe, throughout the 8 months during which the females were monitored (Fig. 2a); an exception was observed for the multiparous aborting female that was kept in the dairy pen after adopting a lamb, for which the serological profile varied over time. Similarly, nonaborting dairy females had stable S/P values for 4 months after their parturition and then most of the females that were seronegative seroconverted upon vaccination, while the S/P values for those that already had antibodies increased (Fig. 2b). Similarly, nonaborting suckler females (except 1) seroconverted upon vaccination, although the latter took place during their gestation; S/P values remained stable thereafter (Fig. 2c). Interestingly, we observed that the mating period was generally associated with a moderate decrease in S/P values (Fig. 2).

Maternal antibodies in ewe lambs. Although the vaginal mucus of all 9 females whose lambs were monitored was PCR positive during the first month postlambing, only 5 of the females were seropositive 2 to 3 weeks postlambing (Fig. 1 and 2b).

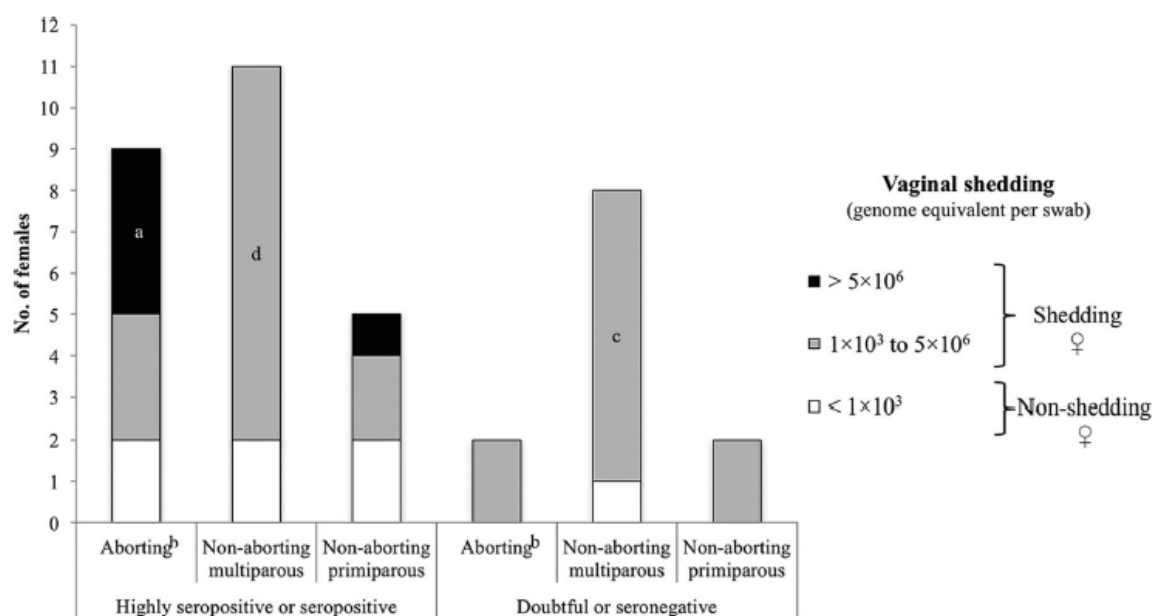


FIG 1 Histogram showing the numbers of females shedding *C. burnetii* in their vaginal mucus during the first month postlambing or postabortion, according to their serological status during this month and their aborting status and parity. ^aIncluding the only aborting primiparous ewe. ^bIncluding 1 primiparous and 10 multiparous ewes. ^cIncluding the dams of ewe lambs 1 to 5. ^dIncluding the dams of ewe lambs 6 to 9.

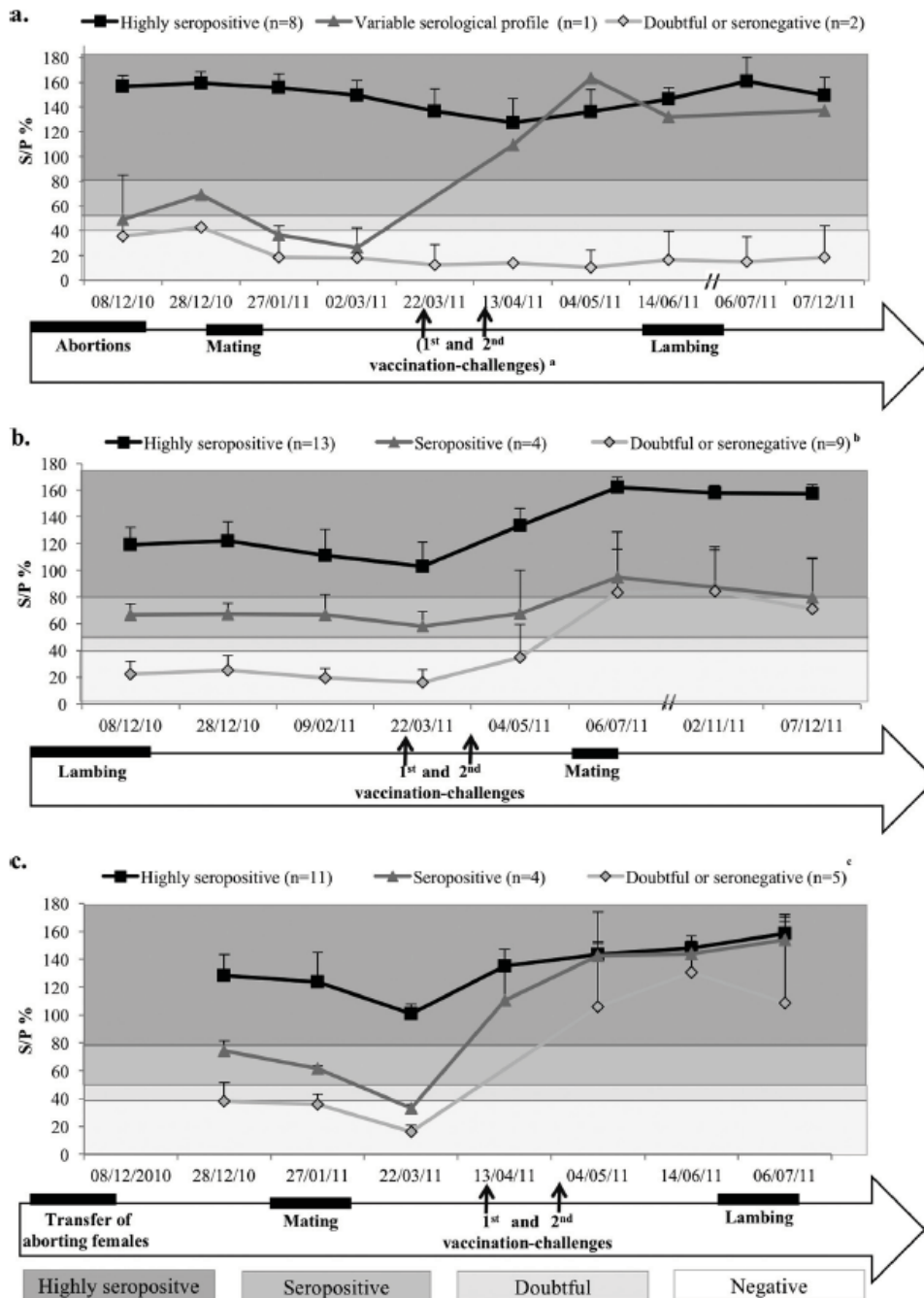


FIG 2 S/P values obtained over time for serum samples from aborting dairy ewes ($n = 11$) (a), nonaborting dairy ewes ($n = 26$) (b), and suckler ewes ($n = 20$) (c). For simplicity, only positive confidence intervals are represented. ^aOnly the aborting primiparous ewe (represented by the black curve among the highly seropositive females) and 1 of the multiparous ewes (represented by the dark gray curve), to which the farmer gave a lamb for adoption, were vaccinated. ^bThree of the seronegative nonaborting dairy ewes remained seronegative. ^cOne of the suckler ewes remained seronegative.

Accordingly, we detected antibodies in 4 of the 5 ewe lambs born to these seropositive dams, whereas lambs born to seronegative females had doubtful or negative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) results (Fig. 3). Subsequently, S/P values decreased as the ewe lambs grew older, with all lambs becoming seronegative by 2 months after birth.

By the age of 8 months, i.e., 4 months after vaccination, 4 lambs had seroconverted. The S/P values for the others had increased but had not reached the threshold for

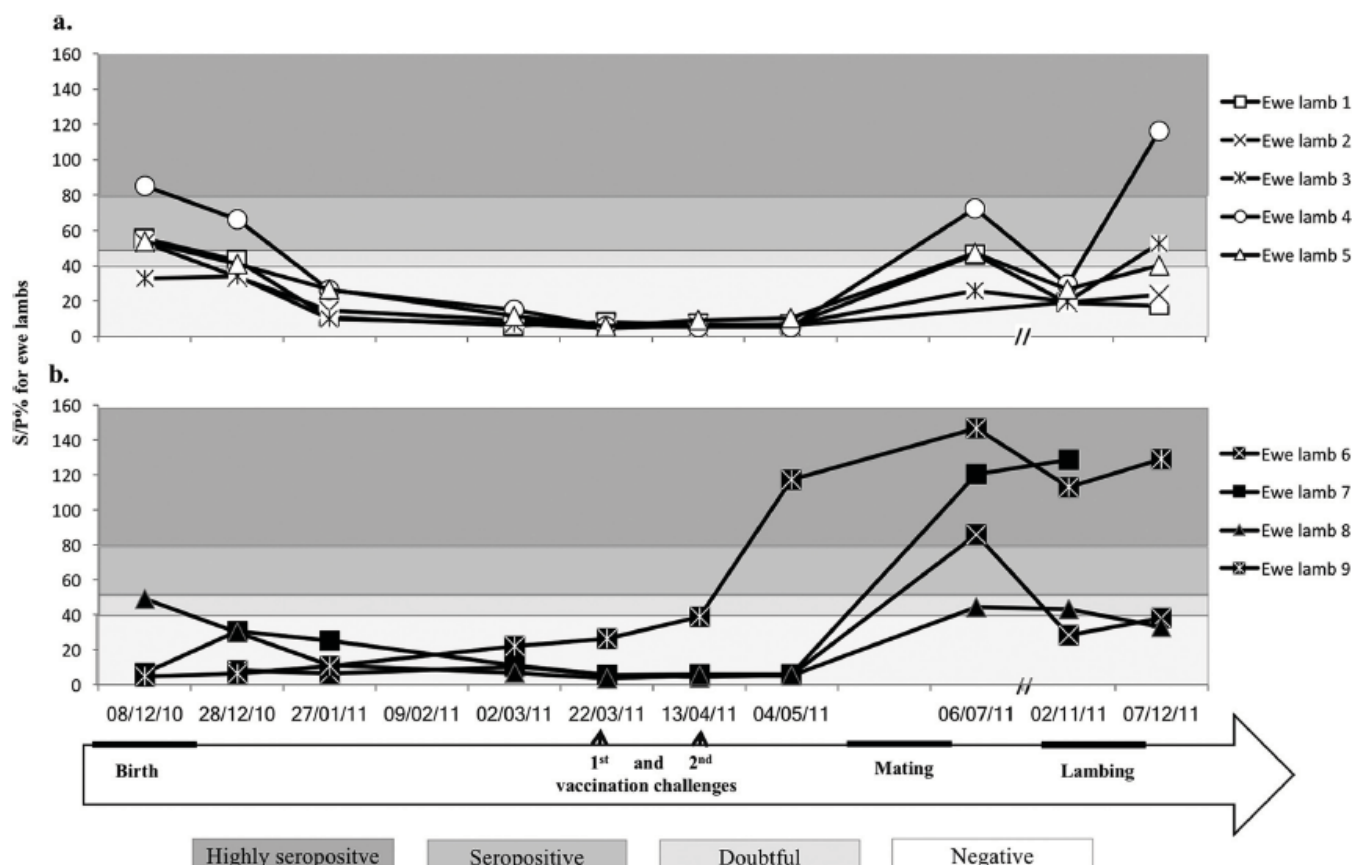


FIG 3 S/P values obtained from serum samples collected from ewe lambs between 1 month and 1 year of age, according to the presence ($n = 5$) (a) or absence ($n = 4$) (b) of detected antibodies in the mother's serum on the date the lambs were first sampled (i.e., 8 December 2010).

seropositivity. Interestingly, ewe lamb 3, which was born to a highly seropositive dam, remained seronegative despite vaccination (Fig. 3). We then observed a decrease in S/P values during the lambing period. Finally, at the end of the study, 7 months after the booster vaccination, the S/P values for only 4 of the 9 monitored ewe lambs were above the threshold for seropositivity.

Antibody levels in milk. All negative serum samples were associated with negative milk samples. Despite a strong correlation ($r = 0.89$) between the S/P values for individual seropositive serum and milk samples, some milk samples were considered negative while the corresponding serum samples were positive or even highly positive ($\kappa = 0.48$) (Fig. 4). Accordingly, the S/P values obtained for the bulk tank milk were consistent with the variations observed for the serum samples from dairy females over time (Fig. 2b); values were high at the beginning of the study and decreased slightly thereafter but remained above or very close to the positivity threshold before increasing after vaccination (Fig. 5).

DISCUSSION

Longitudinal studies are essential for providing relevant health risk indicators. Although they are complex and costly to set up, longitudinal studies such as the one described here are particularly useful because they provide valuable data that will improve the understanding of *C. burnetii* circulation in infected flocks. Indeed, it is essential to repeat the sampling process with the same animals so as to understand how serological responses and shedding dynamics vary over time and between individuals; such data are critical for contextualizing transversal serosurveys and improving the interpretation of results at different levels.

Here, we took up the challenge of carrying out a longitudinal study within a naturally infected flock of sheep. The originality of our study resides in the fact that we

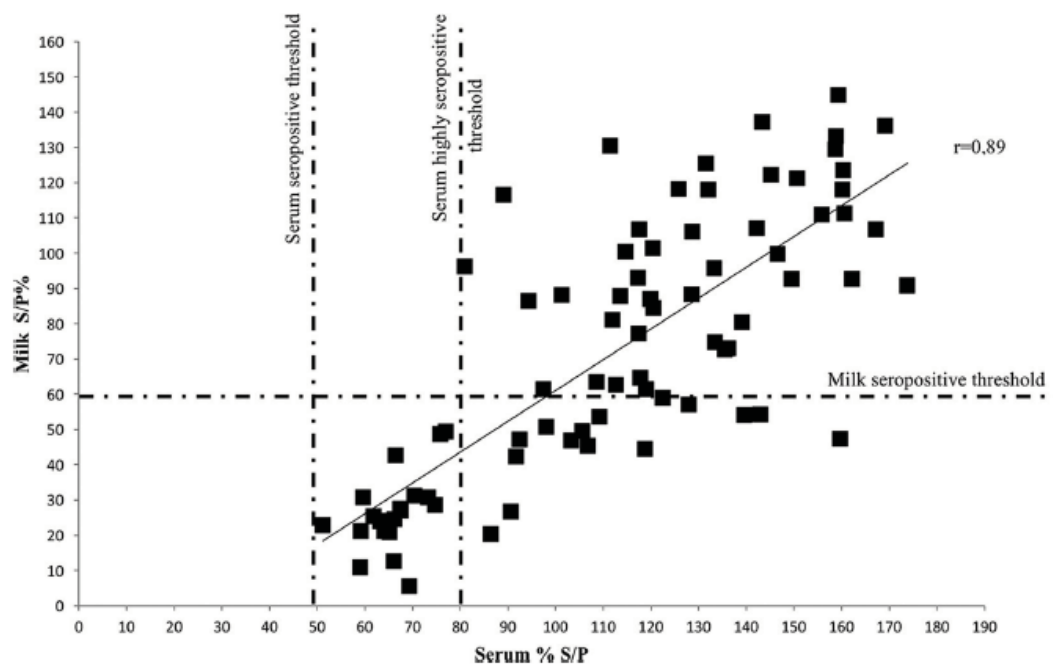


FIG 4 Correlation between S/P values obtained for individual serum and milk samples from dairy females for which S/P values were above the positivity threshold (i.e., >50%) ($n = 82$ samples from 26 nonaborting dairy females and 2 aborting females that had adopted a lamb).

concomitantly assessed the relationship between seropositivity and shedding, described antibody kinetics in both milk and serum samples, and investigated passive immunity in ewe lambs.

Seropositivity and vaginal shedding are not clearly correlated. To control Q fever transmission among animals and from animals to humans, it is vital to have tools that reliably detect *C. burnetii* shedders. In this study, we found that seropositivity was not indicative of whether ewes had recently been shedding *C. burnetii*, an observation that has already been reported for sheep (21, 25, 26), cows (22), and goats (27). Indeed, we observed that some ewes remained seronegative although they were shedding *C. burnetii* in their vaginal mucus, while others were seropositive although no vaginal shedding was detected. Interestingly, however, most of the seropositive females displayed PCR results above 10^4 genome equivalents per swab, which is the

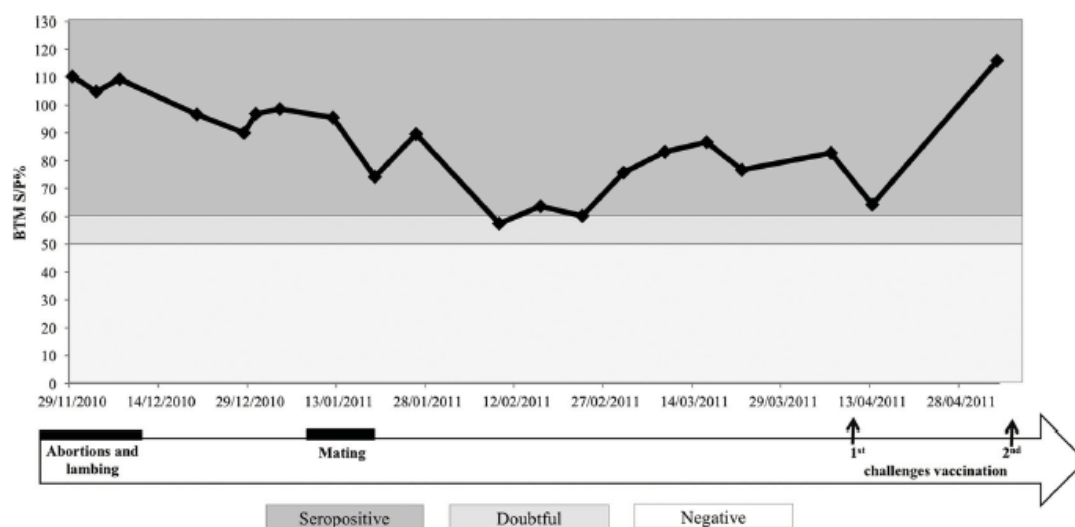


FIG 5 S/P values obtained over time for bulk tank milk (BTM) samples ($n = 26$).

threshold suggested by a group of French experts for considering that abortion in ruminants is caused by *C. burnetii* (28). Additionally, we found that all ewes whose burdens were greater than 5×10^6 genome equivalents per vaginal swab were systematically strongly seropositive 1 month postabortion or postlambling. Overall, these results suggest that, while serology is a useful tool for assessing exposure to *C. burnetii* at the flock level, it cannot be used alone to assess the infection status of an individual sheep.

Antibody levels in milk samples are correlated with those in serum samples.

Bulk tank milk serological analyses are occasionally used for cattle (12, 29, 30), goat (31, 32), and sheep (33, 34) herds to reveal exposure to *C. burnetii*. Here, we found that antibody levels in bulk tank milk were generally indicative of the serological results obtained from individual serum samples from the dairy ewes included in the individual follow-up study, as reported previously for other sheep and goat farms (35, 36). Therefore, our findings suggest that serological analysis of bulk tank milk is a relevant tool for assessing within-flock seroprevalence. Accordingly, we found a strong correlation between antibody levels detected in the serum and milk samples collected on the same day from individual ewes, as investigated previously in cattle (12, 37). With the positivity threshold currently recommended by the kit manufacturer, however, the ELISA used in this study appeared to detect positive serum samples more frequently than positive milk samples. Because no reference test is available for the serological diagnosis of Q fever (3), the sensitivity and specificity of all Q fever serological tests have been insufficiently characterized; in this context, it might be useful to reanalyze the serum and milk samples from this study using other commercial ELISA kits, in order to confirm the observed status and to identify potential discordant test results.

Furthermore, as part of a previous study (38), we tested the same milk samples for the presence of *C. burnetii* DNA; shedding was detected only for certain females with small bacterial burdens, over short periods just after abortion or lambing. These results confirm that milk may be used to reveal past exposure to *C. burnetii* through serological analyses (15, 39, 40) but it is not a reliable matrix for detecting ongoing shedding in sheep, contrary to findings for goats (32, 41).

Breeding conditions may explain variations in antibody levels over time. We observed slight variations in both serum and milk antibody levels over time, which could be explained by several physiological and environmental factors. First, we observed slight decreases in antibody levels just after mating for all of the monitored females and just before lambing for females that were included in the study as ewe lambs. Our observations are novel, to our knowledge, for small ruminants but are consistent with those already described for gestating dairy cows (42–45). These variations during the birthing and mating periods might be related either to an increase in stress due to pen movements or to hormonal variations.

Second, we also observed variations in antibody levels after vaccination. For most of the monitored females, a serological response was clearly noticed following the first and second vaccination challenges. Although the vaccine manufacturer does not recommend vaccination during pregnancy, we did not observe any adverse clinical signs among the suckler females that were vaccinated at 2 months of gestation. This finding is in agreement with the absence of adverse vaccination effects reported previously for goats (10, 15) and cows (46). Interestingly, the antibody levels detected for these females were similar to those detected for nonvaccinated aborting females. This result highlights the need to develop serological methods that differentiate between infected and vaccinated animals.

Finally, as described previously for calves (47), colostrum intake from seropositive mothers is essential for transferring maternal antibodies to offspring, possibly having major consequences for the health of juveniles (48, 49). Here we report maternal antibody transmission in a naturally infected flock of sheep. We observed that one of the ewe lambs born to a seropositive dam did not harbor maternal antibodies, which suggests that its colostrum intake was insufficient. The levels of antibodies in all of the other lambs born to seropositive dams decreased during the first 2 months after birth,

TABLE 2 Numbers of aborting and nonaborting females sampled, according to the pen, breed, parity, and sampling period

Sampling period (every 3 wk)	Pen	Breed	Parity	No. of aborting females	No. of nonaborting females
From November 2010 to July 2011	Dairy	Lacaune	Multiparous	1 ^a	19
			Primiparous	1 ^a	7
From December 2010 to July 2011	Dairy and then suckler ^b	Lacaune	Multiparous	9 ^b	0
		Lacaune-Rouge de l'Ouest	Multiparous	0	14
	Suckler	Lacaune	Primiparous	0	6
			Nulliparous	0	9 ^a
			Total		11

^aThe farmer made these females adopt a lamb, to keep them in the dairy pen.

^bDairy females aborted in the dairy pen and were progressively transferred to the suckler pen after abortion.

^cEwe lambs were transferred to the dairy pen before the mating period (i.e., 7 months after the start of the study).

^dThese ewe lambs were born to nonaborting multiparous dairy females monitored in this study.

which is consistent with the expected kinetics of maternal antibodies. Unexpectedly, the responses to vaccination varied between ewe lambs regardless of the serological status of their mothers. Interestingly, one of the ewe lambs born to a seronegative dam displayed an early increase in S/P values, perhaps in response to natural exposure to *C. burnetii*.

Conclusion and perspectives. This study provides serological data that complement previously published data on shedding dynamics and environmental contamination in a sheep flock (38). Such field data are particularly valuable for optimizing the understanding of *C. burnetii* circulation dynamics in naturally infected flocks. However, complementary pathophysiological research is needed to explain the regulating mechanisms of seroconversion in both shedding and nonshedding females and to understand the respective roles of humoral and cell-mediated immune responses (10, 39).

Overall, our results highlight the complexity of deciphering *C. burnetii* epidemiology and confirm the need to use a combination of indicators to assess the Q fever status of livestock farms. In particular, this longitudinal study provides new knowledge that can be exploited in future studies regarding (i) the appropriate females to monitor, (ii) the appropriate samples to collect, (iii) the appropriate analyses to perform, and (iv) the optimal sampling periods. These data will help improve field protocols tailored to specific objectives, e.g., the surveillance and diagnosis of Q fever abortive episodes, the identification of shedding farms, and follow-up monitoring of sanitary measures. The optimization of such protocols is crucial for the implementation of efficient animal and public health management measures in the framework of the One Health global approach.

MATERIALS AND METHODS

Field sampling. (I) Flock selection. The study was carried out on a flock of 610 sheep divided into two pens of 360 purebred Lacaune dairy sheep and 250 crossbred Lacaune-Rouge de l'Ouest sheep. The lambing season took place in late autumn and late spring for the dairy and suckler pens, respectively. The flock was selected for study following abortions by 10 multiparous dairy ewes (an additional primiparous dairy ewe aborted about 1 month after the start of the study). Four of the aborting dairy ewes were screened for diverse infectious abortive microorganisms. *C. burnetii* was identified as the etiological agent; indeed, all of the laboratory results were negative for toxoplasmosis, chlamydiosis, listeriosis, salmonellosis, campylobacteriosis, and border disease, whereas quantitative PCR (qPCR) tests were positive for *C. burnetii*. With the exception of 2 ewes (1 primiparous and 1 multiparous) to which the farmer had given a lamb for adoption, the aborting females were transferred from the dairy pen to the suckler pen (Table 2). None of the sheep had been vaccinated against Q fever before the start of the study. However, the farmer administered an inactivated vaccine (Coxevac; CEVA-Santé Animale, Libourne, France) to all nonaborting females approximately 5 months after the start of the study, i.e., 2 months before mating (dairy pen) or lambing (suckler pen). The 2 aborting females that had adopted a lamb were vaccinated along with all of the other dairy females in the dairy pen. The farmer made all decisions regarding vaccination independently of our cohort study.

(II) Animal sampling. Overall, 66 sheep were monitored (Table 2), i.e., 37 dairy ewes (including 11 that had aborted [10 multiparous and 1 primiparous] and 26 that had not [19 multiparous and 7 primiparous]), 20 nonaborting suckler ewes (14 multiparous and 6 primiparous), and 9 ewe lambs (born

TABLE 3 IDvet ELISA interpretation thresholds defined by the manufacturer

Sample type and S/P value (%)	Status
Serum	
<40	Negative
40 to <50	Doubtful
50 to ≤80	Positive
>80	Highly positive
Milk	
<50	Negative
50 to ≤60	Doubtful
>60	Positive

to 9 of the 19 nonaborting multiparous dairy ewes). The ewe lambs were monitored from their first month of life (i.e., between 16 and 20 days of age) until their first lambing. Descriptive data about the *C. burnetii* shedding dynamics of the 37 dairy ewes have been reported elsewhere (38); here we considered only the vaginal samples collected from those females during the first month postabortion or postlambing. When two vaginal samples were available, only the most loaded (i.e., the one that displayed the greatest bacterial burden by qPCR) was considered. Blood samples were collected from each monitored female every 3 weeks for 8 months. Samples of 3 ml of whole blood were collected in dry tubes from the jugular vein; serum was recovered after centrifugation (10 min at $3,000 \times g$, room temperature) and frozen at -20°C . Additional blood samples were collected from all of the monitored females 1 year after the beginning of the study, i.e., after their next lambing (dairy pen) or 1 month before mating (suckler pen). Milk samples were collected from dairy ewes every 3 weeks for 8 months. Individual milk samples (5 ml) were collected in a sterile flask after the teats were disinfected with an alcohol wipe and the first spurts were eliminated. Finally, 5 ml of bulk tank milk was collected in a sterile flask once a week for 5 months.

Laboratory analyses. Serum and milk samples were analyzed using the IDvet ID Screen Q fever indirect multispecies ELISA kit (IDvet, Grabels, France). This kit is based on a mix of phase I and II antigens obtained after the purification and inactivation of a *C. burnetii* strain isolated from the placenta of an aborting cow. The results were read at 450 nm using a μ Quant spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT). Positive and negative internal controls were included in each plate. The optical density (OD) values obtained were expressed as the mean percentage of sample/positive (S/P) values, as recommended by the kit producer, as follows: $\text{S/P value} = (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{neg.control}}) / (\text{OD}_{\text{pos.control}} - \text{OD}_{\text{neg.control}})$, where $\text{OD}_{\text{pos.control}}$ and $\text{OD}_{\text{neg.control}}$ are the OD values for the positive and negative controls, respectively.

Serum and milk samples were classified, based on S/P values, as highly seropositive, seropositive, doubtful, or seronegative, in accordance with the manufacturer's recommendations (Table 3). We considered a female to have seroconverted when its S/P values increased over time from below the doubtful threshold to above the positivity threshold.

Bacterial burdens in vaginal mucus samples were estimated by a real-time qPCR method targeting the multicopy IS1111 gene, as described previously (38). Serial dilutions of genomic DNA prepared from the Nine Mile phase II RSA 493 isolate (ANSES, Sophia Antipolis, France) were used as quantitative standards. The minimum limit of quantification of the method was assessed as 5×10^2 genome equivalents per swab, which corresponds to the lowest concentration of the Nine Mile isolate standard curve; similarly, the maximum limit of quantification was assessed as 5×10^6 genome equivalents per swab, which corresponds to the highest concentration of the Nine Mile isolate standard curve. A female was considered a shedder when *C. burnetii* DNA was detected at levels above twice the minimum limit of quantification (1×10^3 genome equivalents per swab) for at least one of the vaginal samples collected during the first month postabortion or postlambing.

Statistical tests. We used Fisher's exact test to investigate the relationships between seropositivity and shedding. We calculated a correlation coefficient and carried out a kappa test to assess the quantitative and qualitative correlations, respectively, of the serological results obtained from serum and milk samples. Statistical analyses were performed using R version 3.1.0 software. Our α level for statistical significance was set at 0.05.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the farmer and his family for providing access to the sheep flock, Sabine Atger and Valérie Poux for their involvement in collecting samples, and Sabine Atger and Angélique Pion for performing ELISAs.

This study received technical and financial support from IDvet (Grabels, France).

REFERENCES

- Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res* 36:327–349. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005010>.
- Van den Brom R, van Engelen E, Roest HJ, van der Hoek W, Vellema P. 2015. *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. *Vet Microbiol* 181:119–129. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.011>.
- OIE. 2015. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees), p 2.1.16. OIE, Paris, France. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.16_Q_FEVER.pdf.

4. EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). 2010. Scientific opinion on Q fever. EFSA J 8:1595. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1595>.
5. Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D. 2004. Wind in November, Q fever in December. Emerg Infect Dis 10:1264–1269. <https://doi.org/10.3201/eid1007.030724>.
6. van Leuken JPG, van de Kasstele J, Sauter FJ, van der Hoek W, Heederik D, Havelaar AH, Swart AN. 2015. Improved correlation of human Q fever incidence to modelled *Coxiella burnetii* concentrations by means of an atmospheric dispersion model. Int J Health Geogr 14:14. <https://doi.org/10.1186/s12942-015-0003-y>.
7. European Centre for Disease Prevention and Control. 2010. ECDC technical report: risk assessment on Q fever. European Centre for Disease Prevention and Control, Solna, Sweden. http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1005_TER_Risk_Assessment_Qfever.pdf.
8. Rousset E, Prigent M, Ameziene G, Brugidou R, Martel I, Grob A, Gall GL, Kerninon S, Delaval J, Chassin A, Vassiloglou B, Valogne S AA, Ogier M, Audeval C, Colocci F, Perennes S, Cazalis L, Nicollet P, CCM, Sidi-Boumedine K. 2012. Adoption by a network's laboratories of a validated quantitative real-time PCR method for monitoring Q fever abortions in ruminant livestock. Euroreference 8:21–28.
9. Martinov SP, Pandurov S. 2005. Serological study of experimental and natural Q fever in cattle and sheep. Biotechnol Biotechnol Equip 19: 165–169. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817175>.
10. Sánchez J, Souriau A, Buendía AJ, Arricau-Bouvery N, Martínez CM, Salinas J, Rodolakis A, Navarro JA. 2006. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study. J Comp Pathol 135:108–115. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.06.003>.
11. Lang GH. 1990. Coxiellosis (Q fever) in animals, p 23–48. In Marrie TJ (ed), Q fever, vol 1. The disease. CRC Press, Boca Raton, FL.
12. Astobiza I, Ruiz-Fons F, Pinerio A, Barandika JF, Hurtado A, Garcia-Perez AL. 2012. Estimation of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy cattle in intensive systems by serological and molecular analyses of bulk-tank milk samples. J Dairy Sci 95:1632–1638. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4721>.
13. Tutusaus J, Lopez-Gatius F, Serrano B, Monleon E, Badiola JJ, Garcia-Ispuerto I. 2014. Serological and shedding patterns after *Coxiella burnetii* vaccination in the third gestation trimester in dairy cows. Acta Vet Hung 62:145–154. <https://doi.org/10.1556/AVet.2014.005>.
14. Guatteo R, Joly A, Beaudeau F. 2012. Shedding and serological patterns of dairy cows following abortions associated with *Coxiella burnetii* DNA detection. Vet Microbiol 155:430–433. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.026>.
15. Rodolakis A, Berri M, Hechard C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, Blanchard B, Camuset P, Devillechaise P, Natorp JC, Vadet JP, Arricau-Bouvery N. 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. J Dairy Sci 90:5352–5360. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-815>.
16. Rousset E, Berri M, Durand B, Dufour P, Prigent M, Delcroix T, Touratier A, Rodolakis A. 2009. *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. Appl Environ Microbiol 75:428–433. <https://doi.org/10.1128/AEM.00690-08>.
17. Anastacio S, Tavares N, Carolino N, Sidi-Boumedine K, da Silva GJ. 2013. Serological evidence of exposure to *Coxiella burnetii* in sheep and goats in central Portugal. Vet Microbiol 167:500–505. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.004>.
18. Anastacio S, Carolino N, Sidi-Boumedine K, da Silva GJ. 2016. Q fever dairy herd status determination based on serological and molecular analysis of bulk tank milk. Transbound Emerg Dis 63:e293–e300. <https://doi.org/10.1111/tbed.12275>.
19. González-Barrio D, Fernández-de-Mera IG, Ortiz JA, Queirós J, Ruiz-Fons F. 2015. Long-term dynamics of *Coxiella burnetii* in farmed red deer (*Cervus elaphus*). Front Vet Sci 2:74. <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00074>.
20. Astobiza I, Barandika JF, Hurtado A, Juste RA, Garcia-Perez AL. 2010. Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. Vet J 184:172–175. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.01.017>.
21. Berri M, Souriau A, Crosby M, Crochet D, Lechopier P, Rodolakis A. 2001. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. Vet Rec 148:502–505. <https://doi.org/10.1136/vr.148.16.502>.
22. Carrieri M, Tissot-Dupont H, Rey D, Brousse P, Renard H, Obadia Y, Raoult D. 2002. Investigation of a slaughterhouse-related outbreak of Q fever in the French Alps. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 21:17–21. <https://doi.org/10.1007/s10096-001-0645-5>.
23. Dupuis G, Petite J, Péter O, Vouilloz M. 1987. An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine valley. Int J Epidemiol 16:282–287. <https://doi.org/10.1093/ije/16.2.282>.
24. van der Hoek W, Hunink J, Vellema P, Droogers P. 2011. Q fever in the Netherlands: the role of local environmental conditions. Int J Environ Health Res 21:441–451. <https://doi.org/10.1080/09603123.2011.574270>.
25. Astobiza I, Barandika JF, Ruiz-Fons F, Hurtado A, Povedano I, Juste RA, Garcia-Perez AL. 2011. Four-year evaluation of the effect of vaccination against *Coxiella burnetii* on reduction of animal infection and environmental contamination in a naturally infected dairy sheep flock. Appl Environ Microbiol 77:7405–7407. <https://doi.org/10.1128/AEM.05530-11>.
26. Khaled H, Sidi-Boumedine K, Merdja S, Dufour P, Dahmani A, Thiéry R, Rousset E, Bouyoucef A. 2016. Serological and molecular evidence of Q fever among small ruminant flocks in Algeria. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 47:19–25. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.05.002>.
27. de Cremoux R, Rousset E, Touratier A, Audusseau G, Nicollet P, Ribaud D, David V, Le Pape M. 2012. Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii*-inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. FEMS Immunol Med Microbiol 64:104–106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00892.x>.
28. Sidi-Boumedine K, Rousset E, Henning K, Ziller M, Niemczuck K, Roest HIJ, Thiéry R. 2010. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. EFSA Support Publ 7:48E. <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/48e.htm>.
29. Taurel AF, Guatteo R, Joly A, Beaudeau F. 2012. Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of *Coxiella burnetii* in cows. Epidemiol Infect 140:1710–1713. <https://doi.org/10.1017/S0950268811002275>.
30. van Engelen E, Schotten N, Schimmer B, Hautvast JL, van Schaik G, van Duinhoven YT. 2014. Prevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* (Q fever) in Dutch dairy cattle herds based on bulk tank milk testing. Prev Vet Med 117:103–109. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.08.016>.
31. Van Den Brom R, Van Engelen E, Vos J, Luttikholt SJM, Moll L, Roest HIJ, Van Der Heijden H, Vellema P. 2013. Detection of *Coxiella burnetii* in the bulk tank milk from a farm with vaccinated goats, by using a specific PCR technique. Small Rumin Res 110:150–154. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.11.024>.
32. Van den Brom R, Santman-Berends I, Luttikholt S, Moll L, Van Engelen E, Vellema P. 2015. Bulk tank milk surveillance as a measure to detect *Coxiella burnetii* shedding dairy goat herds in the Netherlands between 2009 and 2014. J Dairy Sci 98:3814–3825. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9029>.
33. Garcia-Perez AL, Astobiza I, Barandika JF, Atxaerandio R, Hurtado A, Juste RA. 2009. Investigation of *Coxiella burnetii* occurrence in dairy sheep flocks by bulk-tank milk analysis and antibody level determination. J Dairy Sci 92:1581–1584. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1672>.
34. Ruiz-Fons F, Astobiza I, Barandika JF, Juste RA, Hurtado A, Garcia-Perez AL. 2011. Measuring antibody levels in bulk-tank milk as an epidemiological tool to search for the status of *Coxiella burnetii* in dairy sheep. Epidemiol Infect 139:1631–1636. <https://doi.org/10.1017/S0950268810003134>.
35. van den Brom R, van Engelen E, Luttikholt S, Moll L, van Maanen K, Vellema P. 2012. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples from dairy goat and dairy sheep farms in the Netherlands in 2008. Vet Rec 170: 310–316. <https://doi.org/10.1136/vr.100304>.
36. de Cremoux R, Rousset E, Touratier A, Audusseau G, Nicollet P, Ribaud D, David V, Le Pape M. 2012. *Coxiella burnetii* vaginal shedding and antibody responses in dairy goat herds in a context of clinical Q fever outbreaks. FEMS Immunol Med Microbiol 64:120–122. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00893.x>.
37. Guatteo R, Beaudeau F, Joly A, Seegers H. 2007. Performances of an ELISA applied to serum and milk for the detection of antibodies to *Coxiella burnetii* in dairy cattle. Rev Med Vet 158:250–252.
38. Joulié A, Laroucau K, Bailly X, Prigent M, Gasqui P, Lepetitcolin E, Blanchard B, Rousset E, Sidi-Boumedine K, Jourdain E. 2015. Circulation of *Coxiella burnetii* in a naturally infected flock of dairy sheep: shedding

- dynamics, environmental contamination, and genotype diversity. *Appl Environ Microbiol* 81:7253–7260. <https://doi.org/10.1128/AEM.02180-15>.
39. Roest HJ, Post J, van Gelderen B, van Zijderveld FG, Rebel JMJ. 2013. Q fever in pregnant goats: humoral and cellular immune responses. *Vet Res* 44:67. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-67>.
 40. Berri M, Souriau A, Crosby M, Rodolakis A. 2002. Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. *Vet Microbiol* 85:55–60. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00480-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00480-1).
 41. Boarbi S, Mori M, Rousset E, Sidi-Boumedine K, Van Esbroeck M, Fretin D. 2014. Prevalence and molecular typing of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk in Belgian dairy goats, 2009–2013. *Vet Microbiol* 170:117–124. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.025>.
 42. Nogareda C, Almeria S, Serrano B, Garcia-Ispuerto I, Lopez-Gatius F. 2012. Dynamics of *Coxiella burnetii* antibodies and seroconversion in a dairy cow herd with endemic infection and excreting high numbers of the bacterium in the bulk tank milk. *Res Vet Sci* 93:1211–1212. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.03.003>.
 43. Lopez-Gatius F, Almeria S, Garcia-Ispuerto I. 2012. Serological screening for *Coxiella burnetii* infection and related reproductive performance in high producing dairy cows. *Res Vet Sci* 93:67–73. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.07.017>.
 44. Garcia-Ispuerto I, Nogareda C, Yaniz JL, Almeria S, Martinez-Bello D, de Sousa NM, Beckers JF, Lopez-Gatius F. 2010. *Neospora caninum* and *Coxiella burnetii* seropositivity are related to endocrine pattern changes during gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 74:212–220. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.004>.
 45. Garcia-Ispuerto I, Almeria S, Lopez-Gatius F. 2011. *Coxiella burnetii* seropositivity is highly stable throughout gestation in lactating high-producing dairy cows. *Reprod Domestic Anim* 46:1067–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01788.x>.
 46. Guatteo R, Seegers H, Joly A, Beaudreau F. 2008. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *Coxiella burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine* 26:4320–4328. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.023>.
 47. Tutusaus J, Lopez-Gatius F, Almeria S, Serrano B, Monleon E, Badiola JJ, Garcia-Ispuerto I. 2013. No detectable precolostral antibody response in calves born from cows with cotyledons positive for *Coxiella burnetii* by quantitative PCR. *Acta Vet Hung* 61:432–441. <https://doi.org/10.1556/AVet.2013.026>.
 48. Boulonier T, Staszewski V. 2008. Maternal transfer of antibodies: raising immuno-ecology issues. *Trends Ecol Evol* 23:282–288. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.12.006>.
 49. Hasselquist D, Nilsson JÅ. 2009. Maternal transfer of antibodies in vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:51–60. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0137>.

Principaux résultats

- ✚ Les **taux d'anticorps** dans le **sérum** sont **stables au cours du temps** et sont également **indicateurs de l'exposition** des différents lots de femelles suivis.
- ✚ Une **faible corrélation** est observée durant le premier mois post mise bas ou avortement **entre la séropositivité** dans le sérum et **l'excrétion dans le mucus vaginal**.
- ✚ Une **forte corrélation** est observée entre les **anticorps** détectés dans le **sérum** et ceux détectés dans le **lait individuel** des femelles suivies au cours du temps.
- ✚ Les **taux d'anticorps** détectés dans le **lait de tank du troupeau** sont **cohérents** avec ceux détectés dans le **sérum des femelles suivies** au cours du temps.
- ✚ Une **transmission des anticorps maternels** a été observée chez les **agnelles** suivies.

III.2 Description de la diversité génotypique des souches de *Coxiella burnetii* circulantes en élevages de ruminants domestiques en France

Après s'être intéressé à la dynamique de circulation de *C. burnetii* dans un troupeau ovin naturellement infecté ainsi qu'à la diversité génotypique des souches circulantes dans cet élevage, nous avons évalué cette diversité à une plus grande échelle. En effet, dans ce paragraphe nous décrirons la diversité de *C. burnetii* à l'échelle des principales zones d'élevages de ruminants domestiques en France, tout en complétant les données génotypiques précédemment décrites en intra-élevage (paragraphe III.1.2.2).

III.2.1 Méthodologie générale

III.2.1.1 Échantillonnage

Les échantillons sélectionnés proviennent de trois dispositifs de surveillance de la fièvre Q chez les ruminants domestiques en France (détaillés à la fin de ce paragraphe). L'ensemble des échantillons a été envoyé par les laboratoires vétérinaires départementaux partenaires au laboratoire national de référence en fièvre Q animale (LNR - ANSES de Sophia Antipolis) entre 2006 et 2015. Ces échantillons ont été collectés en contexte d'avortement diagnostiqués comme imputables à *C. burnetii* au regard des charges bactériennes détectées (plus de 10^4 GE/ml). Une minorité d'échantillons provenant de différents suivis longitudinaux mis en place par l'INRA en élevages de petits ruminants domestiques naturellement infectés en région Auvergne-Rhône-Alpes a également été intégrée à l'étude.

Nous avons travaillé sur des matrices classiquement prélevées pour le diagnostic d'avortement de la fièvre Q, à savoir : placentas, écouvillons vaginaux (pour les trois espèces de ruminants) ou endocervicaux (pour les bovins uniquement), et organes d'avortons.

Sélection selon la charge bactérienne. Parmi tous les échantillons réceptionnés, seuls les échantillons pour lesquels la charge bactérienne était supérieure à 5.10^4 GE/ml ont été conservés pour notre étude. Le seuil ainsi choisi optimisait les chances d'obtenir un signal PCR au moment du typage MLVA. Pour les échantillons pour lesquels l'ADN n'était pas disponible (échantillons bruts), nous avons sélectionné uniquement les échantillons les plus fortement chargés en bactéries selon les résultats de quantification fournis par le laboratoire d'envoi. Ces échantillons ont donc été broyés, puis extraits et re-quantifiés par qPCR à l'ANSES de Sophia Antipolis.

Sélection selon la localisation géographique des élevages. Nous avons ensuite considéré la localisation géographique de provenance des échantillons. Pour notre étude, seuls les élevages pour lesquels le numéro de cheptel (numéro EDE) était fourni ont été choisis. En effet, les 5 premiers chiffres du numéro EDE correspondent au code INSEE de la commune sur laquelle l'élevage se situe.

Trois grandes zones d'élevages ont été ciblées prioritairement : le nord-ouest, le centre-sud et le centre-ouest de la France, pour leur grande concentration en élevages bovins, ovins et caprins respectivement. Quatre zones d'élevages supplémentaires ont également été sélectionnées, dans lesquelles les systèmes d'élevage sont considérés comme plus extensifs : Pays Basque, Hautes-Alpes, Puy-de-Dôme et Saône et Loire.

Deux niveaux d'études ont été distingués : un niveau inter et un niveau intra-élevage. Dès lors que plusieurs femelles avaient avorté dans un même troupeau, seul l'échantillon le plus fortement chargé en bactéries a été conservé (étude « inter-élevage ») afin de décrire de façon exhaustive la diversité des souches circulantes dans une même zone de production (*Figure 6*). Les échantillons restant nous ont permis d'avoir un aperçu de la diversité des souches circulantes dans un même troupeau infecté (étude « intra-élevage » - *Figure 6*).

III.2.1.1 Typage

MLVA. Au total, 383 échantillons remplissaient l'ensemble des critères d'inclusion pour l'étude génotypique MLVA dont 66 proviennent du réseau « Cox » mis en place de 2006 à 2009 par l'unité fièvre Q animale de l'ANSES de Sophia Antipolis; 30 du réseau « EpiChlamCox » mis en place de 2010 à 2012 entre le laboratoire national de référence (LNR) en fièvre Q animale, l'équipe Chlamydirose de l'unité des zoonoses bactériennes et l'unité d'Épidémiologie des maladies animales infectieuses à l'ANSES de Maisons-Alfort; 37 d'un laboratoire privé (Scanélis) assurant la plupart des analyses vétérinaires en zone AOP « Roquefort » ; et 36 des suivis longitudinaux mis en place en région Auvergne-Rhône-Alpes au cours de ma thèse. En outre, la majorité des échantillons (214 sur 383) proviennent du réseau pilote « d'épidémiosurveillance de la fièvre Q » mis en place de 2012 à 2015, dans le cadre de la surveillance événementielle des avortements imputables à *C. burnetii*.

Le LNR fièvre Q animale était en charge de l'animation du réseau de collecte des échantillons auprès des laboratoires vétérinaires départementaux partenaires.

La répartition géographique des échantillons sélectionnés pour les études inter et intra-élevages est synthétisée dans *l'annexe II* ainsi que sur la carte de l'article 3 (paragraphe IV.2.2.2).

Liste des structures et personnes impliquées dans les différents réseaux de collecte des échantillons dans les élevages de ruminants Français

Réseau « Cox »

- Unité fièvre Q animale (ANSES Sophia Antipolis) : **Elodie Rousset**

Réseau EpiChlamCox

- LNR en fièvre Q animale (ANSES Sophia Antipolis) : **Elodie Rousset & Karim Sidi-Boumedine**
- Unité des zoonoses bactériennes, équipe Chlamydiose (ANSES Maisons-Alfort) : **Karine Laroucau**
- Unité Épidémiologie des maladies animales infectieuses (Maisons-Alfort) : **Benoît Durand**

Scanelis : **Jean-Luc Pingret**

Suivis longitudinaux INRA, Unité mixte de recherche d'épidémiologie des maladies animales et zoonotiques (UMR EpiA) : **Elsa Jourdain & Aurélien Joulé**

Réseau pilote « d'épidémiosurveillance de la fièvre Q »

- LNR en fièvre Q animale : **Elodie Rousset**
- Direction générale de l'alimentation : **Jean-Baptiste Perrin & Séverine Rautureau**
- ANSES Lyon : **Carole Sala, Didier Calavas & Anne Bronner**
- Groupement de défense sanitaire (GDS) France : **Kristel Gache & Anne Touratier**
- GDS Alpes-de-Haute-Provence : **Jean-Luc Champion**
- Association française des Directeurs et cadres des Laboratoires Vétérinaires Publics d'Analyses : **Lydia Zerouki, Philippe Nicollet & Chantal Audeval**
- Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires : **Frédéric Lars, Soline Hosteing & Jean-Christophe Natorp**
- Races de France : **Françoise Dion**
- Institut de l'Élevage : **Renée de Crémoux**
- INRA Auvergne-Rhône-Alpes, UMR EpiA : **Elsa Jourdain**
- ONIRIS campus vétérinaire de Nantes : **Raphaël Guatteo**
Laboratoires Vétérinaires d'Analyses : Aveyron, Deux-Sèvres, Finistère, Hautes-Alpes, Indre-et-Loire, Manche, Mayenne, Pyrénées-Atlantiques, Saône et Loire

Estimation du nombre de copie IS1111. Cette étude visait à évaluer le nombre de copies du gène IS1111 sur le génome de *C. burnetii* selon l'espèce de ruminants domestiques ainsi que la distribution du nombre de copies en fonction du groupe génotypique MLVA. Pour cela, nous avons choisi parmi l'ensemble des 383 échantillons sélectionnés pour l'étude génotypique précédente, uniquement les extraits d'ADN dont le volume total était supérieur à 10 microlitres (Figure 5). Au total, 314 présentaient un volume d'ADN suffisant (Annexe III).

III.2.2 Article 3: Molecular epidemiology of Coxiella burnetii in French livestock reveals the existence of three main genotype clusters and suggests species-specific associations as well as regional stability

III.2.2.1 Résumé

Contexte. La différenciation entre souches et l'utilisation de marqueurs épidémiologiques sont la base de l'épidémiologie moléculaire permettant l'identification des sources des épidémies de fièvre Q (Arricau-Bouvery et al., 2006). Actuellement, aucune méthode n'est reconnue au niveau international comme méthode de référence. L'exemple le plus frappant est l'absence complète de nomenclature des VNTRs (Sidi-Boumedine and Rousset, 2011). Cependant, comme évoqué précédemment, la méthode MLVA est actuellement considérée comme la plus discriminante en application sur des échantillons provenant directement du terrain.

Dans ce troisième article nous avons évalué la diversité génotypique par MLVA des souches de *C. burnetii* circulantes dans les principales zones d'élevages de ruminants en France.

Objectifs. L'objectif de ce travail était de se focaliser sur des zones à forte endémicité afin de : (i) identifier les associations potentielles entre les génotypes de *C. burnetii* et les espèces hôtes de ruminants ; (ii) évaluer la distribution des génotypes de *C. burnetii* en intra et en inter-élevages dans les principales régions d'élevage en France ; et (iii) suggérer un sous-ensemble de marqueurs à utiliser pour de futures études génotypiques.

Résultats. Dans cette étude, nous avons identifié trois grands groupes génotypiques (A, B et C) subdivisés en 12 sous-groupes distincts, grâce à une approche phylogénétique. Les trois clusters génotypiques étaient chacun significativement associés à l'une des trois espèces de ruminants domestiques étudiées. La majorité des échantillons prélevés sur petits ruminants se regroupaient dans deux clusters (A et B) alors que la quasi-totalité des échantillons prélevés sur bovins se retrouvait dans un seul groupe génotypique (C). La diversité génotypique obtenue dans chacun des trois clusters était également stable au niveau spatio-temporel. En effet, certains génotypes étaient plus spécifiques à certaines régions d'élevages investiguées. Nous

avons également observé une certaine diversité en intra-élevage des souches circulantes. Toutefois, cette diversité était limitée à une différence de répétitions sur au plus 3 marqueurs parmi les 17 utilisés. Enfin, nous avons identifié 6 marqueurs MLVA qui permettaient de maximiser la représentativité de la diversité génotypique obtenue.

Conclusions. Dans cette étude, nous montrons que le génotypage MLVA constitue une des approches les plus discriminantes à utiliser actuellement pour évaluer la diversité génétique des souches de *C. burnetii* et pour révéler l'existence d'associations spécifiques d'espèces et/ou de stabilité régionale. La mise en place de protocoles MLVA standardisés permettra de produire des données essentielles à une meilleure compréhension de la circulation des génotypes entre les différentes espèces de ruminants domestiques et des ruminants à l'Homme. Enfin, au regard de la diversité génotypique obtenue, cette étude suggère d'investiguer plus précisément les liens potentiels entre génotypes et traits de virulence afin d'adapter les mesures de contrôle en santé publique et vétérinaire.

III.2.2.2 Article

Infection, Genetics and Evolution 48 (2017) 142–149



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid



Research paper

Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* in French livestock reveals the existence of three main genotype clusters and suggests species-specific associations as well as regional stability



Aurelien Joulié^{a,b,c}, Karim Sidi-Boumedine^c, Xavier Bailly^a, Patrick Gasqui^a, Séverine Barry^a, Lydia Jaffrelo^d, Charles Poncet^d, David Abrial^a, Elise Yang^c, Animal diagnostic laboratories consortium¹, Agnès Leblond^{a,b}, Elodie Rousset^c, Elsa Jourdain^{a,*}

^a EPIA, INRA, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

^b Université de Lyon, VetAgro Sup, 69280 Marcy l'Etoile, France

^c Anses (French Agency for Food, Environmental, and Occupational Health and Safety), Laboratory of Sophia Antipolis, Animal Q Fever Unit, Sophia Antipolis, France

^d GDEC, INRA, 63039 Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2016

Received in revised form 14 December 2016

Accepted 16 December 2016

Available online xxxx

Keywords:

Q fever

Multiple-Locus Variable number tandem repeats Analysis (MLVA)

Genotyping

Ruminants

Zoonosis

France

ABSTRACT

Q fever is a worldwide zoonosis caused by the bacterium *Coxiella burnetii*. In domestic ruminants, Q fever main clinical manifestations are abortions. Although the clinical signs may differ between ruminant species, *C. burnetii*'s genetic diversity remains understudied in enzootic areas. Here, we focused on France, where Q fever is enzootic, with the aims to (a) identify potential associations between *C. burnetii* genotypes and ruminant host species; (b) assess the distribution of *C. burnetii* genotypes both within French farms and across France's major livestock-farming regions; and (c) suggest a subset of markers for future genotypic studies. We used DNA samples collected between 2006 and 2015 from 301 females (160 cows, 76 ewes, 65 goats) aborted of Q fever within 7 different farming regions. *C. burnetii* diversity was determined using a multiple-locus variable-number of tandem repeat analysis (MLVA) considering 17 markers. Using a phylogenetic approach, we identified 3 main genotypic clusters divided into 12 sub-clusters. These clusters were significantly associated with ruminant species: almost all the cattle genotypes were found in a "cattle-specific" cluster whereas small ruminants genotypes essentially grouped into the two other clusters. The clusters also proved stable over space and time, some genotypes being more specifically observed in certain farming regions. We also observed some within-farm diversity but this diversity was restricted to a same genotypic cluster. Finally, we identified 6 MLVA markers that maximized the representativeness of the diversity described. Overall, we highlighted that molecular epidemiology is a relevant approach to assess *C. burnetii*'s genetic diversity and to reveal the existence of species-specific associations and regional stability. These results will be valuable in the field to trace genotype circulation among ruminants and from ruminants to humans. Ultimately, the potential links between genotypes and virulence traits need to be investigated to adapt control measures in livestock farms.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Q fever is a widespread zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, a Gram-negative intracellular bacterium that has been reported in a broad range of host species. In domestic ruminants, Q fever's major clinical manifestations are abortions and stillbirths, whose occurrence may translate into significant economic losses. Infected females shed *C. burnetii* mainly through birth or abortion products, as well as in feces and milk (Agerholm, 2013; EFSA, 2010). Livestock, and especially small ruminant livestock, are the main sources of human infections (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; EFSA, 2010).

Animals and humans largely become infected through the inhalation of airborne particles contaminated with *C. burnetii* (EFSA, 2010;

* Corresponding author.

E-mail address: elsajourdain@inra.fr (E. Jourdain).

¹ Gaëlle Ameziane^a, Aurélie Chassin^b, Dominique Gauthier^c, Sandrine Kerninon^d, Ghislaine Le Gall^d, Cyril Maingourt^e, Myriam Ogier^f, Claire Pelletier^g, Stéphane Perennes^h, Michael Treilleⁱ

^aAveyron Labo, Rodez, France; ^bLaboratoire de Touraine, Parçay-Meslay, France;

^cLaboratoire vétérinaire départemental des Hautes-Alpes, Gap, France; ^dLABOCEA,

Quimper, France; ^eLaboratoire d'analyses Sèvres Atlantique, Niort, France; ^fLaboratoire

vétérinaire départemental de la Mayenne, Laval, France; ^gLaboratoire d'analyses

départementale de la Saône-et-Loire, Macon, France; ^hLaboratoire des Pyrénées et des

Landes, Lagor, France; ⁱLaboratoire d'analyses de la Manche, Saint-Lô, France.

Tissot-Dupont et al., 2004; van Leuken et al., 2015). In recent years, the incidence of human infections has increased in Europe, especially in the Netherlands, where > 4000 people were found infected with *C. burnetii* between 2007 and 2012 (de Bruin et al., 2012; Dijkstra et al., 2012).

Molecular characterization tools have proved useful in epidemiological studies of Q fever outbreaks as well as in surveillance efforts; they have also enhanced our understanding of the risk factors promoting *C. burnetii* transmission. Indeed, genotyping *C. burnetii* strains collected from livestock farms may help assess potential associations between genotypes and virulence traits, making it possible to trace the origins of outbreaks and to identify when interspecies transmission has occurred (Klaassen et al., 2009; Roest et al., 2011).

Currently, several typing methods are used to characterize *C. burnetii* genotypic diversity (Arricau-Bouvery et al., 2006; Beare et al., 2006; Das et al., 2014; Eldin et al., 2017; Frangoulidis et al., 2014; Glazunova et al., 2005; Hornstra et al., 2011; Santos et al., 2012; Sidi-Boumedine and Rousset, 2011). Multiple-Locus Variable number tandem repeats Analysis (MLVA) is a technique that may be used directly on clinical samples and may identify *C. burnetii* genotypes potentially involved in human outbreaks (Chmielewski et al., 2009; Roest et al., 2013; Sidi-Boumedine and Rousset, 2011; Svraha et al., 2006). To date, 17 MLVA markers have been described (Arricau-Bouvery et al., 2006).

Q fever is considered to be enzootic in French livestock farms (ECDC, 2010). However, general disease circulation among and within farms remains poorly understood because very few studies have investigated *C. burnetii* genotypic diversity in domestic ruminant species (Arricau-Bouvery et al., 2006; Prigent et al., 2015). In this study, we characterized *C. burnetii* genotypes from cattle, goat, and sheep farms in France. Our aims were the following: (a) to identify potential associations between *C. burnetii* genotypes and host species; (b) to assess the distribution of *C. burnetii* genotypes both within French farms and across France's major livestock-farming regions—we included ruminant genotypes described in other European countries in our analyses; and (c) to suggest a useful subset of markers that could be employed in future molecular epidemiology studies in France.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Between 2006 and 2015, vaginal mucus, endocervical mucus, or placental tissue was collected from aborting females (Table 1) on French livestock farms in the context of various Q fever surveillance efforts. We focused on three major farming regions (Fig. 4) that specialize in the production of dairy cattle (northwestern France—departments 29, 50, and 53), dairy goats (western central France—departments 17, 37, 79, 85, and 86), and dairy sheep (southern central France—departments 12, 30, 34, 48). We also included samples from four additional farming regions characterized by extensive livestock breeding and the use of grazing systems (departments 5, 63, 64, 65, and 71). Abortions were diagnosed as being due to *C. burnetii* using a quantitative real-time

Polymerase Chain Reaction (qPCR) analysis based on primers and probes targeting the IS1111 repetitive region of the *C. burnetii* genome, as described in a previous study (Joulie et al., 2015; Rousset et al., 2012). We focused on samples that contained a minimum bacterial burden of 5.10^4 Genome Equivalent per milliliter (GE/mL). We selected the sample with the greatest burden from each farm ($n = 301$ samples; taken from 160 cows, 76 ewes, and 65 goats) with the aim of describing genotypic diversity among farms (Fig. 4b). We also examined within-farm genotypic diversity using multiple samples from 39 different farms ($n = 91$; 2–4 samples per farm, including the sample with the greatest burden) (Table 1).

2.2. Multiple-Locus Variable number tandem repeats Analysis (MLVA)

MLVA was performed using 17 MLVA markers. All *C. burnetii* Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) loci were amplified via Polymerase Chain Reaction (PCR) (Arricau-Bouvery et al., 2006); Nine Mile RSA 493 was used as the reference strain. One of two methods was used to determine amplicon sizes, as detailed below.

For the 15 MLVA loci with expected amplicon sizes of <500 base pairs (Ms01, Ms03, Ms20, Ms21, Ms22, Ms23, Ms24, Ms26, Ms27, Ms28, Ms30, Ms31, Ms33, Ms34, and Ms36), we employed an ABI 3730xl DNA Sequencer (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France). Briefly, the following cycle was used: an initial 10-min denaturation step at 95 °C; 40 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, primer annealing at 58.5 °C for 30 s, and elongation at 72 °C for 1 min; and a final 5-min extension step at 72 °C. All the amplification products were diluted 1:64 in distilled water. Two hundred μ L of GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France) were added to 50 μ L of Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France). Then, 5 μ L of this mixture was added to 2 μ L of the diluted amplicon solution and denatured for 5 min at 95 °C. We used four fluorescent dyes (FAM, VIC, NED, and PET) to pool markers by pairs for migration. The PCR fragments were then separated using the above-mentioned ABI 3730xl DNA Sequencer.

For Ms07 and Ms12, whose amplicon sizes were expected to exceed 1000 base pairs, we used a PCR amplification procedure described elsewhere (Prigent et al., 2015). Briefly, the PCR products were run on an Agilent 2100 Bioanalyzer using a DNA 7500 LabChip® kit. The gel matrix containing the intercalating dye, the chip wells, and the samples were prepared in accordance with the manufacturer's instructions. During electrophoresis, the chip was inserted into the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Les Ulis, France). The samples were analyzed sequentially.

In both methods, the *C. burnetii* Nine Mile strain was used as the reference and was included in all the experiments to normalize the number of repetitions in each assay and to compare the MLVA profiles. MLVA coding was based on the methodology used by Arricau-Bouvery and colleagues (Arricau-Bouvery et al., 2006) and the new MLVA recommendations issued by Université de Paris-Sud (<http://mlva.u-psud.fr/MLVAnet/spip.php?rubrique50>). Because genotype

Table 1
Number of analyzed samples per type of samples and ruminant species.

Type of samples ^a	Species					
	Cattle		Goat		Sheep	
	Between-farm ^b	Within-farm ^c	Between-farm ^b	Within-farm ^c	Between-farm ^b	Within-farm ^c
Vaginal mucus	53 (47)	13 (13)	28 (24)	31 (21)	60 (55)	23 (17)
Endocervical mucus	44 (43)	13 (13)	–	–	–	–
Placenta	62 (56)	–	37 (29)	11 (8)	15 (11)	–
Unknown	1 (1)	–	–	–	1 (1)	–
Total number of samples (genotypes)	160 (147)	26 (26)	65 (53)	42 (29)	76 (67)	23 (17)

^a Number of analyzed samples (number of interpretable genotypes).

^b Considering only the most loaded sample per farm.

^c Between 2 to 4 samples, including the most loaded comprised in the between-farm study, were genotyped in each farm (see Table 3).

gaps (i.e., unamplified fragments) were observed for some markers, we considered that the genotypes were “interpretable” when we were able to determine a specific number of tandem repeats for at least 13 of the 17 markers tested. We considered that the genotypes were distinct from each other when the number of repeats of at least one of the 17 markers differed, as previously described by Svraka et al. (2006) and as recommended on the above-mentioned website.

For the sake of comparison, we included the MLVA profiles of seven reference strains (Henzerling, Q321, Priscilla Q177, Q154, Q212, Dugway 5J108-111, and Nine Mile RSA 493) (Frangoulidis et al., 2014). We also compared our genotypes with those already described in the literature using at least 14 of our 17 markers (Frangoulidis et al., 2014; Prigent et al., 2015; Racic et al., 2014).

2.3. Genotype clustering

R version 3.0.3 (R.Development.Core.Team, 2014) was used to analyze all our data.

2.3.1. Phylogenetic tree and parsimony network

Because unrelated strains may display identical numbers of tandem repeats for some markers (Eldin et al., 2017; Karlsson et al., 2014), we analyzed altogether the whole set of MLVA markers to provide an overview of the phylogenetic relationships between genotypes, as previously performed on other bacteria such as *Salmonella enterica* (Dimovski et al., 2014) or *Mycobacterium tuberculosis* (Wirth et al., 2008). Therefore, we built an ultra-metric phylogenetic tree using the relative number of observed mismatches among markers and the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) algorithm in Seaview (version 4.5.4); each branch of the phylogenetic tree was considered as a sub-cluster. The corresponding distance matrix was imported into R using the SplitsTree software (version 4.13.1) and analyzed via multidimensional scaling. A parsimony network was constructed using SplitsTree (version 4.13.1), which made it possible to view the relative number of host species per sub-cluster.

2.3.2. Analysis of factors influencing genotype clustering

We used Pillai's trace (Dasgupta, 2005)—one of the test statistics produced when using a multivariate analysis of variance (MANOVA)—to assess whether genotypic diversity was associated with host species, farming region, or both. Then, MLVA clustering was performed using an ascending hierarchical classification scheme in R. The *hclust* function allowed us to determine whether the differences between the genotype clusters were statistically significant. The number of clusters was determined by examining the maximum ratio of between groups to within-group variance.

2.3.3. Discriminatory power of marker combinations

We calculated the Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI) by combining information from the 17 markers analyzed considering all the interpretable genotypes obtained from the 301 samples with the

greatest burden per farm (Hunter and Gaston, 1988). Because genotype gaps (i.e., unamplified fragments) were observed for some markers, we compared the discriminatory power of different subsets of MLVA markers. We identified the most useful subset (from among all the $(2^{17}-1)$ possible combinations) considering the markers with the highest polymorphism and the least amplification failures.

3. Results

Among the 301 samples with greatest burden collected on each farm studied, we succeeded in associating an interpretable MLVA genotype to 267 samples (147 cattle, 53 goat, and 67 sheep; Tables 2 and S1). Moreover, among the 59 additional samples collected on 32 farms where 2–4 females had aborted, 40 displayed interpretable genotypes (Tables 2 and S1).

3.1. Genotype distribution based on phylogenetic distances

We observed diverse allelic profiles among the 267 samples with the greatest burdens for which interpretable MLVA genotypes could be assigned. The HGDI value obtained by combining information from all 17 markers was of 0.875. Using an ascending hierarchical classification scheme, we identified 3 major clusters: A ($n = 76$), B ($n = 48$), and C ($n = 144$) (Fig. 1). Within clusters, we identified some markers with a single allele: two (Ms21 and Ms22) in the A cluster, three (Ms21, Ms22 and Ms36) in the C cluster, but none in the B cluster (Table S1). The average pairwise distances between the A cluster and the B and C clusters obtained with the UPGMA algorithm were 0.52 and 0.33, respectively. The A and C clusters were further divided into several sub-clusters (Fig. 1). There were five A sub-clusters, and most samples fell into A1 (55%) and A3 (32%). There were six C sub-clusters, with C1 containing almost all of the samples (93%).

We compared the *C. burnetii* genotypes that we observed with the genotypes of seven reference strains and diverse genotypes described elsewhere in Europe considering either 17 (Prigent et al., 2015; Racic et al., 2014) or 14 markers (Frangoulidis et al., 2014). The genotypes of the Henzerling and the Nine Mile RSA 493 reference strains fell into the A and C clusters, respectively; the genotypes of the other five reference strains were grouped with the B cluster but displayed very distinct MLVA profiles (Fig. 1). The cattle genotypes identified in our study grouped in the same cluster as the cattle genotypes previously described in Germany, which mostly belonged to the C cluster: C7, C8, and C9. The C cluster also contained two sub-clusters from sheep (C6 from our study and C11 from Prigent et al., 2015), which were both sampled in an area that specializes in ovine production, in southern central France. Conversely, some of the small ruminant genotypes described in other European studies were found in the A and B clusters, together with a cattle genotype previously observed in Switzerland (Fig. 1).

Table 2

Description of the 17 MLVA-markers, the pairs used for joined migration, as well as the diversity index (HGDI) and the representativeness of interpretable genotypes for each marker.

	Subset of markers that allow optimizing both the HGDI and the proportion of interpretable genotypes						Subset of markers that allow optimizing either the HGDI or the proportion of interpretable genotypes							Subset of markers <75% of genotypes interpretable			
Id. markers	Ms03	Ms07	Ms20	Ms27	Ms28	Ms34	Ms12	Ms21	Ms22	Ms30	Ms36	Ms24	Ms31	Ms01	Ms23	Ms26	Ms33
No. of expected repeats	7	8	15	4	6	5	8	6	6	6	4	27	5	4	8	4	9
Fragment length on the Nine Mile genome (pb)	229	1112	402	276	276	210	1074	210	246	308	477	344	285	198	157	127	262
Multiplex	I	DNA chip	II	IV	II	VII	DNA chip	III	III	V	VI	VI	VII	single	I	IV	V
HGDI																	
(Hunter Gaston Diversity index)	0.421	0.550	0.548	0.424	0.620	0.820	0.362	0.270	0.292	0.414	0.330	0.574	0.015	0.481	0.074	0.458	0.460
Interpretable genotypes (%)	100.0	82.4	100.0	99.3	100.0	99.6	79.4	98.1	99.6	100.0	81.3	95.1	99.3	48.7	58.4	73.4	73.0

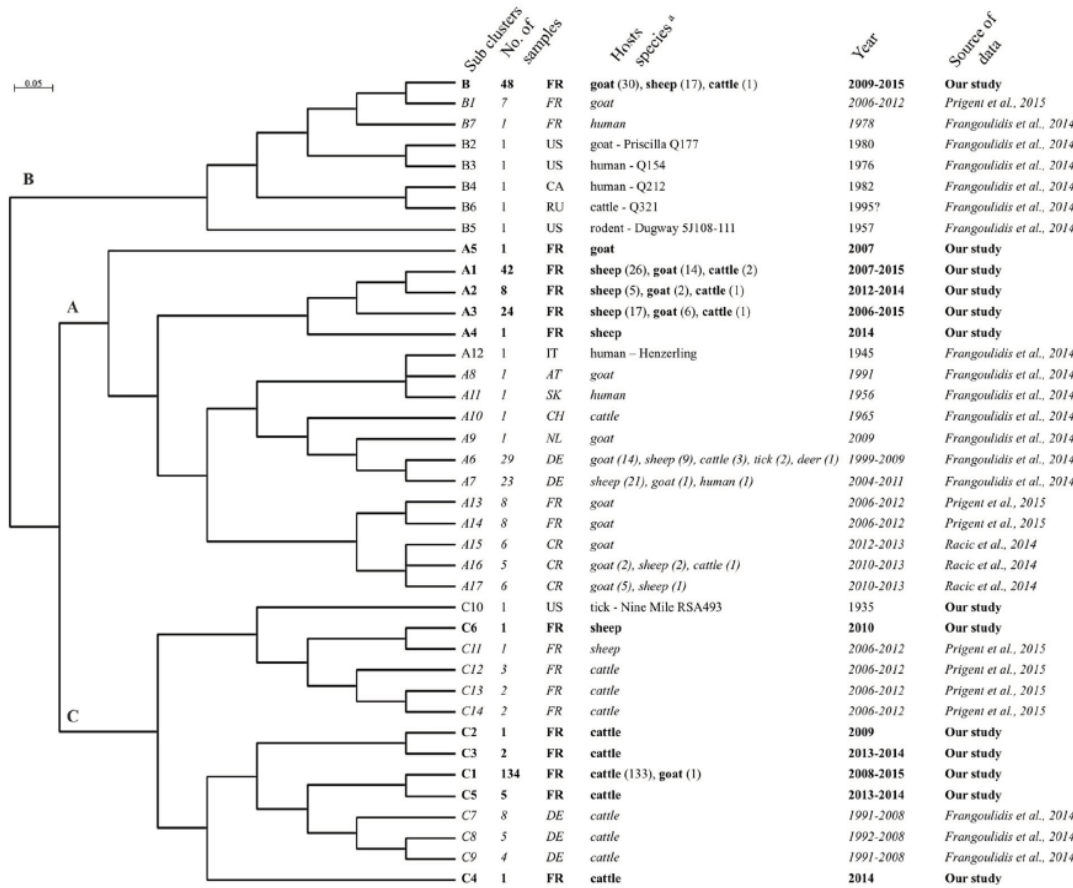


Fig. 1. UPGMA phylogenetic tree based on the observed distances between genotypes, showing the 3 major clusters described in our study. Genotypes from our study are indicated in bold (n = 267), those from other recent European studies in italic and reference strains in classic font. ^anumbers in brackets indicate the respective number of samples per host species when the sub-cluster includes samples from different species.

2. Genotype distribution in ruminant species

Multidimensional scaling was used to represent the pairwise genetic distances; most of the genetic variance (96%) was accounted for and the analysis suggested that genotypic diversity was significantly associated with host species (MANOVA, $p < 0.01$). Indeed, the A and B clusters were mostly composed of sheep (65%) and goat (63%) samples, respectively, while the C cluster was almost exclusively made up of cattle (98%) samples (Fig. 2).

Species associations were also observed within the major sub-clusters. For instance, the A1 (62%) and A3 (71%) sub-clusters largely comprised sheep samples, whereas 92% of the samples in the C1 sub-cluster came from cattle (Fig. 2).

3. Genotype distribution across farming regions

We observed a significant interaction between host species and farming region (MANOVA, $p < 0.01$; Fig. 3). Indeed, samples included in A cluster were mainly observed in southern central (n = 42/76) and western central (n = 23/76) France, whereas those from B and C clusters were found in western central and northwestern France, respectively (n = 28/48 and n = 122/144). However, we did observe some degree of genetic diversity in all the farming regions studied (Fig. 4), except in the case of the C cluster, all of which occurred in northwestern France.

Some clusters (e.g., B) or sub-clusters (e.g., A1, A3, and C1) persisted within a given farming region over time: they were detected in samples from different aborting females for a period of up to 9 years (e.g., from 2006 to 2015 in the case of A3; Fig. 1).

3.4. Selection of a minimal subset of markers

Of the 17 markers considered in this study, 4 (i.e., Ms01, Ms23, Ms26, and Ms33) proved difficult to characterize because their number of tandem repeats could be calculated for only a certain percentage of the 267 samples with interpretable genotypes (48.7%, 58.4%, 73.4%, and 73.0%, respectively). From among the 13 remaining markers, we selected 6 markers (i.e., Ms03, Ms07, Ms20, Ms27, Ms28, and Ms34) that allowed us to optimize both the HGDI value and the percentage of interpretable genotypes. A higher HGDI was observed with this subset than when the full panel was used ($HGDI_{6\text{-markers}} = 0.912$ vs. $HGDI_{17\text{-markers}} = 0.875$).

3.5. Within-farm genotypic diversity

We assessed the genotypic diversity within farms using samples from several females that had experienced Q fever-related abortions (n = 2, 3, or 4 females per farm; Table 3). We observed some within-farm diversity on most farms (n = 5/8 for sheep, 9/12 for goats, and 6/12 for cattle) based on one, two, or three markers out of the 17 considered. However, the genotypes observed within a same farm always belonged to the same sub-cluster.

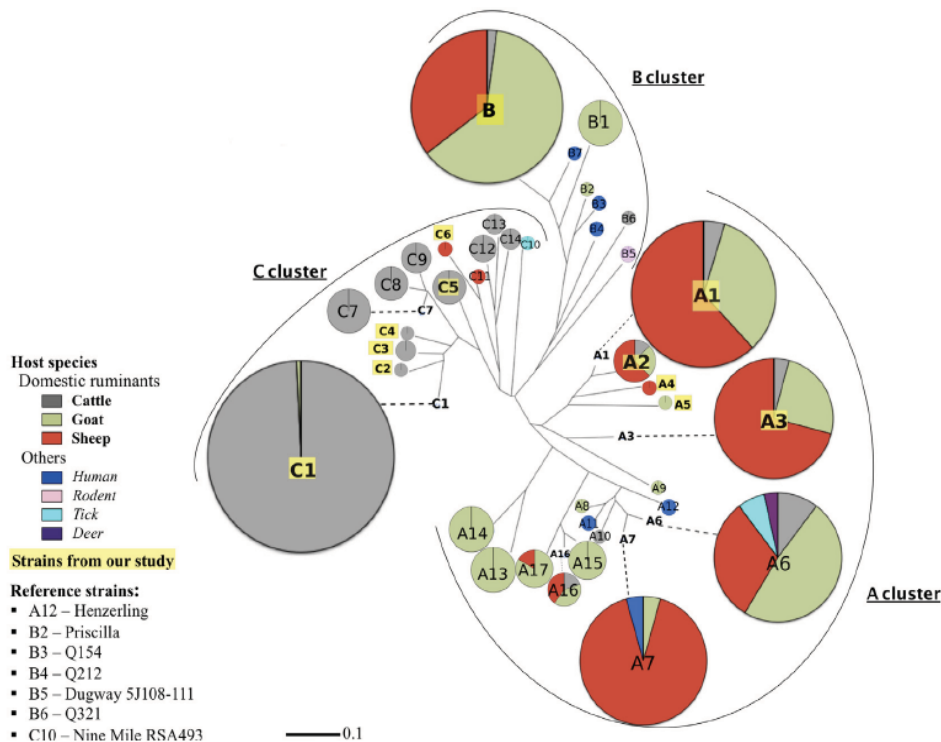


Fig. 2. Parsimony network showing the relative representativeness of host species as well as the genotypic relationships between *C. burnetii* genotypes from France, neighboring countries and reference strains. The size of each pie chart is correlated to the number of samples within the corresponding sub-cluster.

4. Discussion

4.1. Main findings

C. burnetii's genetic diversity is understudied. Here, we focused on France, where Q fever is enzootic in ruminant farms (ECDC, 2010), in order to characterize *C. burnetii* MLVA genotypes in clinical samples originating from seven major ruminant farming regions. We identified three main genotype clusters that were related to both the ruminant host species and the farming regions. We also observed some degree of genotypic diversity within individual farms, although all genotypes from a same farm always belonged to a same cluster. Lastly, we identified a subset of six MLVA-markers that may be used in the future to genetically characterize samples from French livestock farms at a lower cost.

4.2. Genotype clusters exist within ruminant species

Our findings support the existence of host specificity in *C. burnetii*, as previously reported in domestic ruminants (Pearson et al., 2014; Ruiz-Fons et al., 2008) as well as in wildlife (González-Barrio et al., 2016). Indeed, we observed genotype clustering by host species, with cattle genotypes forming one group (the C cluster) and small ruminant genotypes forming two others (the A and B clusters). Almost all the cattle genotypes were found in a "cattle-specific" cluster, which is consistent with the results of studies examining the MLVA profiles of cattle samples described elsewhere in France and Europe (Arricau-Bouvery et al., 2006; Frangoulidis et al., 2014; Prigent et al., 2015; Racic et al., 2014; Roest et al., 2011). Furthermore, certain cattle genotypes from Spain (Astobiza et al., 2012; Pinero et al., 2015), Portugal (Cumbassa et al., 2015; Santos et al., 2012), Italy (Ceglie et al., 2015), and Hungary (Sulyok et al., 2014) likely also belong to the C cluster; however, to date, they have been characterized using solely six MLVA markers.

Interestingly, the genotype of the Nine Mile RSA 493 reference strain, which was isolated from a *Dermacentor andersonii* tick in 1935 in the USA, was also found in the C cluster.

In contrast, a few of the cattle genotypes were found in the A and B clusters, which contained mostly sheep and goat genotypes, respectively. Interestingly, these samples were taken from aborting cows living in areas with high small ruminant densities. Similarly, the Q321 reference strain, which was isolated from cow milk in Russia, belonged to the B cluster. Overall, these results suggest that cattle may occasionally become infected with small ruminant strains.

In agreement with our results, most of the small ruminant genotypes previously reported in Germany, Belgium, Croatia, Italy, Spain and France belonged to the A (Boarbi et al., 2014; Frangoulidis et al., 2014; Prigent et al., 2015; Racic et al., 2014) or B cluster (Boarbi et al., 2014; Ceglie et al., 2015; González-Barrio et al., 2016; Prigent et al., 2015), suggesting that genotypes from both clusters circulate on small ruminant farms in Europe. Interestingly, we found genotypes from the B cluster in all the regions we sampled, except in northwestern France, where small ruminants are rare. Accordingly, most of the reference strains examined here, including the goat-isolated Priscilla Q177 and the human-isolated strains Q154 and Q212, grouped in the B cluster. Conversely, the goat genotype that was predominantly responsible for the recent Q fever outbreak in the Netherlands was found, based on an analysis of 14 markers, in the A cluster (Frangoulidis et al., 2014; Tilburg et al., 2012).

4.3. Genotype clusters are stable over space and time

In each of the three clusters, we observed that some MLVA genotypes remained spatially and temporally stable, a pattern that was previously suggested in other studies based on fewer MLVA markers (Astobiza et al., 2012; Cumbassa et al., 2015; Frangoulidis et al., 2014; Pinero et al., 2015). There are several potential explanations for

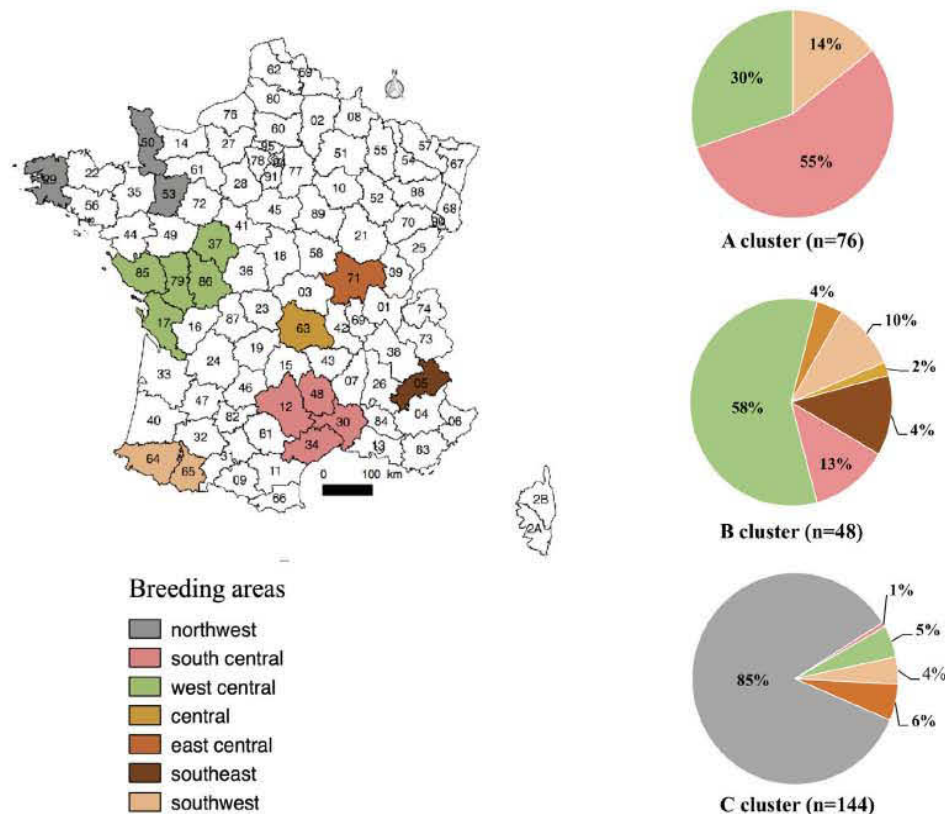


Fig. 3. Circular diagrams indicating for each cluster the relative number of genotypes by farming region represented on the map.

genotype stability. First, the spread of specific bacterial clones may be favored by the environmental resistance of *C. burnetii* in dusts and manure (EFSA, 2010). Second, because French livestock breeds tend to be region specific, animals do not move around much, except in montane areas where vertical transhumance is frequent. On occasion, the latter has been associated with human cases of Q fever (de Benoist et al., 2002). *C. burnetii* may also be spread through semen during artificial inseminations (Ruiz-Fons et al., 2014) or embryo transfers (Alsaleh et al., 2014; Alsaleh et al., 2013). Third, *C. burnetii*'s genome evolves relatively more slowly than those of other bacteria (Van Belkum et al., 2007).

4.4. *C. burnetii* genotyping approaches need to be standardized

Although they are less discriminating than MLVA (Sidi-Boumedine and Rousset, 2011), other genotyping methods, such as multispacer sequence typing (MST) and single nucleotide polymorphism (SNP) typing, may be used to describe genetic diversity in *C. burnetii*. Because MST targets other regions of the genome, analyzing our samples using this method could yield valuable data, allowing us to better describe genotypic diversity within and among farms. The SNP method presents the advantage to be usable with DNA-poor samples (Huijsmans et al., 2011) and to provide specific information about the evolutionary relationships between *C. burnetii* strains. However, SNP typing does not discriminate *C. burnetii* genotypes as well as MLVA and MST do (Sidi-Boumedine and Rousset, 2011). Overall, we still need a critical, comparative assessment of typing methods in which the same strains, including common reference strains, are analyzed.

Unfortunately, even in situations where the genotyping method used is MLVA, it is generally difficult to compare MLVA genotypes because the markers considered differ across studies. We suggest that

further studies should be implemented to identify a relevant subset of markers, potentially including markers from both panels 1 and 2 (Arricau-Bouvery et al., 2006), that would allow epidemiological comparisons between countries, at large geographical scales. The methodology might be the same as the one we used in this study to identify a subset of MLVA markers with which both the HGDI value and the percentage of interpretable genotypes are optimized. Depending on the geographical areas investigated, the subsets of markers may differ. For instance, only one marker was found in common with our subset in studies performed in Australia (Vincent et al., 2016) and in Germany (Frangoulidis et al., 2014).

In addition, because PCR amplification is not always successful for all markers, partial genotypes are frequently obtained, which leads to an underestimation of the genotypic diversity. Three markers (i.e., Ms23, Ms26, and Ms33) are of particular concern because the estimation of their number of tandem repeats is frequently impaired by the absence of amplification, which may be due to the occurrence of insertions or deletions (Sidi-Boumedine et al., 2015). Yet, despite the recent MLVA recommendations issued by Université Paris-Sud, no true consensus currently exists regarding how to estimate the number of tandem repeats.

In the future, high-throughput sequencing will likely be the ideal tool to explore the diversity of *C. burnetii* strains and investigate their spatiotemporal circulation. However, to date, full-genome sequencing is still costly and difficult to apply directly to field samples.

4.5. Perspectives

In Q fever epidemiology, it is important to be able to rapidly trace the origins of human outbreaks. Molecular epidemiology is a reliable tool with which to assess pathogen circulation, especially between animals

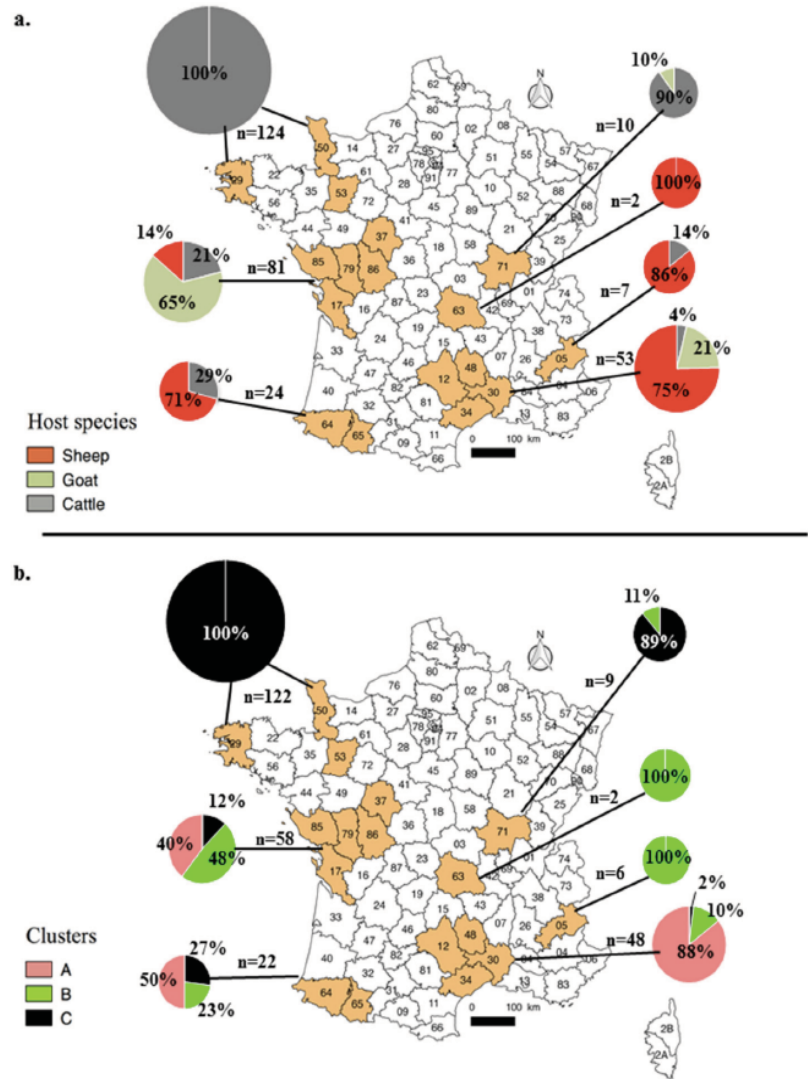


Fig. 4. Maps with circular diagrams indicating for each farming region the relative number of samples: a: tested in each host species and b: with interpretable genotypes belonging to the A, B or C cluster.

and humans. Here, we characterized the distribution of *C. burnetii* genotypes occurring in the main regions of ruminant livestock production in France between 2006 and 2015. Future research should attempt to identify a panel of markers that would allow human cases to be traced back to the farm from whence the pathogen came. Furthermore, the links between the genotypes described in this study and specific virulence profiles in domestic ruminants and humans should be examined. Ultimately, it would be extremely useful to combine genotypic and

phenotypic characterizations of *C. burnetii* strains with a view to optimizing the surveillance and management of human and animal Q fever outbreaks.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.015>.

Acknowledgments

The French Platform for animal health surveillance (ESA) supported the collection and supply of field samples. We thank Myriam Prigent for her involvement in the preparation of part of the samples; Maxime Souchal, as well as Amélie Bertin, Géraldine Philippe and the whole team of the Gentyane genotyping Platform for their help in the MLVA-genotyping analysis; veterinarians and farmers involved in field sampling, particularly Pauline Carrie; Scannelis laboratory for providing positive samples; and Céline Boby for her advice and for access to the INRA metabolism exploration platform. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Table 3
Number of farms sampled at the within-farm scale depending on the host species and the number of females sampled in each farms

Species	Sheep	Goat	Cattle
2 females	7	9	9
3 females	1	2	3
4 females	0	1	0
Number of farms sampled	8	12	12

References

- Agerholm, J.S., 2013. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals—a critical review. *Acta Vet. Scand.* 55, 13.
- Alsaleh, A., Fieni, F., Moreno, D., Rousset, E., Tainturier, D., Bruyas, J.F., Pellerin, J.L., 2014. Risk of *Coxiella burnetii* transmission via embryo transfer using in vitro early bovine embryos. *Theriogenology* 81, 849–853.
- Alsaleh, A., Fieni, F., Rodolakis, A., Bruyas, J.F., Roux, C., Larrat, M., Chatagnon, G., Pellerin, J.L., 2013. Can *Coxiella burnetii* be transmitted by embryo transfer in goats? *Theriogenology* 80, 571–575.
- Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, C.C., Souriau, A., Meyer, H., Neubauer, H., Rodolakis, A., Vergnaud, G., 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol.* 6, 38.
- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet. Res.* 36, 327–349.
- Astobiza, I., Tilburg, J., Piner, A., Hurtado, A., Garcia-Perez, A.L., Nabuurs-Franssen, M.H., Klaassen, C.H.W., 2012. Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants in northern Spain. *BMC Vet. Res.* 8.
- Beare, P.A., Samuel, J.E., Howe, D., Virtaneva, K., Porcella, S.F., Heinzen, R.A., 2006. Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *The J. Bacteriol.* 188, 2309–2324.
- Boarbi, S., Mori, M., Rousset, E., Sidi-Boumedine, K., Van Esbroeck, M., Fretin, D., 2014. Prevalence and molecular typing of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk in Belgian dairy goats, 2009–2013. *Vet. Microbiol.* 170, 117–124.
- Ceglie, L., Guerrini, E., Rampazzo, E., Barberio, A., Tilburg, J., Hagen, F., Lucchese, L., Zuliani, F., Marangon, S., Natale, A., 2015. Molecular characterization by MLVA of *Coxiella burnetii* strains infecting dairy cows and goats of north-eastern Italy. *Microbes Infect.* 17, 776–781.
- Chmielewski, T., Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Podsiadly, E., Thiery, R., Tylewska-Wierzbanska, S., 2009. Molecular epidemiology of Q fever in Poland. *Pol. J. Microbiol.* 58, 9–13.
- Cumbassa, A., Barahona, M.J., Cunha, M.V., Azorin, B., Fonseca, C., Rosalino, L.M., Tilburg, J., Hagen, F., Santos, A.S., Botelho, A., 2015. *Coxiella burnetii* DNA detected in domestic ruminants and wildlife from Portugal. *Vet. Microbiol.* 180, 136–141.
- Das, D.P., Malik, S.V.S., Rawool, D.B., Das, S., Shoukat, S., Gandham, R.K., Saxena, S., Singh, R., Doijad, S.P., Barbudde, S.B., 2012. Isolation of *Coxiella burnetii* from bovines with history of reproductive disorders in India and phylogenetic inference based on the partial sequencing of IS1111 element. *Infect. Genet. Evol.* 22, 67–71.
- Dasgupta, S., 2005. Pillai's Trace Test.
- de Benoist, A.C., Mailles, A., Rey, S., Dennetière, G., 2002. Q fever outbreak in the Chamonix Valley, France, summer 2002. *Eurosurveillance* 6.
- de Bruin, A., van Alphen, P.T.W., van der Plaats, R.Q.J., de Heer, L.N.D., Reusken, C., van Rotterdam, B.J., Janse, I., 2012. Molecular typing of *Coxiella burnetii* from animal and environmental matrices during Q fever epidemics in the Netherlands. *BMC Vet. Res.* 8.
- Dijkstra, F., van der Hoek, W., Wijers, N., Schimmer, B., Rietveld, A., Wijkman, C.J., Vellema, P., Schneeberger, P.M., 2012. The 2007–2010 Q fever epidemic in the Netherlands: characteristics of notified acute Q fever patients and the association with dairy goat farming. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 64, 3–12.
- Dimovski, K., Cao, H., Wijnburg, O.L., Strugnell, R.A., Mantena, R.K., Whipp, M., Hogg, G., Holt, K.E., 2014. Analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium variable-number tandem-repeat data for public health investigation based on measured mutation rates and whole-genome sequence comparisons. *J. Bacteriol.* 196, 3036–3044.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2010. Panel with representatives from the Netherlands, France, Germany, UK, United States. In: Asher, A., Bernard, H., Coutino, R., Durat, G., De Valk, H., Desendos, J.-C., Holmberg, J., Kirkbridge, H., More, S., Scheenberger, P., van der Hoek, W., van der Poel, C., van Steenberghe, J., Villanueva, S., Coulombier, D., Forland, F., Giesecke, J., Jansen, A., Nilsson, M., Guichard, C., Mailles, A., Pouchol, E., Rousset, E. (Eds.), Risk assessment on Q fever. ECDC Technical report <http://dx.doi.org/10.2900/28860> [40 pp.]. May. Available online: <http://www.ecdc.europa.eu>.
- EFSA, 2010. Scientific opinion on Q Fever. *EFSA J.* 8, 1593–1709.
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., Mege, J.L., Maurin, M., Raoult, D., 2017. From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 15–190.
- Frangoulidis, D., Walter, M.C., Antwerpen, M., Zimmermann, P., Janowitz, B., Alex, M., Bottcher, J., Henning, K., Hilbert, A., Ganter, M., Runge, M., Munsterkotter, M., Splettstoesser, W.D., Hanczaruk, M., 2014. Molecular analysis of *Coxiella burnetii* in Germany reveals evolution of unique clonal clusters. *International Journal of Medical Microbiology* 304, 868–876.
- Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fomous, G., Tyczka, J., Tokarevich, N., Kovacava, E., Marrie, T.J., Raoult, D., 2005. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1211–1217.
- González-Barrio, D., Hagen, F., Tilburg, J.J., Ruiz-Fons, F., 2016. *Coxiella burnetii* genotypes in Iberian wildlife. *Microb. Ecol.* 1–8.
- Hornstra, H.M., Priestley, R.A., Georgia, S.M., Kachur, S., Birdsell, D.N., Hilsabeck, R., Gates, L.T., Samuel, J.E., Heinzen, R.A., Kersh, G.J., Keim, P., Massung, R.F., Pearson, T., 2011. Rapid typing of *Coxiella burnetii*. *PLoS One* 6.
- Huijsmans, C.J.J., Schellekens, J.J.A., Wever, P.C., Toman, R., Savelkoul, P.H.M., Janse, I., Hermans, M.H.A., 2011. Single-nucleotide-polymorphism genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q fever outbreak in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2051–2057.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–2466.
- Joulie, A., Laroucau, K., Bailly, X., Prigent, M., Gasqui, P., Lepetitcolin, E., Blanchard, B., Rousset, E., Sidi-Boumedine, K., Jourdain, E., 2015. Circulation of *Coxiella burnetii* in a naturally infected flock of dairy sheep: shedding dynamics, environmental contamination, and genotype diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7253–7260.
- Karlsson, E., Macellaro, A., Byström, M., Forsman, M., Frangoulidis, D., Janse, I., Larsson, P., Lindgren, P., Ohrman, C., van Rotterdam, B., Sjödin, A., Myrtennas, K., 2014. Eight new genomes and synthetic controls increase the accessibility of rapid melt-MAMA SNP typing of *Coxiella burnetii*. *PLoS One* 9, e85417.
- Klaassen, C.H.W., Nabuurs-Franssen, M.H., Tilburg, J.J.H.C., Hamans, M.A.W.M., Horrevorts, A.M., 2009. Multigenotype Q fever outbreak, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 613–614.
- Pearson, T., Hornstra, H.M., Hilsabeck, R., Gates, L.T., Olivas, S.M., Birdsell, D.M., Hall, C.M., German, S., Cook, J.M., Seymour, M.L., Priestley, R.A., Kondas, A.V., Clark, C.L., Friedman, C.L.C., Price, E.P., Schupp, J.M., Liu, C.M., Price, L.B., Massung, R.F., Kersh, G.J., Keim, P., 2014. High prevalence and two dominant host-specific genotypes of *Coxiella burnetii* in US milk. *BMC Microbiol.* 14.
- Piner, A., Barandika, J.F., Garcia-Perez, A.L., Hurtado, A., 2015. Genetic diversity and variation over time of *Coxiella burnetii* genotypes in dairy cattle and the farm environment. *Infect. Genet. Evol.* 31, 231–235.
- Prigent, M., Rousset, E., Yang, E., Thiery, R., Sidi-Boumedine, K., 2015. Validation study for using lab-on-chip technology for *Coxiella burnetii* multi-locus-vnr-analysis MLVA typing. *Microbes Infect.*
- R Development Core Team, 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Reference Index Version 3.0.3. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Radic, I., Spicic, S., Galov, A., Duvnjak, S., Zdelar-Tuk, M., Vujnovic, A., Habrun, B., Cvetnic, Z., 2014. Identification of *Coxiella burnetii* genotypes in Croatia using multi-locus VNTR analysis. *Vet. Microbiol.* 173, 340–347.
- Roest, H.I., Bossers, A., van Zijderdeld, F.G., Rebel, J.M., 2013. Clinical microbiology of *Coxiella burnetii* and relevant aspects for the diagnosis and control of the zoonotic disease Q fever. *Vet. Q.* 33, 148–160.
- Roest, H.I., Ruuls, R.C., Tilburg, J., Nabuurs-Franssen, M.H., Klaassen, C.H.W., Vellema, P., van den Brom, R., Dercksen, D., Wouda, W., Spienburg, M.A.H., van der Spek, A.N., Buijs, R., de Boer, A.G., Willemsen, P.T.J., van Zijderdeld, F.G., 2011. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 668–675.
- Rousset, E., Prigent, M., Ameziane, G., Brugidou, R., Martel, I., Grob, A., Gall, G.L., Kerninon, S., Delaval, J., Chassin, A., Vassiloglou, B., S. A., Valogne, A., Ogier, M., Audeval, C., Colocci, F., Perennes, S., Cazalis, L., Nicollet, P., C. C.M., Sidi-Boumedine, K., 2012. Adoption by a network's laboratories of a validated quantitative real-time PCR method for monitoring Q fever abortions in ruminant livestock. *Euroreference* 8, 21–28.
- Ruiz-Fons, F., Gonzalez-Barrio, D., Aguilar-Rios, F., Soler, A.J., Gardy, J.J., Gortazar, C., Fernandez-Santos, M.D., 2014. Infectious pathogens potentially transmitted by semen of the black variety of the Manchega sheep breed: health constraints for conservation purposes. *Anim. Reprod. Sci.* 149, 152–157.
- Ruiz-Fons, F., Rodriguez, O., Torina, A., Naranjo, V., Gortazar, C., de la Fuente, J., 2008. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. *Vet. Microbiol.* 126, 282–286.
- Santos, A.S., Tilburg, J., Botelho, A., Barahona, M.J., Nuncio, M.S., Nabuurs-Franssen, M.H., Klaassen, C.H.W., 2012. Genotypic diversity of clinical *Coxiella burnetii* isolates from Portugal based on MST and MLVA typing. *Int. J. Med. Microbiol.* 302, 253–256.
- Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Prigent, M., Yang, E., Joulie, A., Thiery, R., Rousset, E., 2015. Impact of IS1111 insertion on the MLVA genotyping of *Coxiella burnetii*. *Microbes Infect.*
- Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., 2011. Molecular epidemiology of Q fever: a review of *Coxiella burnetii* genotyping methods and main achievements. *Euroreference* 30–38.
- Sulyok, K.M., Kreizinger, Z., Hornstra, H., Pearson, T., Sziget, A., Dan, A., Balla, E., Keim, P.S., Gyuranecz, M., 2014. Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants and human in Hungary: indication of various genotypes. *BMC Vet. Res.* 10.
- Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K., Homan, W.L., 2006. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 254, 268–274.
- Tilburg, J., Roest, H., Nabuurs-Franssen, M.H., Horrevorts, A.M., Klaassen, C.H.W., 2012. Genotyping reveals the presence of a predominant genotype of *Coxiella burnetii* in consumer milk products. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2156–2158.
- Tissot-Dupont, H., Amadei, M.A., Nezi, M., Raoult, D., 2004. Wind in November, Q fever in December. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1264–1269.
- Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M., 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 1–46.
- van Leuken, J.P.G., van de Kasstele, J., Sauter, F.J., van der Hoek, W., Heederik, D., Havelaar, A.H., Swart, A.N., 2015. Improved correlation of human Q fever incidence to modelled *Coxiella burnetii* concentrations by means of an atmospheric dispersion model. *Int. J. Health Geogr.* 14.
- Vincent, G., Stenos, J., Latham, J., Fenwick, S., Graves, S., 2016. Novel genotypes of *Coxiella burnetii* identified in isolates from Australian Q fever patients. *Int. J. Med. Microbiol.* 306, 463–470.
- Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Béguec, C., Wölbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., Supply, P., Meyer, A., 2008. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog.* 4, s.

Principaux résultats

- ✚ **Trois grands groupes génotypiques** distincts ont été identifiés : **deux** groupes constitués majoritairement de **petits ruminants** et **un** groupe de **bovins**.
- ✚ Les **génotypes MLVA** de *C. burnetii* identifiés chez les ruminants domestiques en France sont relativement **stables dans le temps et dans l'espace**.
- ✚ Un **panel de 6 marqueurs MLVA** a été identifié afin de **faciliter les analyses génotypiques** en France en contexte d'avortement de fièvre Q chez les ruminants domestiques.
- ✚ La **diversité génotypique MLVA** observée en **intra-élevage** est **limitée**. Les génotypes sont regroupés dans un même cluster génotypique.

III.2.3 Article 4: Copy number of the IS 1111 gene: links with host species, regions and MLVA genotypic diversity

III.2.3.1 Résumé

Contexte. En France, le diagnostic de routine de la fièvre Q est actuellement basé sur l'amplification par PCR du gène *IS1111* de *C. burnetii* pour une plus grande sensibilité de détection (EFSA, 2010). Toutefois, le gène *IS1111* est présent en nombre variable sur le génome bactérien suivant les souches, entre 7 et 110 copies (Klee et al., 2006; Sidi-Boumedine et al., 2015). Cette technique ne permet donc pas d'estimer précisément la charge bactérienne excrétée par les femelles infectées. En effet, l'estimation des charges bactériennes est basée sur un nombre de copies moyen (20 copies) calculé par rapport au nombre de copie de la souche de référence Nine Mile RSA 493. Il est donc nécessaire d'estimer précisément le nombre de copies du gène *IS1111* dans les échantillons afin de mieux quantifier les charges bactériennes excrétées dans l'environnement par les femelles de ruminants domestiques. En outre, les observations de terrain semblent suggérer que les caprins excrètent à des niveaux de charges plus élevés que les ovins, et les ovins à des niveaux plus élevés que les bovins (EFSA, 2010).

De plus, l'étude publiée récemment (Sidi-Boumedine et al., 2015), présentée en *annexe IV* suggère que le gène *IS1111* aurait un impact sur la variabilité génotypique MLVA. Ainsi, nous avons souhaité vérifier si les problèmes d'amplification rencontrés sur certains échantillons génotypés en MLVA (article 3) étaient liés à des séquences d'insertion sur 3 des 17 marqueurs utilisés (ms 23, ms 26 et ms33).

Objectifs. Les objectifs de ce travail étaient de : (i) quantifier plus précisément les charges bactériennes dans les échantillons collectés selon les espèces de ruminants domestiques et (ii) évaluer la distribution du nombre de copies en fonction du groupe génotypique précédemment obtenu (article 3). Pour cela, nous avons utilisé 314 échantillons provenant de l'étude de génotypage MLVA collectés en contexte infectieux dans les troupeaux de ruminants domestiques en France.

Résultats. L'analyse a révélé des différences significatives en termes de nombre d'insertions du gène *IS1111* entre les trois espèces de ruminants domestiques. En effet, les génotypes collectés sur les brebis ayant avorté de fièvre Q (majoritaire dans le groupe génotypique A) présentaient un nombre de copies du gène *IS1111* significativement plus élevé que ceux provenant des chèvres (principalement rassemblés dans le groupe génotypique B) ou des vaches (quasi-exclusivement regroupés dans le groupe génotypique C). Nous avons également observé des

différences entre les trois groupes génotypiques MLVA identifiés dans l'étude précédente. En effet, dans le cluster génotypique A (comprenant majoritairement des ovins) le nombre de copies d'*IS1111* était significativement plus élevé que dans le B (génotypes provenant de caprins principalement) et que dans le C (composés de génotypes prélevés sur bovins).

Conclusions. Bien que les charges bactériennes soient légèrement surestimées, en particulier chez les petits ruminants, l'excellente sensibilité de la méthode qPCR ciblant le gène *IS1111* permet d'obtenir des résultats fiables et discriminants pour le diagnostic d'avortement de la fièvre Q. Ainsi, l'utilisation suggérée par le laboratoire national de fièvre Q animal (ANSES Sophia Antipolis, France) d'un nombre moyen de 20 copies pour le diagnostic d'avortement de la fièvre Q en France permet d'atténuer les différences de charge bactérienne entre les échantillons. Enfin, il est essentiel pour chaque laboratoire d'estimer le plus précisément possible les charges bactériennes excrétées par les femelles afin d'évaluer le potentiel infectieux d'un troupeau.

III.2.3.2 Article

qPCR-based determination of the number of IS1111 elements on the *C. burnetii* genome from strains circulating in France
(version non-definitive, en cours de rédaction)

Joulié A.^{a,b,c}, Fourcot A.^a, Barry S.^a, Maseglier S.^a, Rousset E.^c, Leblond A.^{a,b}, Jourdain E.^a, Sidi Boumedine K.^{c*}

EPIA, INRA, 63122 Saint-Genès Champanelle^a, France; Université de Lyon, VetAgro Sup, 69280 Marcy l'Etoile, France^b; Anses (French Agency for Food, Environmental, and Occupational Health and Safety), Laboratory of Sophia Antipolis, Animal Q Fever Unit, Sophia Antipolis, France^c.

*Corresponding author. Mailing address: Anses (French Agency for Food, Environmental, and Occupational Health and Safety), Laboratory of Sophia Antipolis, Animal Q Fever Unit, Sophia Antipolis, France. Phone: 0033 (0)4 98 94 87 62. E-mail: Karim.SIDI-BOUMEDINE@anses.fr

Abstract

We estimated the number of IS1111 genes and its role on the MLVA genotypic diversity from 314 abortion product samples of females having aborted of Q fever. Analysis revealed significant differences in the number of IS1111 insertions between ruminant species and in MLVA genotypic clusters: strains from sheep displayed higher copy numbers than strains from goat or from cattle.

Keywords: *Q fever, IS1111 gene, sheep, goat, cattle, MLVA genotyping*

Introduction

Q fever infection in livestock often goes unnoticed due to the lack of overt clinical signs exhibited by infected animals, as it is the case in humans, and its diagnosis is laboratory based. Theoretically, the direct identification, in samples from aborted animals, by isolation of the organism, is the only mean to affirm the presence of the disease. However, isolation and

cultivation of *C. burnetii* requires BSL-3 level containment and experienced personnel (EFSA, 2010). Moreover, it is a lengthy procedure and the recovery success rate is variable.

The detection of bacteria in smears of placentas using conventional stains, in combination or not with serological analysis of sera samples, to support the unequivocal identification of *C. burnetii* as the infectious agents was also used for veterinary investigations (Rousset et al., 2012). However, the major disadvantage of the serological methods is that they do not give information about the infectious status of animals, as they do not discriminate between a recent infection or a past exposition. More importantly, they do not allow the identification of *C. burnetii* shedding animals (OIE, 2015).

To date, the polymerase chain reaction (PCR) is one of the most sensitive and rapid means for the direct detection of *C. burnetii* and the identification of shedders, which is of great concern and could have an important impact for both animal and public health points of view. Moreover, qPCR (quantitative PCR) allows the estimation of the bacterial burden in samples, which fundamentally changed the diagnosis of Q fever in human and veterinary medicine (Rousset et al., 2012).

According to the French association for farm animals' health certification (ACERSA) experts working group: the abortion is linked to Q fever when qPCR on a single sample is above or equal to the threshold of 10^4 *C. burnetii* per gram of placenta or per vaginal swab.

In France, the most common target used in qPCR available for veterinary purposes (5 kits are becoming available) is the IS1111 insertion sequence. Because this target is present in multiple copies on the genome of *C. burnetii*, it provides a sensitive detection of *C. burnetii* in various clinical samples. However, a large variability in the number of copies of IS1111 genes depending on the field strains of *Coxiella* (between 5 and 110 copies) has been described in the literature (Klee et al., 2006; Sting et al., 2015). This uncertainty may impede the determination of the number of *Coxiella* present in the sample.

On the other hand, difficulties to obtain complete MLVA patterns for some samples were observed and little information is available with regards to PCR amplification failures in *C. burnetii* MLVA typing (Arricau-Bouvery et al., 2006; Sidi-Boumedine and Rousset, 2011; Svraka et al., 2006). A previous study suggested the role of the IS1111 element in the *C. burnetii* genome plasticity and especially on three MLVA markers (Sidi-Boumedine et al., 2015). However, investigations on a larger collection of clinical samples are needed to accurately assess the role of the IS1111 gene on *C. burnetii* genetic diversity.

The aim of this study was, therefore, to determine the number of IS elements present in the prevailing animal strains and given areas in France, and its impacts on the MLVA diversity of *C. burnetii*.

The study

We used DNA samples collected between 2006 and 2015 from 314 females (149 cows, 72 ewes, 93 goats) aborted of Q fever within 7 different farming regions (*Table 1*). First, two plasmids were designed from a pGem-T commercial vector (Promega, Charbonnières, France). Indeed, we used a monocopy *icd* gene inserted on one plasmid as well as a second plasmid with a multicopy *IS1111* gene inserted. A range of calibration was set up from each plasmid to estimate the copy number of the *IS1111* gene on the *C. burnetii* genome, from the above-mentioned clinical samples, in reference to the copy number of the *icd* gene. TaqMan-based real-time PCR assay was developed (adapted from Klee et al., 2006) and allowed quantifying both genes in each sample.

Table 1 *art. 4* : Number of analyzed samples in each species and cluster

	Number of analyzed samples	
Species	Sheep	72
	Goat	93
	Cattle	149
Clusters	A	86
	B	84
	C	144

ANOVA linear regression was performed on R (version 3.0.3) to determine whether the copy number of the *IS1111* gene had an effect on the genotypic clustering obtained. We performed a Wilcoxon non-parametric test to investigate in which genotypic cluster the copy number of the *IS1111* gene was the most variable. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Among all the samples analyzed, we found significant differences ($p < 0.05$) of the copy number of the *IS1111* genes between sheep (average of 81.4), goats (average of 66.4) and cattle (average of 31.8 - *Figure 1*). For all three species of ruminants, the use of an average number of 20 copies induces an underestimation of bacterial burdens compared to if the exact copy number of *IS1111* gene was considered.

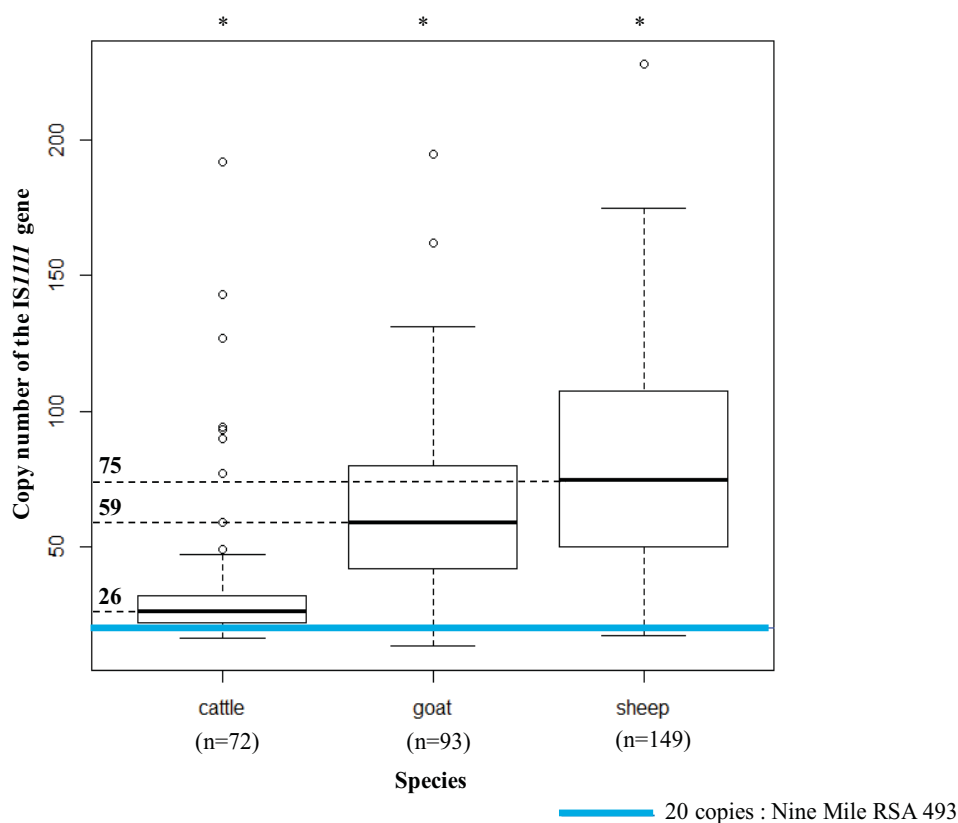


Figure 1 art. 4 : Copy number of the IS1111 gene per genome depending on the host species

Besides, *C. burnetii* diversity was previously determined on these samples using a multiple-locus variable-number of tandem repeat analysis (MLVA) considering 17 markers (Joulié et al., 2017). Using a phylogenetic approach, 3 main genotypic clusters were identified (Table 1). These clusters were significantly associated with ruminant species and also proved stable over space and time (Joulié et al., 2017). We found that the copy number of the IS1111 gene impacts the MLVA genotypic diversity obtained (Figure 2). Indeed, we observed a mean of 91 IS1111 genes in the A cluster (mainly composed of genotypes from sheep), whereas we found 56 and 29 copies in the B (included mostly genotypes from goats) and C (comprised almost exclusively of genotypes from cattle cluster), respectively.

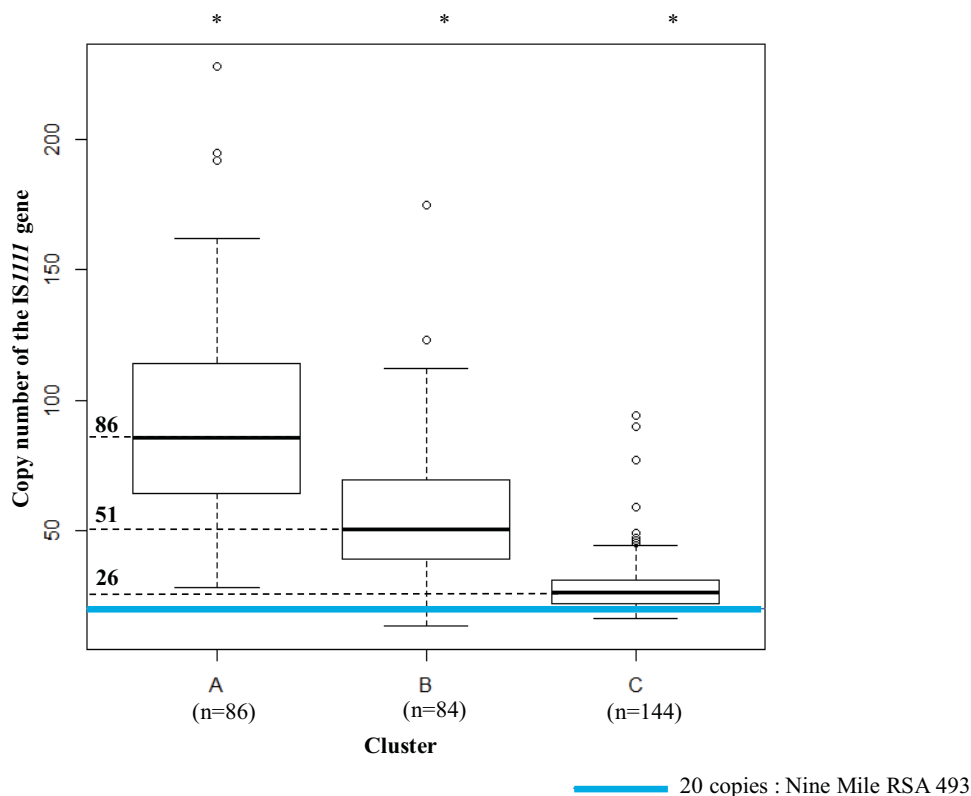


Figure 2 *art. 4* : Distribution of the copy number of the IS1111 gene per genome depending on the MLVA genotypic cluster

From the genotypic study above-mentioned, we estimated a diversity index per cluster that corresponds to the ratio between the number of diverse genotypes and the number of samples. We considered that genotypes were distinct from each other when the number of repeats of at least one of the 17 markers differed, as previously described by Svraka and colleagues (2006). We obtained the highest diversity index in the A cluster (*i.e.*, 0.58) in which were found both the most genotypes from sheep and the highest copy number of IS1111 genes (*Table 2*). Likewise, we observed a lower diversity index in the B and C clusters than in the A cluster (*i.e.*, 0.22 and 0.43 respectively), which corresponds to clusters comprising mainly goat and cattle strains, respectively.

Table 2 *art. 4* : Diversity index depending on MLVA genotypic clusters

MLVA genotypic cluster	Mean of copy number of IS1111	Range of copy number of IS1111	Number of samples	Number of genotypes patterns	Diversity index (genotypes pattern / number of samples)
A	86	35-228	86	50	0.58
B	51	13-175	84	19	0.22
C	26	16-94	144	62	0.43

Conclusions

This study showed that the *IS1111* gene's number has a direct impact on the estimation of bacterial burdens in context of abortions and on *C. burnetii*'s genome plasticity. Therefore, these findings provide a better characterization of *C. burnetii* strain diversity, especially in the surveillance of *C. burnetii* genotype circulation.

Indeed, in routine laboratory analysis, the differences in the copy number of the *IS1111* gene between the three-ruminant species highlight the need to use a standard range based on a DNA reference material to precisely avoid quantification biases. Although bacterial loads are slightly overestimated, especially in small ruminants, the excellent sensitivity of the qPCR method allows providing extremely reliable results. Thus, we confirmed here that the use of the average number of 20 copies attenuate bacterial load differences between strains, which is relevant to diagnose Q fever abortions on the field (Rousset et al., 2012).

In addition, the A cluster was mainly composed of genotypes from aborted sheep, whereas both B and C clusters mainly included genotypes from goat and cattle, respectively. Consistently, the MLVA A cluster contained much more *IS1111* copies than strains from the MLVA B cluster and even more than the C cluster. In practice, these results fit with field observations, namely higher abortion rate in small ruminant than in cattle infected herds (EFSA, 2010). These differences are likely due to either a host species specificity, a bacterial strain specificity or both as suggested by our findings. Differences in terms of clinical signs are more generally noticed between small ruminants and cattle; including more abortions rates, still births or delivery of weak offspring in sheep and goat flocks, while mastitis or fertility disorders are most often suggested in cattle (Barlow et al., 2008). All our observations are therefore consistent with a higher *C. burnetii* infection and transmission dynamics in sheep and goat than in cattle farms.

A previous study revealed that *IS1111* insertions have been observed on MLVA markers ms23 and ms33 and deletions on ms26 marker (Sidi-Boumedine et al., 2015). In our study, we observed more PCR amplification failures on ms23, ms26 and ms33 markers on samples included in both MLVA A and B clusters than in the C cluster, which supports also that *IS1111* gene insertions or deletions mostly occurred on strains from small ruminants. However, our observations need to be confirmed by sequencing the three markers above-mentioned from the field samples used in this study and afterwards isolated on mouse spleen.

Finally, regarding the differences found in the number of the *IS1111* between the three-ruminant species, it is particularly important to properly define the level of the qPCR diagnostic threshold in each species. It is also essential for each laboratory to use standard curves for the

PCR analysis of samples collected in abortion context, especially by using an average copy number from a reference strain.

Acknowledgments

The French Platform for animal health surveillance (ESA) supported the collection and supply of field samples. We thank Myriam Prigent for her involvement in the preparation of part of the samples; the whole team of the Gentyane genotyping Platform for their help in the MLVA-genotyping analysis; veterinarians and farmers involved in field sampling, particularly Pauline Carrie; Scannelis laboratory for providing positive samples; and Céline Boby for her advice and for access to the INRA metabolism exploration platform. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, C.C., Souriau, A., Meyer, H., Neubauer, H., Rodolakis, A., Vergnaud, G., 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiology* 6, 38
- Barlow, J., Rauch, B., Welcome, F., Kim, S.G., Dubovi, E., Schukken, Y., 2008. Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. *Veterinary Research* 39, 9.
- EFSA, 2010. Contributors: More, S., Stegeman, J. A., Rodolakis, A., Roest, H-J., Vellema, P., Thiéry, R., Neubauer, H., van der Hoek, W., Staerk, K., Needham, H., Afonso, A., Georgiev, M., Richardson, J. Scientific opinion on Q Fever. *EFSA* 1723, 28
- Klee, S.R., Tyczka, J., Ellerbrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G., Appel, B., 2006. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiology* 6.
- Joulie, A., Sidi-Boumedine, K., Bailly, X., Gasqui, P., Barry, S., Jaffrelo, L., Poncet, C., Abrial, D., Yang, E., Leblond, A., Anim Diagnost Lab Consort, Rousset, E., Jourdain, E., 2017. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* in French livestock reveals the existence of three main genotype clusters and suggests species-specific associations as well as regional stability. *Infection Genetics and Evolution* 48, 142-149.
- OIE, 2015. Contributors: Rousset, E., Sidi-Boumedine, K. Q fever. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)* OIE.

- Rousset, E., Prigent, M., Ameziane, G., Brugidou, R., Martel, I., Grob, A., Gall, G.L., Kerninon, S., Delaval, J., Chassin, A., Vassiloglou, B., S, A., Valogne, A., Ogier, M., Audeval, C., Colocci, F., Perennes, S., Cazalis, L., Nicollet, P., C, C.M., Sidi-Boumedine, K., 2012. Adoption by a network's laboratories of a validated quantitative real-time PCR method for monitoring Q fever abortions in ruminant livestock. Euroreference 8, 21-28
- Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., 2011. Molecular epidemiology of Q fever: a review of *Coxiella burnetii* genotyping methods and main achievements. Euroreference, 30-38.
- Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Prigent, M., Yang, E., Joulié, A., Thiery, R., Rousset, E., 2015. Impact of IS1111 insertion on the MLVA genotyping of *Coxiella burnetii*. Microbes and Infection 17, 11, 789-794.
- Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K., Homan, W.L., 2006. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. FEMS Microbiology Letters 254, 268-274.
- Sting, R., Molz, K., Hoferer, M., 2015. Creating standards for absolute quantification of *Coxiella burnetii* in real-time PCR - A comparative study based on transmission electron microscopy. Biologicals 43, 18-22

Principaux résultats

- ✚ Le **nombre de copies** du gène d'insertion **IS1111** est **significativement plus élevé** dans les échantillons d'origine **ovine**, que ceux d'origines **caprine** et **bovine**.
- ✚ La **charge bactérienne** estimée à partir du nombre exact de copie du gène **IS1111** est **significativement plus élevée chez les petits ruminants** que chez les **bovins**.
- ✚ La distribution du **nombre de copies du gène IS1111** **diffère significativement entre les trois groupes génotypiques** (A, B et C) identifiés précédemment par MLVA.

III.3 Caractérisation de la diversité phénotypique des souches de *Coxiella burnetii* circulantes en élevages de ruminants domestiques en France

Après avoir décrit la diversité génotypique des souches circulantes dans les principales zones d'élevage de ruminants domestiques en France, nous avons sélectionné dans chacun des groupes génotypiques (paragraphe III.2.2.2) un panel d'échantillons les plus représentatifs de cette diversité en termes d'espèce et de zone géographique. L'objectif est de caractériser d'un point de vue phénotypique chacun de ces isolats en évaluant leur pathogénicité *in vivo* et *in vitro* afin de pouvoir adapter les mesures de contrôle de la fièvre Q dans les troupeaux en cas d'épizootie ou d'apparition de cas humains groupés.

III.3.1 Méthodologie générale

La virulence des souches de *C. burnetii* a été étudiée sur deux modèles d'infection distincts au cours de ma thèse : un modèle *in vivo* et un modèle *in vitro*. Ces deux modèles sont décrits comme étant les plus discriminants pour l'étude de la virulence des souches de *C. burnetii* (Mori et al., 2013; Scott et al., 1987).

Pour ce travail, nous avons sélectionné parmi les échantillons géotypés en MLVA, les plus représentatifs pour chacune des trois espèces de ruminants domestiques et des sept zones géographiques investiguées (*Figure 5*). En effet, dans chacun des sous-groupes génotypiques MLVA obtenus (article 3), nous avons choisi un échantillon par espèce et par zone géographique. Si plusieurs échantillons répondaient à ces deux critères d'inclusion dans un même sous-groupe génotypique, seul l'échantillon le plus fortement chargé en *C. burnetii* a été retenu pour l'étape d'isolement sur rate de souris. Au total, 38 échantillons ont été sélectionnés pour isolement. Seuls les isolats pour lesquels la charge de bactéries vivantes, détectée dans les rates des souris, était supérieure à 10^5 GE/ml ont ensuite été sélectionnés pour les tests de virulence (*in vivo* et *in vitro*).

III.3.1.1 Sélection des souches pour le modèle d'infection in vivo

Le volume de rate de souris broyée dans du milieu *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM) a également été déterminant dans la sélection des isolats. Seuls les échantillons pour lesquels nous avons obtenu un volume supérieur à 500 μ L ont été sélectionnés pour les analyses *in vivo*. En effet, pour chaque souche nous injectons 50 μ L d'inoculum à un lot de 5 souris.

Au total, 15 échantillons représentatifs de la diversité génotypique MLVA sur les 38 isolés répondaient à l'ensemble des critères de sélection pour l'étude de la virulence *in vivo*.

III.3.1.2 Sélection des souches pour le modèle d'infection *in vitro*

Comme pour le modèle *in vivo*, le volume a été déterminant pour la sélection des échantillons. Le modèle utilisé est adapté de celui précédemment décrit (Mori et al., 2013). Seuls les échantillons avec un volume minimum de 7,5 ml de rate de souris broyée ont été sélectionnés pour les analyses *in vitro*. En effet, pour chaque souche nous injectons 200µL d'inoculum à deux lignées macrophagiques distinctes (une lignée MoCl4 ovine et une lignée SV40 bovine). Quatre temps de prélèvements étaient prévus en triplicats (jours 1, 2, 3 et 6 post-inoculation). Au total, 5 échantillons sur les 38 isolées répondaient à l'ensemble des critères de sélection pour l'étude de la virulence *in vitro*. Ces 5 souches ont également été testées *in vivo*.

III.3.2 Article 5: *In vitro and in vivo infectivity of Coxiella burnetii strains from French livestock*

III.3.2.1 Résumé

Contexte. Nous avons caractérisé la virulence de ces isolats *via* un modèle d'infection *in vivo* sur souris et un modèle d'infection *in vitro* sur lignées cellulaires macrophagiques (Mori et al., 2013).

Objectifs. L'objectif de cette étude était de : (i) comparer le potentiel infectieux *in vivo* et *in vitro* d'isolats de *C. burnetii*, provenant d'élevages de ruminants domestiques en France, avec la souche de référence Nine Mile RSA 493 (NM), et (ii) comparer si possible les données de virulence *in vivo* et *in vitro*.

Résultats. *In vivo*, le potentiel infectieux de quinze isolats a pu être testé sur souris après inoculation dans le coussinet plantaire. Quatre groupes phénotypiques distincts ont pu être identifiés sur la base de la charge bactérienne de *C. burnetii* obtenue dans la rate des souris. La comparaison avec la souche de référence NM révèle que lorsque le LPS bactérien est en phase II, les bactéries atteignent difficilement la rate des souris pour s'y multiplier alors qu'à l'inverse en phase I les charges bactériennes spléniques sont élevées.

Cinq isolats parmi les 15 testés *in vivo* ont également pu être testés *in vitro* sur deux lignées macrophagiques bovine (SV40) et ovine (MoCl4). Nos résultats suggèrent que la souche de référence NM s'est adaptée rapidement aux conditions de multiplication *in vitro* comparativement aux isolats de terrain. Certains isolats pénètrent facilement dans le tapis cellulaire à J0 mais se multiplient faiblement les jours suivants, et inversement.

Conclusions. Dans cette étude, nous avons développé un modèle de virulence sur souris utile pour comparer le potentiel infectieux d'isolats ou de souches collectées dans des élevages de ruminants domestiques. Nos résultats suggèrent que les modèles *in vitro* et *in vivo* permettent de différencier certains profils de virulence entre isolats. Toutefois, ces deux modèles sont complémentaires mais non substitutifs.

Une des perspectives à ce travail est de mieux caractériser les liens entre génotype et phénotype de ces isolats afin d'évaluer le risque infectieux en cas d'épizootie ou d'apparition de cas humains groupés de fièvre Q sur le territoire.

Une autre perspective serait de tester la pathogénicité des isolats provenant de l'environnement des élevages infectés (poussières, air, tiques entre autres). L'objectif étant à terme de mieux surveiller les souches animales et environnementales circulantes dans les troupeaux afin d'adapter les mesures prophylactiques dans les élevages.

III.3.2.2 Article

In vitro and in vivo infectivity of Coxiella burnetii strains from French livestock

(version non-definitive, en cours de rédaction)

Aurélien Joulie^{1,2,3}, Elise Yang³, Myriam Prigent³, Patrick Gasqui¹, Xavier Bailly¹, Agnès Leblond², Elsa Jourdain¹, Elodie Rousset³, Richard Thiéry³, Karim Sidi-Boumedine^{3*}

¹ EPIA, INRA, 63122 Saint-Genès Champanelle, France.

² Université de Lyon, VetAgro Sup, 69280 Marcy l'Etoile, France.

³ Anses (French Agency for Food, Environmental, and Occupational Health and Safety), Laboratory of Sophia Antipolis, Animal Q Fever Unit, Sophia Antipolis, France.

*Corresponding author. Mailing address: ANSES de Sophia Antipolis, Les Templiers, 105 route des Chappes, 06902 Sophia Antipolis. Phone: 0033 (0)4 92 94 87 62. E-mail: Karim.SIDI-BOUMEDINE@anses.fr

Abstract

Q fever is a worldwide zoonosis caused by the gram-negative obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. Following the recent outbreaks in the Netherlands, a hyper virulent clone was found to be the cause of severe human cases of Q fever. In livestock, Q fever clinical manifestations are mainly abortions. Although various factors may explain the bacterial dissemination or the abortion rates, *C. burnetii*'s virulence remains understudied. Thus, *C. burnetii*'s strain characterization is of high importance to evaluate the level of infectious risk, especially in endemic areas.

In this study, the infectious potential of 15 *C. burnetii* isolates collected from French livestock farms were compared to the reference strain Nine Mile (in phase II and in an intermediate phase) using an *in vivo* (CD1 mice) model. All 15 strains displayed distant MLVA (multiple-locus variable-number of tandem repeat analysis) genotypic profiles. Mice were challenged with 10^5 live bacteria (categorized by propidium monoazide-qPCR targeting the *icd*-gene). After footpad inoculation, spleen was harvested at 10 days post-inoculation (*p.i.*). The strain invasiveness in spleen was assessed by qPCR assays targeting the *icd*-gene.

The avirulent strain (in phase 2) failed to pass the popliteal barrier and then to colonize the spleen. This model allowed to discriminate 4 phenotypic groups based on spleen invasiveness by using a multiple comparison of averages.

Additionally, five of the fifteen isolates were also tested *in vitro* on ovine and bovine macrophage cell-lines and were compared to the same reference strain as the one used *in vivo*. Cells and supernatants were harvested at day1, day2, day3 and day6 *p.i.* to assess *in vitro* multiplication kinetics, by using qPCR assays targeting the *icd*-gene. Preliminary results suggest differences of kinetics between isolates.

In conclusion, we describe here the implementation of a mouse model useful to compare strain pathogenicity, and now we need to go further to acquire knowledge on genomic plasticity and virulence factors. Furthermore, the *in vitro* model was shown to be complementary to the *in vivo* model and allowed distinction between the examined strains. Overall, our findings might help the implementation of surveillance of virulent strains and ultimately allow adapting prophylaxis measures in livestock farms.

Keywords: *Q fever, mouse, macrophage cell-lines, ruminant, virulence*

Introduction

Q fever, a worldwide zoonotic disease, is caused by the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. Domestic ruminants are considered the main reservoir of Q fever infections in humans, with small ruminants being the most frequently involved (OIE, 2015). Both animals and humans become infected mainly through the inhalation of airborne particles contaminated with *C. burnetii* (EFSA, 2010; Tissot-Dupont et al., 2004; van Leuken et al., 2015). Inhalation of such contaminated particles can lead to acute or chronic Q fever in humans. Acute infections vary from asymptomatic to abrupt flu-like symptoms or pneumonia; chronic infection typically manifest as endocarditis (EFSA, 2010).

In ruminants, the main clinical manifestations are abortions, stillbirths and delivery of weak offspring, leading to significant economic losses (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; EFSA, 2010; OIE, 2015).

The infectious potential of *C. burnetii* is associated with the structure of its lipopolysaccharide (LPS), which consists of either the virulent phase I (LPS I) or the avirulent phase II (LPS II - (Narasaki and Toman, 2012)). Bacteria in phase I are characterized by a full-length LPS that may induce clinical signs in domestic ruminants, in humans or in experimental animal models. Upon serial passages in cell cultures, the *C. burnetii* phase I shift to the phase II form characterized by a non-reversible shortening of the LPS molecule (Eldin et al., 2017). This transition is due to a gradual reduction of the polysaccharidic part of the LPS, concomitantly accompanied by a large genomic deletion (Narasaki and Toman, 2012). The avirulent phase II bacteria supposedly do not replicate in immune-competent hosts (van Schaik et al., 2013), but further investigations are still needed, especially following intra-peritoneal infection.

Attempts to understand the pathogenesis of this bacterium through molecular techniques have been hampered by its intracellular life style. Nevertheless, a better understanding of the bacterium's interactions with its host could be gained by assessing the potential infectivity of *C. burnetii* both *in vitro* and *in vivo*. To date, the infectious potential of *C. burnetii* has poorly been investigated using cell lines (Beare et al., 2011; Mori et al., 2013; Shannon and Heinzen, 2008) or animal models, such as guinea pigs (Burnet and Freeman, 1983; Russell-Lodrigue et al., 2006; Tamrakar et al., 2011) or mice (Melenotte et al., 2016; Mori et al., 2013). Although guinea pigs seem particularly susceptible to *C. burnetii* infection by aerosol models, mice are mostly used due to the many relevant genetic and immunologic tools engineered for this model. Mice also display differences in strain susceptibilities (Scott et al., 1987) that manifest as an apparent splenomegaly in immunocompetent mice (Franti et al., 1974).

However, the methods used to calibrate the amount of *C. burnetii* inoculated into mice and cells are often difficult to reproduce. Frequently, the qPCR method used is imperfect, as it does not allow determination of the proportion of dead or living bacteria in the inoculum. Similarly, questions remain concerning the choice of the inoculation route on *in vivo* models. Although, the intraperitoneal (i.p) route is the most commonly used (Moos and Hackstadt, 1987), preliminary results suggest a failure of the bacterial phase differentiation (I and II) since splenomegaly and bacterial multiplication were observed in mouse spleens, regardless of the inoculated phase.

In this study, we first applied an *in vivo* infection model to compare the infectious potential of fifteen *C. burnetii* isolates collected from French domestic ruminant farms with the reference strain Nine Mile (in phase II and in an intermediate phase) by challenging the footpad of CD1 mice. This model seems to strongly discriminate the isolates from intracellular bacteria depending on their invasiveness in mice, contrary to the *i.p* model (Buzoni-Gatel and Rodolakis, 1983; Rodolakis et al., 1998). Five of the fifteen isolates were also tested *in vitro* on ovine and bovine macrophage cell lines. We used propidium monoazide (PMA)-*icd*-qPCR to determine the exact amount of living bacteria in the inoculum used to challenge cell lines or mice. The monitored parameter for each isolate was its proliferative capacity, which was measured by assessing the number of *C. burnetii* genome-equivalents (GE), either over time in cell lines or in mouse spleen 10 days post-inoculation.

Material and Methods

Mice. Specific pathogen free (SPF) six-week-old male CD1 strain mice were purchased from Envigo experimental facility (Envigo, Gannat, France). Mice were housed in SPF isolated cages (Allentown, Bussy-Saint-Georges, France) at the L3 animal facility in ANSES Sophia Antipolis under controlled conditions. Experiments conducted in this study were all approved by the Animal Ethical Committee of ANSES-ENVA-UPEC, project approval No. APAFIS#41J2-2016021611394293v4 for the isolation protocol and No. APAFIS#5444-201605241154148v3 for the *in vivo* protocol.

Cell lines. SV40-transformed bovine (SV40 macrophages) and MoCl4-transformed ovine macrophage cells (MoCl4 macrophages) were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France).

Isolation of *C. burnetii* from Q fever-aborted ruminant females. As a result of different sampling events on cattle, sheep and goat farms in France from 2006 to 2015, a large collection of field samples was recovered following potential Q fever-related abortions. A total of 301 samples from aborted females were genotyped by MLVA. Briefly, three major genotypic groups were identified (A, B and C), divided into 12 genotypic sub clusters (A1 to A5; B and C1 to C6), as described previously (Joulie et al., 2017). In each of these 12 genotypic sub clusters, one sample per species and per production area was selected for the isolation step. In total, the isolation protocol was performed from 38 field samples on CD1 mice.

Mice were then injected intraperitoneally with 200µl of homogenized abortion material five days after their arrival. The five first days were dedicated to an acclimation phase. Spleens were harvested at day 15, crushed in 3 ml of MEM medium (Minimum Essential Medium – Thermo Fisher Scientific) and tested for the presence of *C. burnetii* by *icd*-qPCR and (PMA)-*icd*-qPCR (see the protocol details in the following paragraph). Only strains for which the live bacterial burdens in the spleen at 10 days post-inoculation were greater than 10⁵ GE were selected for *in vitro* and *in vivo* models.

Propidium Monoazide (PMA)-*icd*-qPCR and *icd*-qPCR.

(i) Extraction protocol - DNA from the above-mentioned crushed spleens was first extracted with 5g of Chelex 100 Chelating resin (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France), and then diluted in 25µl of sodium dodecyl sulfate 10% and 250µl of tween 20 according to a protocol adapted from (de Lamballerie et al., 1994). Briefly, 200 µL of this prepared-chelated solution was added to 20µl of inoculum diluted into 180µl of sterilized PBS 1X. Samples were then placed in a water bath for 30 minutes at 100°C and centrifuged at 13,500 g for 10 min. The supernatant was recovered for the quantification of *C. burnetii* DNA.

(ii) *icd*-qPCR protocol - A qPCR assay targeting the *icd* gene allowed estimating the overall bacterial burdens in each isolate solution, as previously described (Klee et al., 2006). Serial dilutions of genomic DNA reference material were used as quantitative standards. The limit of quantification (LOQ) of the method was assessed at 5.10³ GE/ml according to the French standards NF-U47-601 and NF-U47-601 following an accuracy profile experiment (3 independent qPCR assays of 2 replicates with different known bacterial concentrations).

(iii) (PMA)-*icd*-qPCR protocol - The initial isolate solutions were diluted to reach 10⁵ GE/ml depending on the bacterial burdens found by qPCR to assess the percentage of living bacteria by (PMA)-*icd*-qPCR in each. Briefly, one microliter of BIOTIUM Plax 100µM in H₂O (Interchim, Montluçon, France) was added to each isolate solution. The samples were then incubated for 30 minutes at 4°C in the dark and vortexed with a rotating wheel. Subsequently,

they were exposed to a visible light for 30 minutes in an appropriate instrument (Past blue system, Geniul). Then, the *icd*-qPCR assay was performed to assess the number of viable bacteria in each isolate solution.

In vivo infection. Six-week old male CD1 mice (Envigo) were injected in the footpad with 10^5 *C. burnetii* (50µl) previously categorized as living by (PMA)-*icd*-qPCR. Both (PMA)-*icd*-qPCR and dilutions were performed from two distinct inoculum aliquots that had never been defrosted before. For each tested strain, five mice were infected after five days of acclimatization in the L3 animal facility. Dilutions of *C. burnetii* from stock suspensions were obtained in sterilized PBS 1X. The 5 control mice were only injected with sterilized PBS 1X. The five infected or control mice were sacrificed at 10 days post-inoculation for each strain. The spleens were collected, crushed and then tested individually by using *icd*-qPCR targeting the *icd* gene.

We estimated an infectious potential of the isolates by comparing the bacterial burdens obtained in the spleen of mice with those obtained for the Nine Mile RSA 493 reference strain in an intermediate phase (NM int.) and in phase II (NM II).

In vitro infection. Both bovine and ovine cell lines were suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 5% FCS. Each cell line suspension was separately distributed in three 24-well plates (i.e. one milliliter per well). The SV40 and MoCl4 macrophages were then incubated (37°C, 5% CO₂) 24 and 96 hours, respectively, in order to obtain a 100% confluent cell mat. Afterwards, cell lines were infected with 4.10^5 *C. burnetii* categorized as living by (PMA)-*icd*-qPCR (MOI corresponded to 5 and 10 for SV40 and MoCl4 macrophages, respectively). As for the *in vivo* model, both (PMA)-*icd*-qPCR and dilutions were performed from two distinct inoculum aliquots that had never been defrosted before.

After 3h incubation at ambient temperature, the supernatants were removed and 1ml of fresh RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) was immediately added in each well. Supernatants were frozen at -80°C to assess by *icd*-qPCR the number of bacteria that had penetrated into the cell mat.

Cells were incubated at 35°C and harvested at days 1, 2, 3 and 6 post-infection. For each time point and each strain, the supernatants were removed and individually kept in Eppendorf tubes. Then, the cells mats were harvested after adding 500µl of 0.05% trypsin – 1X EDTA (Thermo Fisher Scientific) and incubation (37°C – 30 min). Once detached, cells were added to the aforementioned supernatants kept in Eppendorf tubes. The kinetics of *C. burnetii* growth were established by *icd*-qPCR. On each plate control cells were infected by sterilized PBS 1X to rule out cross-contamination. The multiplication kinetics of isolates were compared to those

obtained for both NM int. and for NM II reference strains.

Statistical analyses and virulence comparisons of strain data. All statistical analyses were carried out in R (R version 3.1.0). Our alpha level for statistical significance was set at 0.05.

Virulence data obtained from the *in vivo* model were compared via an ANOVA test. Then a multiple mean comparison was performed from the most significant variable in order to cluster the analyzed strains, based on a Tuckey test.

Virulence data obtained from the *in vitro* model were compared based on scoring related to the obtained kinetics of multiplication depending on three phases of bacterial growth (from days 0 to 1; from days 1 to 3 and from days 3 to 6).

Table 1 *art.5* : Table showing the characteristics of isolates selected to test on the *in vivo* and *in vitro* models depending on their originating host species, the geographic area of the farm and their genotypic cluster.

No. of isolate	Host species	Geographic area in France	Genotypic cluster (no. of subcluster)
1 ^a	Sheep	Middle South	A(1)
2 ^a	Cattle	Middle West	A(2)
3 ^a	Goat	Middle South	A(3)
4 ^a	Cattle	Southwest	C(5)
5 ^a	Goat	Center	B
6	Goat	Middle West	B
7	Goat	Middle West	A(1)
8	Cattle	Middle West	C(1)
9	Sheep	Southwest	A(3)
10	Goat	Middle West	C(1)
11	Sheep	Middle West	B
12	Sheep	Middle South	A(3)
13	Cattle	Center	C(1)
14	Cattle	Southwest	C(1)
15	Cattle	Middle West	A(1)
NM RSA 493 intermediate phase	Tick	-	C(6)
NM RSA 493 phase II	Tick	-	C(6)

^a Isolates tested on both *in vivo* and *in vitro* models

Results

Enumeration of viable *C. burnetii* cells by PMA-PCR. From the 38 samples selected for isolation on mice, 15 isolates displayed sufficient bacterial burdens (i.e. 10^5 live *C. burnetii*) and were then tested on the *in vivo* virulence model. Among these 15 isolates, we obtained a sufficient volume of crushed spleen from mice (i.e. 8 ml) for five isolates to test their proliferative capacity on macrophage cell lines (*Table 1*).

Infectious potential of *C. burnetii* strains in CD1 mice. For each of the 15 isolates, groups of 5 male CD1 mice were injected in the footpad with 10^5 live *C. burnetii* to assess their invasiveness *in vivo* in comparisons with the NM int. and NM II reference strain. Bacterial burdens found in mouse spleens 10 days after inoculation were statistically different depending on strains ($p < 0.05$) and but not geographic localization of farms or the host species ($p > 0.05$).

A multiple mean statistical comparison of the bacterial loads obtained in the mouse spleens allowed us to group isolates according to their potential of invasiveness in biological hosts, as detailed in *Table 2*. Overall, we found four phenotypic groups (I, II, III and IV). The group I is composed of two isolates from two distinct MLVA genotypic groups (A and B) and were sampled from sheep and cattle, respectively. For both, *C. burnetii* did not reach the spleen (i.e. bacterial burdens in spleen were null). Interestingly, this group included the NM II reference strain from the C MLVA genotypic cluster (*Table 2*).

Table 2 *art.5* : Table showing the mean bacterial burdens quantified in the spleen of CD1 mice 10 days after inoculation

Isolate no. (species) Genotypic cluster	Mean bacterial burdens in spleen mice (log10 GE/ml)	Standard deviation	Phenotypic group based on a multiple comparison of means
1 (sheep) A1	0	-	I
4 (cattle) C5	0	-	I
NM II C6	1.38	[0; 3.48]	I
NM int. C6	2.64	[0.48; 4.80]	II
5 (goat) B	4.03	[3.65; 4.41]	II
6 (goat) B	4.10	[3.75; 4.45]	II
7 (goat) A1	5.24	[4.80; 5.68]	III
2 (cattle) A2	5.07	[4.50; 5.64]	III
3 (goat) A3	5.13	[4.72; 5.54]	III
9 (sheep) A3	5.58	[5.31; 5.85]	III
8 (cattle) C1	5.53	[5.19; 5.87]	III
10 (goat) C1	5.58	[5.27; 5.89]	III
15 (cattle) A1	7.31	[7.13; 7.49]	IV
12 (sheep) A3	6.11	[5.83; 6.39]	IV
11 (sheep) B	6.09	[5.66; 6.52]	IV
13 (cattle) C1	6.30	[6.12; 6.48]	IV
14 (cattle) C1	6.83	[6.46; 7.20]	IV

In the phenotypic group II, two isolates belonging to the same MVLA genotypic cluster (B) were collected from goats. The NM int. reference strain, from the C cluster, was found in this phenotypic group (Table 2).

The third phenotypic group (III) was composed of isolates from both the three domestic ruminant species and the three MLVA genotypic groups (A, B and C). Similarly, in the last phenotypic group (IV), isolates were from the three genotypic groups but they were mostly collected from cattle and sheep (Table 2).

Infectious potential of *C. burnetii* strains in cell line models. The proliferative capacity of the five isolates (isolate number 1 to 5 - Table 1) on the MoCl4 and SV40 macrophage cell lines were compared to the NM int. and NM II reference strain. The multiplication kinetics obtained are shown in the Figure 1. Overall, NM int. and NM II showed the fastest growth rate on MoCl4 cell lines, while a cattle isolate showed the fastest growth on SV40 macrophages. Besides, we observed that isolates that penetrated easily during the 3 hours of incubation into the cell mat multiply slower the days afterwards (Tables 3 and 4). Conversely, for isolates in which weak bacterial burdens were detected after 3h of incubation, we observed a bacterial growth on the following days (Tables 3 and 4).

Additionally, we did not observe any link between host species where isolates were sampled and the multiplication kinetics on cell lines.

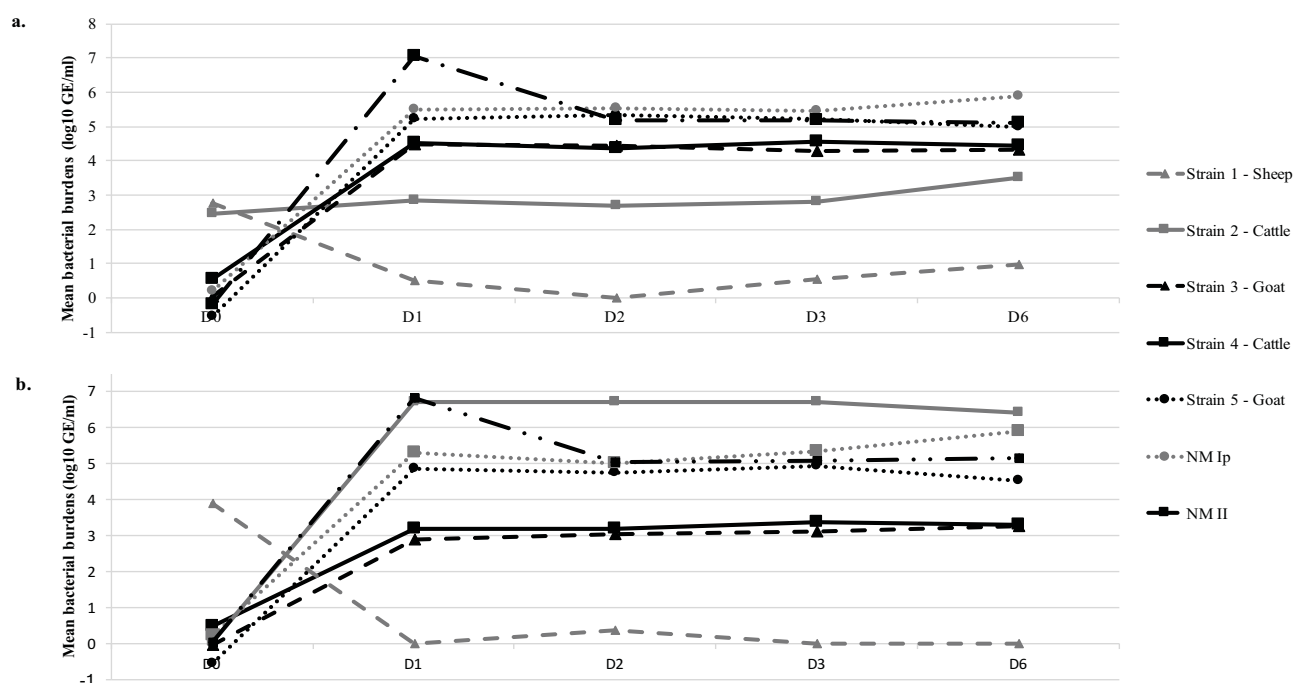


Figure 1 *art.5* : Graphs showing the multiplication kinetics of *C. burnetii* on bovine (a) and ovine (b) macrophage cell lines.

Table 3 *art.5* : Scoring related to the kinetics of multiplication of the ovine MoCl4 macrophages depending on the bacterial growth phases

No. of isolate (species) Genotypic cluster	Multiplication ability at day 0 (0 à 4)	Multiplication ability from days 1 to 6 (1 à 7)	Average bacterial burdens from days 1 to 6 (1 à 7)
1 (sheep) A1	3	0.5	1
2 (cattle) A2	2.5	3	3
3 (goat) A3	0	4.5	4.5
4 (cattle) C5	0.5	4.5	4.5
5 (goat) B	0	5	5
NM int. (tick) C6	0	5.5	5.5
NM II (tick) C6	0	7	5.5

Table 4 *art.5* : Scoring related to the kinetics of multiplication of the bovine SV40 macrophages depending on the bacterial growth phases

No. of isolate (species) Genotypic cluster	Multiplication ability at day 0 (0 à 4)	Multiplication ability from days 1 to 6 (1 à 7)	Average bacterial burdens from days 1 to 6 (1 à 7)
1 (sheep) A1	4	0	0.5
3 (goat) A3	0	3	3
4 (cattle) C5	0.5	3	3.5
5 (goat) B	0	5	5
NM int. (tick) C6	0	5.5	5.5
NM II (tick) C6	0	7	5.5
2 (cattle) A2	0	7	6.5

Discussion

The Q fever epidemic that hit the Netherlands between 2007 and 2012 is the largest ever recorded in terms of human cases, with more than 4,000 cases. This epidemic made better study of Q fever possible, with the goals of better understanding the etiology, pathology, and biology of *C. burnetii*. In France, although no such epidemic has ever been recorded, Q fever is the second-greatest disease that impacts the French ruminant farms (ANSES, 2012). Thus, in order to limit economic losses for farmers in terms of prophylactic and curative control measures, it is crucial to better characterize the virulence of the circulating strains.

Main findings. In this study, we are the first to assess the infectious potential of five French field isolates by using *in vitro* and *in vivo* models of infection and comparing our results to those of the NM reference strain.

Our study is one of the few to quantify the number of live *C. burnetii* in the inoculum used for experimental infection models (Kuley et al., 2015; Mori et al., 2013). Here, we used PMA, which is described as potentially more specific to characterize the live/dead ratios of *C. burnetii* compared to EMA (Kuley et al., 2015; Nocker et al., 2009).

Quantification of viable bacteria. The first step was to determine the dose of infectious *C. burnetii* that we used. We therefore chose a protocol to discriminate dead bacteria from living bacteria. To date, we can easily quantify the total amount of DNA present in a sample by qPCR, but the estimation of the infectious bacteria is usually measured through cell culture growth after serial dilutions. This method is particularly tedious and lacks sensitivity. Furthermore, the isolates can adapt to *in vitro* conditions, which can induce loss of virulence factors. Combining qPCR and PMA dye staining, such as performed here, proves to be an excellent alternative to characterize bacterial viability. PMA selectively penetrates damaged bacterial cells and, upon photolysis, inhibits the PCR amplification of genomic DNA from dead cells, allowing direct measurement of living bacteria. PMA-PCR is widely used as a viability test for various pathogens (Elizaquível et al., 2012; Josefsen et al., 2010; Pan and Breidt, 2007; Slimani et al., 2012), and our results with *C. burnetii* successfully confirmed the use of this test.

Choice of the experimental models. A need exists in *Coxiella* research for an animal model that simulates both the natural route of infection and common clinical manifestations associated with either ruminant or human Q fever. Such relevant physiological models are particularly needed for more precisely assessing the comparative virulence of different *C. burnetii* isolates. To date, cell cultures and mice are provisional options offering several possibilities to study various aspects of *C. burnetii*'s potential pathogenicity. However, *C. burnetii* has evolved

strategies to interfere with the maturation process and to direct the development of an environment that supports survival and replication.

Induction of virulence genes *in vivo*. Among the known virulence factors, LPS is considered to be the major determinant of the virulent phenotypic expression and infection of *C. burnetii*. To date, the LPS most likely shields the bacterial cell surface from innate immune recognition and/or the LPS phase II works as an immunological decoy.

Genes encoding structural features of LPS (lipid A, core region and O-antigen) were enhanced under *in vivo* conditions compared to *in vitro* (Hoover et al., 2002). Indeed, transporters implicated in lipid A and O-antigen transport were strongly induced, indicating that the export of these LPS components to the outer membrane plays an important role in the bacterial virulence (Hoover et al., 2002; Zhou et al., 1998). Thus, the mouse footpad model developed in our study seems to be appropriate for discriminating isolates into I, II or intermediate phases, as previously described for *Chlamydia psittaci* (Rodolakis et al., 1989). The popliteal lymph node may constitute a metabolic barrier for the bacteria in phase II, which could not reach the spleen of the infected mice to multiply. The few exceptions of mice, infected with phase II *C. burnetii* and for which bacteria were found in their spleen, are potentially related to the presence of a tiny portion of phase I residual bacteria in the inoculum. The standardization of such model will thus facilitate a better characterization of the isolate virulence considering their LPS phase.

***C. burnetii* requires metabolic adaptations *in vitro*.** *C. burnetii* induces the biogenesis of a unique parasitophorous vacuole (PV), which exposes it to varying levels of oxidative or nitrosative stresses. *In vitro*, *C. burnetii* employs several strategies different to those developed *in vivo* to evade such stresses by (i) evolving a preference for a low iron environment, (ii) expressing a minimal and likely crucial set of DNA repair genes and (iii) detoxifying the PV especially by reactive oxygen and nitrogen degrading enzymes. All these strategies, may explain differences observed here between the *in vivo* and *in vitro* isolates patterns. However, defense mechanisms in *C. burnetii* against *in vitro* stresses are not fully defined, which encourages us to go further on the experimental parameters recorded in this study. We suggest in particular to better consider the forms and the number of vacuoles in cells, which potentially may be related to different virulence profiles. Another hypothesis is to carry out kinetics over longer durations in order to check the adaptability of the isolates to the cell lines over time.

Perspectives. We describe here the implementation of a mouse model used to compare isolates' pathogenicity. Moreover, we strongly believe that our model enables the distinction between wildtype *C. burnetii* strains' pathogenicity and might also be useful to test genetically modified *C. burnetii* to identify virulence markers.

The *in vitro* model was also shown to be complementary and allowed distinction between the five examined isolates.

Overall, our findings might help the implementation of surveillance of virulent strains and ultimately allow the adaptation of prophylaxis measures in livestock farms.

Acknowledgments

All authors thank Dr. M. Mori (Coda Cerva Brussels, Belgium) who kindly provided the SV40-transformed bovine macrophages and P. Dufour (ANSES Sophia Antipolis, France) for his technical support during the experiment.

References

- OIE. Contributors: Rousset, E., Sidi-Boumedine, K. Q fever. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). 2015; OIE.
- EFSA. Contributors: More, S., Stegeman, J. A., Rodolakis, A., Roest, H-J., Vellema, P., Thiéry, R., Neubauer, H., van der Hoek, W., Staerk, K., Needham, H., Afonso, A. Georgiev, M., Richardson, J. Scientific opinion on Q Fever. EFSA. 2010; 1723:280.
- Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D. Wind in November, Q fever in December. Emerging Infectious Diseases. 2004;10: 1264-9.
- van Leuken JPG, van de Kasstele J, Sauter FJ, van der Hoek W, Heederik D, Havelaar AH, et al. Improved correlation of human Q fever incidence to modelled *Coxiella burnetii* concentrations by means of an atmospheric dispersion model. International Journal of Health Geographics. 2015;14.
- Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? Veterinary Research. 2005; 36:327-49.
- Narasaki CT, Toman R. Lipopolysaccharide of *Coxiella burnetii*. In: Toman R, Heinzen RA, Samuel JE, Mege J-L, editors. *Coxiella burnetii*: recent advances and new perspectives in research of the Q Fever bacterium: Springer; 2012. p. 65-90.
- van Schaik, E.J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M.M., Samuel, J.E., 2013. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. Nature Reviews Microbiology 11, 561-573.
- Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, et al. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. Clinical Microbiology Reviews. 2017; 30:15-190.

- Shannon JG, Heinzen RA. Infection of human monocyte-derived macrophages with *Coxiella burnetii*. Bacterial Pathogenesis: Methods and Protocols. 2008:189-200.
- Beare PA, Gilk SD, Larson CL, Hill J, Stead CM, Omsland A, et al. Dot/Icm type IVB secretion system requirements for *Coxiella burnetii* growth in human macrophages. Mbio. 2011;2.
- Russell-Lodrigue KE, Zhang GQ, McMurray DN, Samuel JE. Clinical and pathologic changes in a guinea pig aerosol challenge model of acute Q fever. Infection and Immunity. 2006; 74:6085-91.
- Tamrakar SB, Haluska A, Haas CN, Bartrand TA. Dose-response model of *Coxiella burnetii* (Q fever). Risk Analysis. 2011; 31:120-8.
- Melenotte, C., Lepidi, H., Nappez, C., Bechah, Y., Audoly, G., Terras, J., Raoult, D., Bregeon, F., 2016. Mouse model of *Coxiella burnetii* aerosolization. Infection and Immunity 84, 2116-2123.
- Burnet FM, Freeman M. Experimental studies on the virus of “Q” fever. Review of Infectious Diseases. 1983; 5:800-8.
- Scott GH, Williams JC, Stephenson EH. Animal models in Q fever: pathological responses of inbred mice to phase I *Coxiella burnetii*. Journal of General Microbiology. 1987; 133:691-700.
- Franti CE, Behymer DE, Goggin JE, Wright ME. Splenomegaly, sex, and other characteristics of laboratory-animals used for primary isolations of *Coxiella burnetii*. Laboratory Animal Science. 1974; 24:656-65.
- Moos ABBIE, Hackstadt T. Comparative virulence of intra-and interstrain lipopolysaccharide variants of *Coxiella burnetii* in the guinea pig model. Infection and Immunity. 1987; 55:144-1150.
- Rodolakis, A., Salinas, J., Papp, J., 1998. Recent advances on ovine chlamydial abortion. Veterinary Research 29, 275-288.
- Buzoni-Gatel, D., Rodolakis, A., 1983. A mouse model to compare virulence of abortive and intestinal ovine strains of *Chlamydia psittaci*: influence of the route of inoculation. Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie 134, 91-99
- de Lamballerie X, Chapel F, Vignoli C, Zandotti C. Improved current methods for amplification of DNA from routinely processed liver tissue by PCR. Journal of clinical pathology. 1994; 47:466-7.
- Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, et al. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. BMC Microbiology. 2006; 6.

- Joulie A, Sidi-Boumedine K, Bailly X, Gasqui P, Barry S, Jaffrelo L, et al. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* in French livestock reveals the existence of three main genotype clusters and suggests species-specific associations as well as regional stability. *Infection Genetics and Evolution*. 2017; 48:142-9.
- ANSES. Hiérarchisation de 103 maladies animales présentes dans les filières ruminants, équidés, porcs, volailles et lapins en France métropolitaine. In: report At, editor. 2012.
- Mori M, Boarbi S, Michel P, Bakinahe R, Rits K, Wattiau P, et al. *In Vitro* and *In Vivo* infectious potential of *Coxiella burnetii*: a study on Belgian livestock isolates. *Plos One*. 2013; 8:1-9.
- Kuley R, Bossers-deVries R, Smith HE, Smits MA, Roest HIJ, Bossers A. Major differential gene regulation in *Coxiella burnetii* between *in vivo* and *in vitro* cultivation models. *BMC Genomics*. 2015;16.
- Nocker A, Mazza A, Masson L, Camper AK, Brousseau R. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *Journal of Microbiological Methods*. 2009; 76:253-61.
- Elizaquível P, Sánchez G, Selma MV, Aznar R. Application of propidium monoazide-qPCR to evaluate the ultrasonic inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in fresh-cut vegetable wash water. *Food Microbiology*. 2012; 30:316-20.
- Pan Y, Breidt F. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73:8028-31.
- Josefsen MH, Löfström C, Hansen TB, Christensen LS, Olsen JE, Hoorfar J. Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010; 76:5097-104.
- Slimani S, Robyns A, Jarraud S, Molmeret M, Dusserre E, Mazure C, et al. Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non-cultivable *Legionella* by qPCR. *Journal of Microbiological Methods*. 2012; 88:319-21.
- Hoover TA, Culp DW, Vodkin MH, Williams JC, Thompson HA. Chromosomal DNA deletions explain phenotypic characteristics of two antigenic variants, phase II and RSA 514 (crazy), of the *Coxiella burnetii* Nine Mile strain. *Infection and Immunity*. 2002; 70:6726-33.

Zhou Z, White KA, Polissi A, Georgopoulos C, Raetz CR. Function of *Escherichia coli* MsbA, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis. Journal of Biological Chemistry. 1998; 273:12466-75.

Rodolakis A, Bernard F, Lantier F. Mouse models for evaluation of virulence of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants. Research in Veterinary Science. 1989; 46:34-9.

Principaux résultats

- ✚ Contrairement aux modèles *in vivo* en i.p, le **modèle *in vivo* footpad** a permis de **différencier les souches virulentes** (en phase I), qui parviennent à passer la barrière poplitéale, des **souches avirulentes** (en phase II), qui ne parviennent pas à passer la barrière poplitéale.
- ✚ Le **modèle *in vivo*** a également permis **d'identifier 4 profils de virulence**, différents des 3 groupes génotypiques MLVA, à partir de l'étude de la charge bactérienne obtenue dans la rate des souris selon les isolats.
- ✚ Le **modèle *in vitro*** suggère que les **isolats** qui **pénètrent lentement** dans le tapis cellulaire tendent ensuite à **se multiplier plus facilement** au cours du temps comparativement à ceux qui pénètrent rapidement dans le tapis.
- ✚ Les **modèles *in vivo* et *in vitro*** sont **complémentaires** mais **non substitutifs**.

CHAPITRE IV

EXPLORATION DE L'EXPOSITION DU CHEVAL À *COXIELLA BURNETII* ET LIENS POTENTIELS AVEC LA SYMPTOMATOLOGIE

L'identification d'indicateurs du risque zoonotique selon le contexte épidémiologique est indispensable pour maîtriser au mieux les possibles transmissions intra et interspécifiques. En France, l'endémicité de la fièvre Q chez les ruminants domestiques et chez l'Homme est connue, et plus spécifiquement dans des régions à forte densité d'élevages de ruminants domestiques (Frankel et al., 2011; OIE, 2015).

La détection d'anticorps chez d'autres espèces animales que les ruminants domestiques, suggère une exposition de ces espèces au pathogène et potentiellement l'existence d'infections symptomatiques ou asymptomatiques associées. Néanmoins, peu d'études se sont intéressées à la fréquence de détection et/ou d'exposition de *C. burnetii* chez d'autres espèces à l'interface entre les ruminants domestiques et l'Homme : petits carnivores, chevaux, rongeurs ou oiseaux domestiques, entre autres (EFSA, 2010). Pourtant, selon le contexte épidémiologique certaines espèces animales, telles que les chevaux, sont susceptibles de constituer des indicateurs plus ou moins précoces de la circulation de la bactérie entre les ruminants domestiques et des ruminants à l'Homme. Des investigations complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer la réelle exposition de cette espèce à la bactérie ainsi que les formes cliniques éventuellement associées. Nous avons ainsi investigué à partir d'échantillons provenant de différents dispositifs de surveillance syndromique chez le cheval les potentielles formes cliniques consécutives à une infection par *C. burnetii*. La forte concentration en structures équestres dans la zone endémique du sud-est de la France pour les ruminants et l'Homme nous a également amené à évaluer l'exposition du cheval à la bactérie *C. burnetii*. Notre travail visait à déterminer si le cheval pouvait éventuellement constituer un réservoir pour *C. burnetii*, une source de contamination pour l'environnement ou un indicateur précoce de la circulation de la bactérie afin d'identifier le risque zoonotique.

L'objectif de cette partie était donc double :

- Étudier de façon exploratoire les liens entre certains syndromes d'origine inexpliquée chez le cheval et une infection potentielle à *C. burnetii*.
- Évaluer l'exposition du cheval à *C. burnetii* dans une zone décrite comme endémique pour les ruminants domestiques et l'Homme

IV.1 Liens entre certains syndromes inexpliqués et une potentielle infection par *C. burnetii* chez le cheval

IV.1.1 Liens possibles avec la clinique chez le cheval à partir d'échantillons collectés dans le cadre de dispositifs de surveillance syndromique

Pour une gestion intégrée de la fièvre Q il est indispensable de connaître précisément l'ensemble des réservoirs de la bactérie. Cette connaissance passe inévitablement par une meilleure compréhension de la circulation de la bactérie chez d'autres espèces animales que les réservoirs principaux. Dans ce paragraphe, nous étudions les liens potentiels entre certains syndromes inexpliqués chez le cheval et une infection par *C. burnetii*.

Les syndromes auxquels nous nous sommes intéressés correspondent à certaines des principales affections touchant les ruminants domestiques et l'Homme lors d'infection symptomatique par *C. burnetii*, à savoir les avortements et les troubles respiratoires. Des études d'infections expérimentales chez le cheval ont également décrit précédemment certains de ces syndromes, tels que des fièvres, gastroentérites, bronchopneumonies, rhinites ou encore des conjonctivites (Blinov, 1957; Zotov et al., 1956). L'objectif de ce travail était d'évaluer la fréquence de portage de *C. burnetii* dans un contexte soit d'avortement soit de syndromes respiratoires inexpliqué chez le cheval.

IV.1.1.1 Méthodologie

Les prélèvements analysés dans cette partie proviennent du laboratoire Labéo Franck Duncombe à Caen (Loïc Legrand - *Figure 6*). Ces échantillons ont été collectés *via* le réseau d'épidémiosurveillance en pathologie équine (RESPE) dans le cadre de la surveillance événementielle de différentes maladies affectant l'espèce équine en France. Brièvement, le RESPE est fondé sur un réseau de 550 vétérinaires sentinelles, praticiens et volontaires répartis sur tout le territoire français. Leur rôle est de déclarer les suspicions de maladies infectieuses à l'un des sous réseaux du RESPE. En cas de résultat positif vis-à-vis de l'une des maladies surveillées, le RESPE diffuse une alerte à l'ensemble de ses contacts, il assure un suivi renforcé du ou des foyers, informe les acteurs de la filière, et peut déclencher dans certains cas la mise en place d'une cellule de crise et de suivi.

Tous les échantillons collectés par le RESPE en contexte d'avortement ou de troubles respiratoires ont été extraits au Labéo Franck Duncombe à Caen à l'aide respectivement d'un

kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) et d'un kit QIAamp viral RNA Mini Kit (Qiagen).

L'ensemble des échantillons collectés en contexte d'avortement ou provenant de lavages respiratoires ont été analysés purs. Nous avons ajouté 0,1 µl de GAPDH par échantillon comme témoin d'inhibition. Une méthode PCR en temps réel non quantitative (nqPCR) ciblant le gène *IS1111* a été utilisée pour la détection de l'ADN de *C. burnetii* dans chaque échantillon, comme décrit dans l'article 1 (paragraphe III.1.1.2). Une quantification relative a été effectuée sur la base du cycle seuil (*Ct*) obtenu.

Les échantillons positifs ont ensuite été ré-analysés à l'aide d'une qPCR incluant une gamme de calibration, comme décrit dans l'article 1 (paragraphe III.1.1.2). Ainsi nous avons pu estimer, les charges bactériennes dans chacun des échantillons positifs.

En contexte d'avortement. Tous les prélèvements sélectionnés ont été réalisés en contexte d'avortement déclarés entre 2012 et 2014. La détection des principaux pathogènes abortifs chez la jument : herpès virus équin de type 1 (HVE 1), herpès virus équin de type 4 (HVE 4), leptospires pathogènes, et artérite virale équine, s'est révélée négative pour tous les extraits d'ADN mis à notre disposition.

Nous avons ciblé en priorité l'analyse des échantillons provenant d'une même femelle lorsque plusieurs types d'échantillons étaient disponibles pour celle-ci (*Tableau 4*).

Tableau 4 : Détails du nombre d'échantillons par matrice analysés en qPCR, collectés sur des juments avortées

Matrices analysées	Nombre de juments par type d'échantillon
Placenta (allantochorion)	34
Foie (F) d'avorton	3
Poumons (P) d'avorton	7
Mélange F/P d'avorton	60
Placenta (allantochorion) & organe (ou mélange d'organe) d'avorton	74
Nombre total d'échantillons analysés	252

En cas de syndromes respiratoires inexplicés. L'ensemble des prélèvements sélectionnés a été collecté entre 2015 et 2016. Les matrices utilisées étaient des lavages broncho-alvéolaires, trachéaux ou de poches gutturales. La détection des principaux pathogènes respiratoires affectant les chevaux : HVE 1, 2, 4 et 5, Rhinovirus équin A et B, Mycoplasmes, *Rhodococcus equi*, *Aspergillus fumigatus*, Streptocoques pathogènes bêta-hemolytiques et bactéries

anaérobies strictes, s'est révélée négative sur tous les extraits d'ADN provenant de lavages broncho-alvéolaires et trachéaux mis à notre disposition. Pour les extraits d'ADN provenant de lavages des poches gutturales, seule la gourme (*Streptococcus equi* subsp *equi*) a été recherchée, sans succès.

De la même façon que pour les échantillons collectés en contexte d'avortement, nous avons ciblé des échantillons provenant d'une même femelle lorsque plusieurs types d'échantillons étaient disponibles pour celle-ci. Au total, 498 échantillons prélevés sur 456 chevaux présentant des troubles respiratoires inexpliqués ont été analysés en qPCR pour la détection de *C. burnetii* (Tableau 5).

Tableau 5 : Détails du nombre d'échantillons par matrice analysés en qPCR, collectés sur des chevaux présentant des troubles respiratoires

Matrices analysées	Nombre de chevaux par type d'échantillon
LBA	349
Poches gutturales	57
LT	50
LBA & LT	42
Nombre total d'échantillons analysés	498

IV.1.1.2 Résultats

En contexte d'avortement. Au total, 252 échantillons collectés sur 178 juments en contexte d'avortement ont été analysés par nqPCR. Sur les 252 échantillons testés, 15 provenant de 14 juments différentes étaient positifs. Seul un échantillon d'allantochorion était fortement chargé (7.10^5 GE/ml), les autres présentaient des charges bactériennes variant entre 5.10^2 et 7.10^3 GE/ml.

En cas de syndrome respiratoire inexpliqué. Au total, 498 échantillons prélevés sur 456 chevaux présentant des troubles respiratoires inexpliqués ont été analysés en nqPCR. Sur les 498 échantillons testés, seul un prélèvement provenant d'un LBA était fortement positif (5.10^6 GE/ml), les autres étaient tous négatifs.

IV.1.1.3 Discussion

Les signes cliniques associés à la fièvre Q chez le cheval sont aujourd'hui méconnus. En effet, seules quelques études se sont intéressées à la détection de *C. burnetii* suite à l'apparition de syndromes inexpliqués chez cette espèce. La détection de *C. burnetii* a déjà été décrite dans des placentas ou des organes de fœtus collectés en contexte d'avortement (Leon et al., 2012; Runge

et al., 2012), dans le sang (Seo et al., 2016; Tozer et al., 2014) ou dans l'urine des chevaux (Tozer et al., 2014). Néanmoins, les charges bactériennes détectées par qPCR dans ces prélèvements ne permettent pas de conclure quant à l'implication de la bactérie dans les formes cliniques décrites.

Notre étude a permis d'investiguer une potentielle infection par *C. burnetii* chez des chevaux présentant des signes cliniques classiquement associés à la fièvre Q chez les ruminants domestiques et chez l'Homme. Ces chevaux ont été déclarés dans deux dispositifs de surveillance événementielle, un portant sur les avortements et un autre sur les syndromes respiratoires inexpliqués. *C. burnetii* a été détectée sur une infime proportion d'échantillons (15/256 et 1/498 respectivement pour les prélèvements issus d'avortements et de troubles respiratoires), ce qui potentiellement suggère que les niveaux de charges bactériennes détectés chez les chevaux sont le plus souvent proches de la limite de détection. Néanmoins, exceptionnellement les charges bactériennes détectées dans ces prélèvements peuvent être élevées ($>10^5$ GE/ml) et permettent d'envisager le typage MLVA voire l'isolement des souches circulantes chez cette espèce. Ainsi, il serait intéressant de déterminer à terme la proximité phylogénétique des souches détectées chez le cheval de celles circulantes chez les ruminants domestiques et chez l'Homme. Enfin, dans l'hypothèse où l'étape d'isolement fonctionnerait, nous suggérons de tester la virulence de ces isolats à partir des deux modèles *in vivo* et *in vitro* présentés dans l'article 5 (paragraphe III.3.2). Une comparaison des profils de virulence avec ceux obtenus à partir des souches prélevées chez les femelles de ruminants domestiques pourrait faciliter la compréhension de l'épidémiologie de la fièvre Q.

Par ailleurs, de nombreuses causes, infectieuses et non infectieuses, peuvent être à l'origine des syndromes étudiés dans cette partie (respiratoires et avortement) chez le cheval. Néanmoins, si le contexte épidémiologique est favorable, les vétérinaires traitants devraient peut-être envisager d'investiguer une potentielle infection par *C. burnetii*.

Enfin, des études ont décrit les chiens comme une potentielle espèce sentinelle pour l'Homme lorsque des ovins et des bovins seraient infectés (Boni et al., 1998; Maurin and Raoult, 1999; Willeberg et al., 1980). Ainsi, selon le contexte épidémiologique d'autres espèces animales à l'interface entre les ruminants domestiques et l'Homme sont susceptibles de pouvoir être utilisées comme sentinelles. En effet, des anticorps spécifiques de *C. burnetii* ont été décrits chez les : chats, lapins, porcs, alpagas, rongeurs, pigeons et oies, entre autres (EFSA, 2010; Gonzalez-Barrio et al., 2015). Il serait donc intéressant d'évaluer la pertinence d'utiliser ces espèces comme sentinelles à la fois en santé publique et vétérinaire.

Principaux résultats

-  En **contexte d'avortement**, **15 échantillons** sur 253 analysés par qPCR sont **positifs** dont **1 fortement** ($> 10^5$ GE/ml).
-  En **contexte de syndrome respiratoire**, **1 échantillon** sur 498 analysés par qPCR est **fortement positif** ($> 10^5$ GE/ml).
-  **Génotypage MLVA** envisageable sur les **2 échantillons fortement positifs**.

IV.2 Exposition des chevaux à *Coxiella burnetii* dans une zone décrite comme endémique pour les ruminants domestiques et l'Homme

Après avoir étudié les liens potentiels entre une infection par *C. burnetii* et certains syndromes inexpliqués chez le cheval, nous nous sommes intéressés à l'exposition à *C. burnetii* des équidés dans une zone réputée endémique pour les ruminants domestiques et pour l'Homme. Dans ce paragraphe, nous complétons également les données sur d'éventuels signes cliniques consécutifs à une infection par *C. burnetii* et nous étudions les contaminations environnementales afin d'évaluer la présence de la bactérie dans les différentes structures équestres investiguées.

IV.2.1 Méthodologie générale

IV.2.1.1 Choix de la zone d'étude : Camargue et Plaine de La Crau

La zone d'étude a été choisie à partir de différentes observations de terrain. La concentration élevée d'ovins à certaines périodes de l'année en Plaine de La Crau et de bovins en Camargue (Agreste 2010), suggère une potentielle endémicité de la fièvre Q dans cette zone. De plus, la détection régulière de cas humains confirme également l'endémicité de la bactérie dans la zone (Frankel et al., 2011; Georgiev et al., 2013; Tissot-Dupont et al., 2004; Tissot-Dupont et al., 1999), bien que potentiellement surestimée en raison de la présence du Centre National de Référence *Coxiella* à Marseille.

De plus, différentes enquêtes préliminaires, réalisées sur des échantillons prélevés en Camargue dans le cadre d'investigations sur la circulation du virus de West Nile chez les chevaux (2004, 2007-2010), semblent montrer que les équins de la zone présentent des anticorps vis-à-vis de la fièvre Q (Rousset et al., 2015).

Dans le cadre de ma thèse, nous avons donc mis en place une enquête transversale sur deux années en avril-mai 2015 et mai-juin 2016 dans la zone (*Figure 7*).

IV.2.1.2 Sélection des écuries et des chevaux

Dans cette étude, nous avons ciblé les principaux signes cliniques décrits soit chez l'Homme, soit chez les ruminants domestiques. Ainsi, les vétérinaires de la zone d'étude nous ont transmis une liste de clients où des cas de chevaux en méforme et/ou présentant des fièvres chroniques et/ou des pertes d'état inexpliqués et/ou des avortements et/ou des affections du système respiratoire et cardiaque, avaient été diagnostiqués.

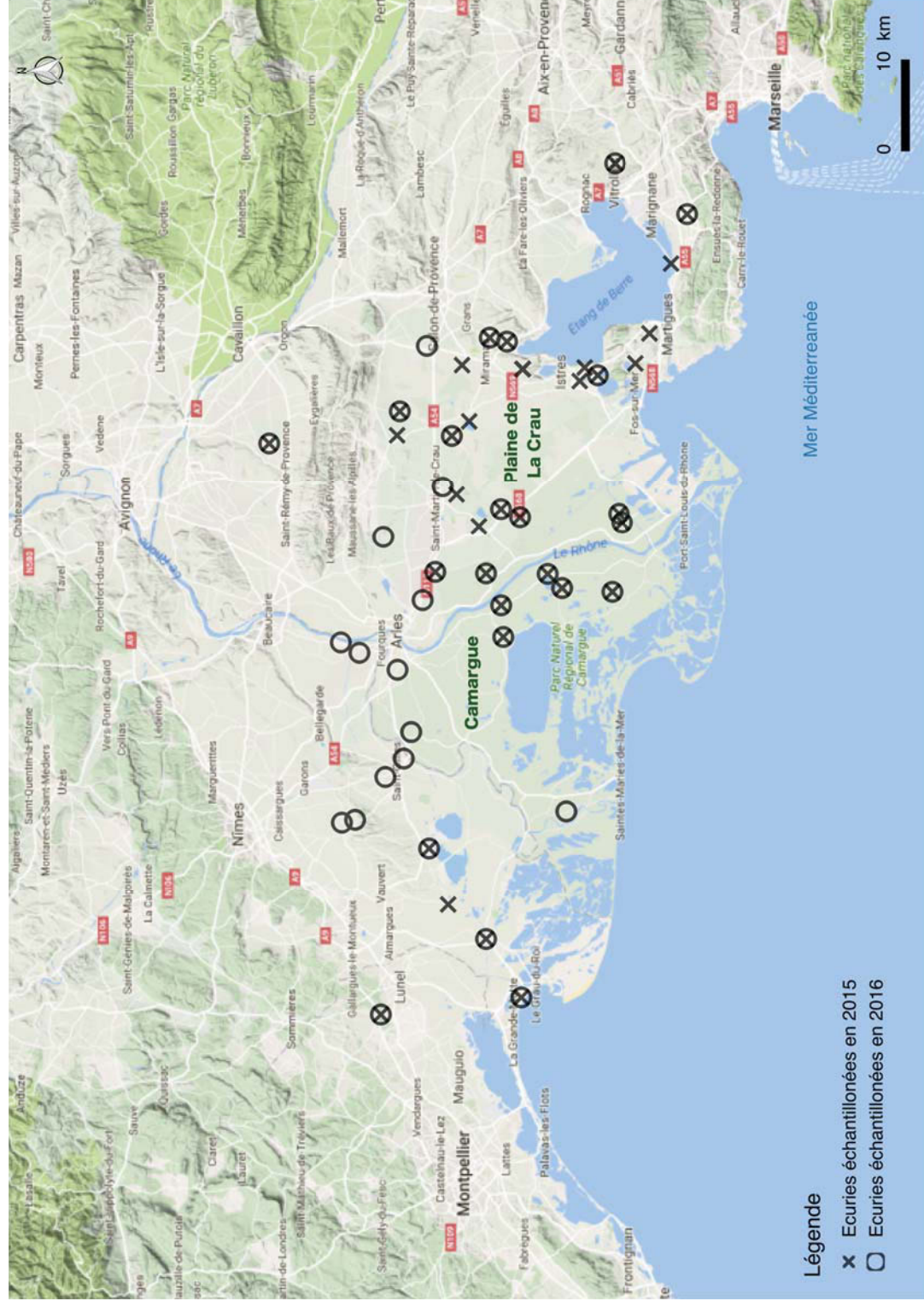


Figure 7 : Cartographie de la distribution spatiale des écuries échantillonnées lors des enquêtes transversales de 2015 et 2016 en Camargue et en Plaine de La Crau.

Nous avons également sélectionné des écuries à proximité des foyers historiques de cas humains de fièvre Q : autours des villes de Martigues, Arles, Nîmes, Aix-en-Provence, Salon-de Provence ou encore Port-Saint-Louis-du-Rhône, entre autres.

Sur accord des vétérinaires traitants, nous avons contacté par téléphone l'ensemble des structures remplissant un des deux critères d'inclusion. Le nombre de chevaux prélevés par structure dépendait de l'effectif total, en ciblant préférentiellement les chevaux présentant les syndromes inexpliqués précédemment cités :

- < 5 chevaux dans la structure : l'ensemble des chevaux étaient prélevés
- Entre 5 et 10 chevaux : 5 chevaux prélevés
- Entre 10 et 15 chevaux : 10 chevaux prélevés
- >15 chevaux : 15 chevaux prélevés

Au total, 338 chevaux dans 37 écuries ont été échantillonnés en 2015 et 294 dans 39 écuries en 2016. Cent-quatre vingt dix-neuf chevaux répartis dans 23 écuries ont été prélevés les deux années (*Figure 7*).

IV.2.2 Article 6: Is the horse a relevant indicator of Coxiella burnetii circulation in the vicinity of human Q fever cases?

IV.2.2.1 Résumé

Contexte. Selon les zones géographiques, les systèmes d'élevages favorisent les contacts plus ou moins réguliers et directs de certaines espèces animales avec les ruminants domestiques. Dans le sud-est de la France, le cheval est par exemple en contact permanent avec des bovins ou des ovins. De plus, cette zone présente la spécificité d'avoir une grande concentration en structures équestres avec des chevaux vivant à l'extérieur toute l'année en zones urbaines à péri-urbaines.

Objectifs. Ainsi, l'objectif de notre travail était d'évaluer concomitamment : (i) le statut sérologique vis-à-vis de *C. burnetii* chez des chevaux dans une zone d'endémicité connue pour les humains et les ruminants ; (ii) la présence de *C. burnetii* dans l'environnement des chevaux, notamment dans les poussières d'élevage et les tiques collectées sur les chevaux ; et (iii) le lien entre la séroprévalence en population équine et le nombre de cas humains de fièvre Q dans cette même zone géographique.

Ce travail visait donc à évaluer le rôle des chevaux dans l'épidémiologie de la fièvre Q, en particulier dans une zone à forte endémicité et la pertinence d'utiliser cette espèce comme un indicateur du risque zoonotique.

Résultats. La séroprévalence des chevaux a été estimée à 4% (n = 335, 37 écuries) en 2015 et 12% (n = 294, 39 écuries) en 2016. Sur 199 chevaux échantillonnés les deux années, 13 ont séroconverti, 8 sont restés séropositifs et un a séronégativé. La majorité des chevaux séropositifs étaient situés dans des zones où la détection de cas humains était la plus fréquente. Aucun des chevaux séropositifs n'a présenté des syndromes compatibles avec une infection par *C. burnetii* dans l'année précédant la prise de sang. En revanche, parmi les chevaux séronégatifs situés dans des écuries où au moins un cheval était séropositif, 14% (n = 6/44) ont présenté des signes cliniques compatibles avec la fièvre Q en 2015 et 10% (n = 6/58) en 2016. Les signes cliniques correspondants étaient principalement des fièvres et pertes de poids chroniques, mais un avortement et une naissance de poulain chétif ont également été observés dans une de ces écuries. L'ADN de *C. burnetii* a été détecté dans près de 36% (n=162/453) des échantillons de tiques collectés en 2015 et en 2016, de façon occasionnelle dans les poussières (n=3/60) et dans aucun prélèvement sanguin de chevaux.

Conclusions. Nos résultats ont montré que les chevaux comme l'Homme, sont particulièrement exposés à *C. burnetii* dans une zone où la bactérie semble circuler activement, principalement du fait d'une forte densité de ruminants domestiques. De plus, la forte concentration des chevaux en zones urbaines et péri-urbaines suggère que cette espèce pourrait être un indicateur intéressant du risque zoonotique du fait de sa proximité avec l'Homme. Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer pleinement les conséquences cliniques d'une infection par *C. burnetii* chez les équidés et leur rôle en tant que réservoir potentiel de la bactérie. À terme, si des signes cliniques spécifiques associés à la fièvre Q sont décrits plus précocement que chez l'Homme, les chevaux pourraient constituer des sentinelles sérologiques ou cliniques pertinentes à utiliser en santé publique.

Is the horse a relevant indicator of *Coxiella burnetii* circulation in the vicinity of human Q fever cases?

(en cours de revision, revue Veterinary Microbiology)

Isabelle Desjardins^a ^{*}, Aurélien Joulié^{a,b,c} ^{*}, Sophie Pradier^d, Sylvie Lecollinet^e, Cécile Beck^e, Laurence Vial^f, Philippe Dufour^e, Patrick Gasqui^b, Loïc Legrand^g, Sophie Edouard^h, Karim Sidi-Boumedine^e, Elodie Rousset^e, Elsa Jourdain^b, Agnès Leblond^{a,b}

^a University of Lyon, VetAgroSup, Marcy L'Etoile, France

^b EPIA, INRA, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

^c ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety), Laboratory of Sophia Antipolis, Animal Q Fever Unit, Sophia Antipolis, France

^d IHAP, University of Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France

^e ANSES, Animal Health Laboratory, EURL on Equine Diseases, Maisons-Alfort, France

^f CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France

^g LABÉO Frank Duncombe Laboratory, EA7450 BIOTARGEN, Université de Caen Normandie IFR 146 ICORE, 14053 Caen cedex 4, France

^h Aix-Marseille University, CNRS 7278, IRD 198, Inserm U1095, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, URMITE, IHU Méditerranée-Infection, Marseille, France

^{*} The first two authors contributed equally to this article

^{*} Corresponding author. Mailing address: VetAgroSup, 1 avenue Bourgelat, F-69280 Marcy L'Etoile, France. Phone: +33 (0)4 78 87 26 77. Fax: +33 (0)4 78 87 26 77. Email: isabelle.desjardins@vetagro-sup.fr.

Abstract

Coxiella burnetii can infect many animal species, but its circulation dynamics in and through horses is still unclear. This study evaluated horse exposure in an area known to be endemic for ruminants and humans. We assessed antibody prevalence in horse serum by ELISA, and screened by qPCR horse blood, ticks found on horses and dust from stables. Horse seroprevalence was 4% (n=335, 37 stables) in 2015 and 12% (n=294, 39 stables) in 2016. Of 199 horses sampled in both years, 13 seroconverted, eight remained seropositive, and one seroreverted. Seropositive horses were located close to reported human cases, yet none displayed Q fever-compatible syndromes. *Coxiella* DNA was detected in almost 40% of collected ticks (n=59/148 in 2015; n=103/305 in 2016), occasionally in dust (n=3/46 in 2015; n=1/14 in 2016) but never in horse blood. This study suggests that horses may be relevant indicators of zoonotic risk.

Keywords: Surveillance, Q fever, horse, ELISA, qPCR, zoonosis

Introduction

Q fever is a worldwide zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, an obligate intracellular Gram-negative bacterium reported in humans and a broad range of animal species, including wild and domestic mammals, birds, and arthropods such as ticks (*Maurin and Raoult, 1999*). In humans, Q fever ranges from an asymptomatic infection (for around 60% of patients) to severe forms (*Eldin et al., 2017; Frankel et al., 2011*). Acute Q fever can manifest as a non-specific flu-like syndrome, pneumonia, or hepatitis (*Eldin et al., 2017; Frankel et al., 2011*). Chronic forms range from endocarditis to osteomyelitis, vascular infections and chronic hepatitis (*Frankel et al., 2011*). In ruminants, Q fever infections are mainly asymptomatic, but major clinical manifestations are abortions, stillbirths or delivery of weak offspring. Domestic ruminants are considered the main reservoir of the disease. The bacterium is released into the environment during birth or abortion, mostly through parturition products and occasionally in feces or milk as well (*EFSA, 2010*).

Both animals and humans become infected mainly by inhaling airborne particles contaminated with *C. burnetii*, though tick-borne infection occurs occasionally (*Duron et al., 2015*). The bacterium may be disseminated by wind (*Tissot-Dupont et al., 2004*) and withstand unfavorable environmental conditions for periods ranging from several months to years (*OIE, 2015*).

Human outbreaks are generally associated with the presence of livestock, but infections may also occasionally be associated with other domestic or wild species such as dogs, cats, rabbits

or birds (EFSA, 2010; Gonzalez-Barrio *et al.*, 2015; Lang, 1990; Marenzoni *et al.*, 2013; Maurin and Raoult, 1999; Stein and Raoult, 1999). Q fever cases have also been reported in horseback riders or people visiting horse facilities, but the source of contamination was likely either small ruminants or ticks present in the horses' environment (Nett *et al.*, 2012; Roest *et al.*, 2013b; Runge *et al.*, 2012). A few studies have also mentioned that people working with horses, like veterinarians or breeders, could potentially be at risk for human infections (Karagiannis *et al.*, 2009; Palmela *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2016; Van den Brom *et al.*, 2013). However, the involvement of horses in Q fever epidemiology remains unclear (Marenzoni *et al.*, 2013; Roest *et al.*, 2013b). Indeed, the few available serological surveys (Joshi *et al.*, 1978; Lang, 1990; Marenzoni *et al.*, 2013; Raseta and Mihajlovic, 1983) suggest that horses may be naturally exposed to *C. burnetii*, with seroprevalence levels ranging from 0% to more than 50%. Additionally, *C. burnetii* DNA has occasionally been reported in samples of aborted equine fetuses or placentas (Leon *et al.*, 2012; Roest *et al.*, 2013b; Runge *et al.*, 2012), but the bacterium has never been clearly associated with abortive disorders. Experimental infections have shown that the challenged horses can develop depression, fever, and/or enteritis, and/or bronchopneumonia (Blinov, 1957; Zotov *et al.*, 1956). These findings support the hypothesis that horses may occasionally be sensitive to *C. burnetii* infection (Marenzoni *et al.*, 2013; Roest *et al.*, 2013b), but questions still remain about their potential role as a reservoir or as shedders. Although the bacteria's circulation among ruminants and horses does not always prefigure a human outbreak in the surrounding population, public authorities are interested in implementing reliable monitoring systems able to rapidly identify indicators of zoonotic risk, thereby improving Q fever control. Interestingly, horses are mostly located in urban and peri-urban areas at the interface between domestic ruminants and humans, while human Q fever infections are prevalent worldwide in rural, urban or peri-urban areas (Amitai *et al.*, 2010; Angelakis *et al.*, 2014; Armengaud *et al.*, 1997; Georgiev *et al.*, 2013; Schimmer *et al.*, 2010). A better understanding of *C. burnetii* circulation in and through the horse population is therefore needed to judge whether horses may be a relevant indicator of the bacteria's circulation in various peri-urban areas.

The objective of our work was to concomitantly assess: (i) the serological status of horses in a *C. burnetii* endemic area for both humans and ruminants; (ii) the presence of *C. burnetii* in the equine environment, including dust and ticks; (iii) the potential expression of clinical disease in horses and (iv) the link between seroprevalence in the horse population and the occurrence of Q fever in humans.

We carried out our study in Southeast France, a region known to be hyperendemic for human Q fever (*Fournier, 2014, 2015; Tissot-Dupont et al., 2004; Tissot-Dupont et al., 1999*). Indeed, between 2000 and 2009, this region had the highest national incidence of Q fever in humans, with 19 cases per 1 million inhabitants per year, compared to 7 cases in the rest of France (*Frankel et al., 2011*).

Methods

Field sampling

Study area. The study was carried out in Southeast France, in Camargue (West of the Rhône river mouth) and on the Plain of La Crau (East of the Rhône river mouth) from April 2015 to July 2016. This region was chosen for its high concentration in (i) livestock: mostly cattle in Camargue and small ruminants on the Plain of La Crau (*Agreste, 2010*) (ii) human cases historically diagnosed as *C. burnetii* infections and (iii) the density of horses living outdoors all year, even in peri-urban areas (*Figure 1*).

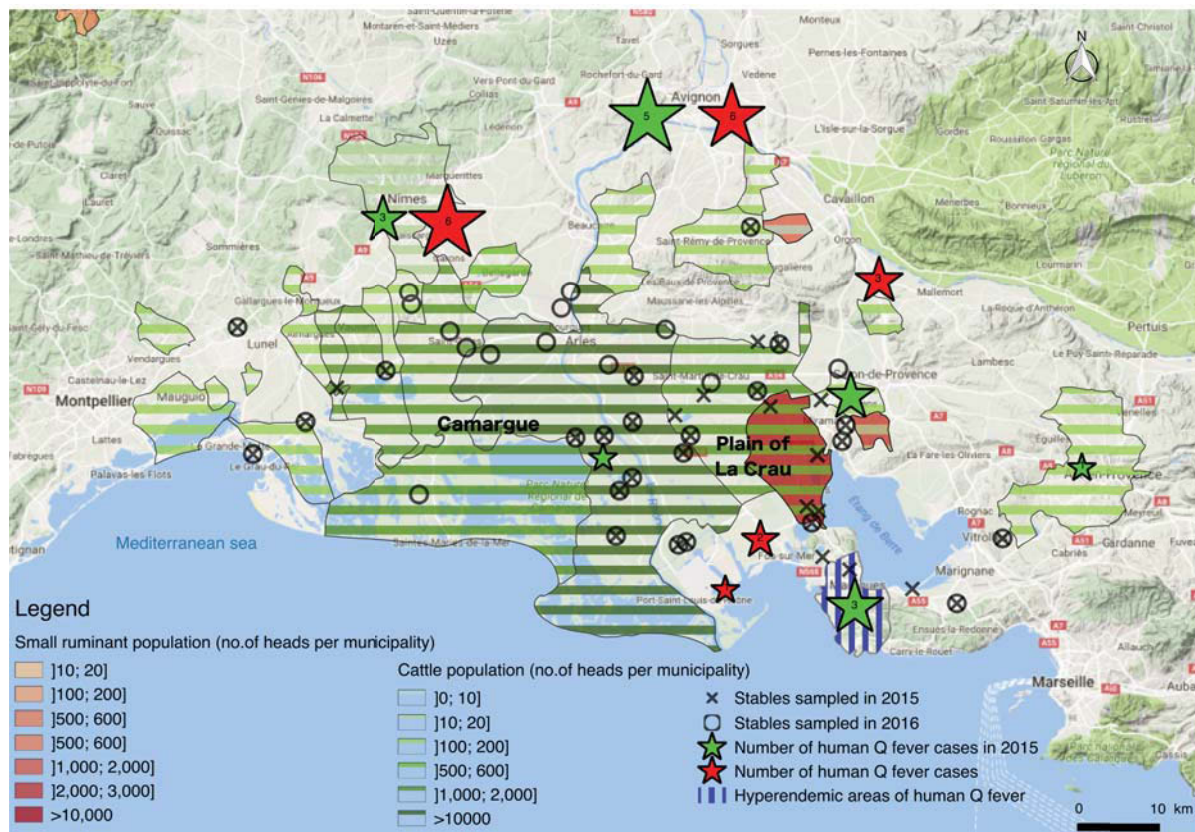


Figure 1 *art. 6* : Map showing the distribution of stables sampled in 2015 and 2016, the location where human cases were diagnosed during both years, and the number of ruminants according to the last agricultural census in France (2010)

Stable selection. Equine veterinarians practicing in the area were asked to provide a list of stables to include in the study, preferably where horses showed unexplained and chronic fever, chronic weight loss, abortions and/or unexplained respiratory disorders. Additional stables were selected based on their geographic location by targeting areas within a radius of 15 km of human cases reported by laboratories (*Figure 1*). Stables were located using a Global Positioning System (GPS) during the survey.

Sampling and data collection. The number of horses selected in each stable was chosen according to the size of the stable's horse population, as previously described (*Guidi et al., 2015*). A minimum of two and a maximum of 15 horses were sampled on the same location; they were at least one year old and had been housed within the stable for at least one year. Horses that had previously shown syndromes or clinical signs compatible with Q fever during the previous year were preferentially selected.

A volume of 18 ml of blood was collected from the jugular vein of each horse into dry and EDTA tubes; serum was recovered after centrifugation (10 minutes, 3000g) and frozen at -20°C. EDTA tubes were directly frozen at -20°C. Each horse sampled was examined for the presence of ticks and an average of five (from one to eight) attached but not engorged ticks were collected when present. All the ticks were kept alive during the field sampling period and, after morphological identification, were stored at -80°C.

A questionnaire was filled in with the owner to collect data on the individual characteristics of each horse (age, gender, activity), its health status (previous and current clinical signs, diagnostic tests and treatments) and stable management (contact with ruminants, deworming practices, tick and flea control).

Dust sampling. Dust was collected from (i) one horse shelter or box in each stable during the 2015 field campaign and (ii) the outdoor chute for ruminants bred on the farm, in both 2015 and 2016. Dust was sampled with a 16×10 cm swab cloth moistened with distilled water (SodiBox, France) and used to wipe horizontal surfaces in five distinct locations, as previously described (*Joulie et al., 2015*). All the dust samples were stored at 3°C during the field sampling period and afterwards at -80°C.

Human data. Data about the occurrence of human Q fever cases diagnosed in the study area were provided by the *Coxiella* National Reference Center (CNR), Marseille. The geographic location of patients corresponds to the address of the diagnostic laboratory where the human serum sample was tested for Q fever.

Laboratory analyses

Serology. All serum samples were tested using a commercial Q fever ELISA kit (LSIVet Ruminant Serum/Milk, Thermo Fisher Scientific) adapted to screen samples from various mammal species by replacing the ruminant-specific conjugate with a mixture of protein A and G peroxidase, which have a strong affinity for both small ruminants and horses (*Scientific, 2013*). The optical density (OD) values obtained were expressed in terms of “mean percentage of sample/positive” (S/P values) as recommended by the kit producer: $S/P\ value = (OD_{Sample} - OD_{Neg.control}) / (OD_{Pos.control} - OD_{Neg.control}) \times 100$. Positive and negative internal controls were included in each plate. Briefly, a collection of sheep (n=111) and goat (n=102) reference sera (144 true negative and 70 true positive sera) was used to determine the optimal seropositivity threshold of the multi-species ELISA test. This threshold was defined from a ROC curve and set to an S/P value of 43% (confidence interval 35-51%) using XLStat, trial version 2017.1. Horses were defined seropositive when $S/P > 43\%$ and seronegative when $S/P < 43\%$. We considered that a horse seroconverted when the S/P values varied from below to above the interval confidence between 2015 and 2016. A stable was considered seropositive when at least one of the horses sampled was seropositive.

Preparation of tick, dust and blood samples. Ticks were first identified morphologically using reliable identification keys and species descriptions (*Estrada-Pena et al., 2004; Pérez-Eid, 2007*) and then washed. As previously described (*Michelet et al., 2014*), the first wash was with 100% ethanol, followed by three consecutive washes with ultra-pure water. Ticks were then crushed using a Precellys homogenizer (Bertin Technologies, France) with two metal beads in 300 μ L of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, France) and 30 μ L of fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, France). DNA was immediately extracted from the tick homogenates.

Dust samples were suspended in 40 ml of PBS. After homogenization, 200 μ L of this suspension was mixed with 15 μ L of sheep fetal thymus (SFT) cells constituting internal controls for DNA extraction.

Whole blood samples recovered in EDTA tubes were used undiluted for extraction purposes.

DNA extraction and PCR assays. A DNA Purification QIAamp Mini kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) was used to extract DNA from both dust and tick samples. Blood samples were extracted using a NucleoSpin Blood L kit (Macherey Nagel, Hoerd, France). A real-time PCR method that targets the IS1111 and GAPDH genes was used to detect *Coxiella* and host cellular DNA respectively (*Joulie et al., 2015*) using a CFX96 thermocycler (Biorad, France). Briefly, tick and blood DNA extracts were analyzed undiluted and a volume of 0.1 μ L of

GAPDH DNA concentrated to 30 ng/μl was added to each sample as an inhibition control; the samples were considered positive from the regression mode of the Biorad CFX96 manager software. Dust DNA extracts were diluted to the 10th level and tested with reference to a calibrated standard based on serial dilutions of genomic DNA reference material prepared from the Nine Mile phase II RSA 493 isolate (ANSES Sophia-Antipolis, France). We considered as a limit of quantification per unit volume (LOQ) the lowest concentration of the Nine Mile standard (2.10³ genome equivalents per milliliter (GE/mL) corresponding to 8.10⁵ GE per swab cloth). A similar approach was used to estimate the maximum LOQ per unit volume (LOQ_{max}) using the highest concentration of the Nine Mile standard (5×10⁶ GE/ml corresponding to 2.10⁹ GE per swab cloth).

Data analyses. All statistical analyses were carried out in R (R version 3.1.0). Our alpha level for statistical significance was set at 0.05. The link between seropositivity of horses and contact with ruminants was studied with Pearson's chi-squared test, or a Fisher's exact test when one of the compared groups contained fewer than six horses. Maps were created with the Qgis software (version 2.8 'Wien').

Results

Overall, 37 stables were surveyed in 2015 and 39 in 2016, 24 of which were investigated both years (61.5%). In all, 338 and 294 horses were sampled between late April and mid-May 2015 and between late May and late June 2016 respectively. One hundred and ninety-nine (199) horses were sampled both years (68%). The study populations in both years were homogenous in terms of breed, sex and age. Indeed, six breeds were represented among all the horses sampled. Camargue horses were the most represented (n=140), but other purebred (n=59) and crossbred (n=103) horses were also included, as well as ponies (n=36). The sex distribution was 30% mares, 4% stallions and 66% geldings. The age varied from 1 to 32 years, with a mean age of 11 years.

Serological survey

Spatial distribution of seropositive stables. In all, 21 stables were distributed throughout the Camargue region (West of the Rhône river mouth) and 27 on the Plain of La Crau (East of the Rhône river mouth) (*Figures 1 and 2*). Of all these stables, 12 in 2015 (32%) and 21 in 2016 (54%) included at least one seropositive horse (*Figure 3*). The average proportion of seropositive horses per stable was 5% [3% – 7%] in 2015 and 14% [10% – 18%] in 2016. Of nine stables with between 30% and 50% of seropositive horses, three were located on the Plain of La Crau. The other six were located around the town of Arles (*Figure 2*). We found one

stable with more than 50% of seropositive horses (n=10), located in the southwestern part of the study area near the town of Le Grau-du-Roi. All these stables, except the one in the southwestern part, were close to areas where Q fever human cases had been diagnosed (*Figures 1 and 2*).

Twenty-one stables had ruminants in their environment (cattle for 43% and small ruminants for 19%). However, we found no association between horse seropositivity and contact with ruminants, whether direct (i.e. sharing the same pen as ruminants or being used for the working of bulls) or indirect.

Twenty-four stables were investigated both years. In these stables, the average proportion of seropositive horses per stable was 6% [3% – 9%] in 2015 and 15% [10% – 20%] in 2016.

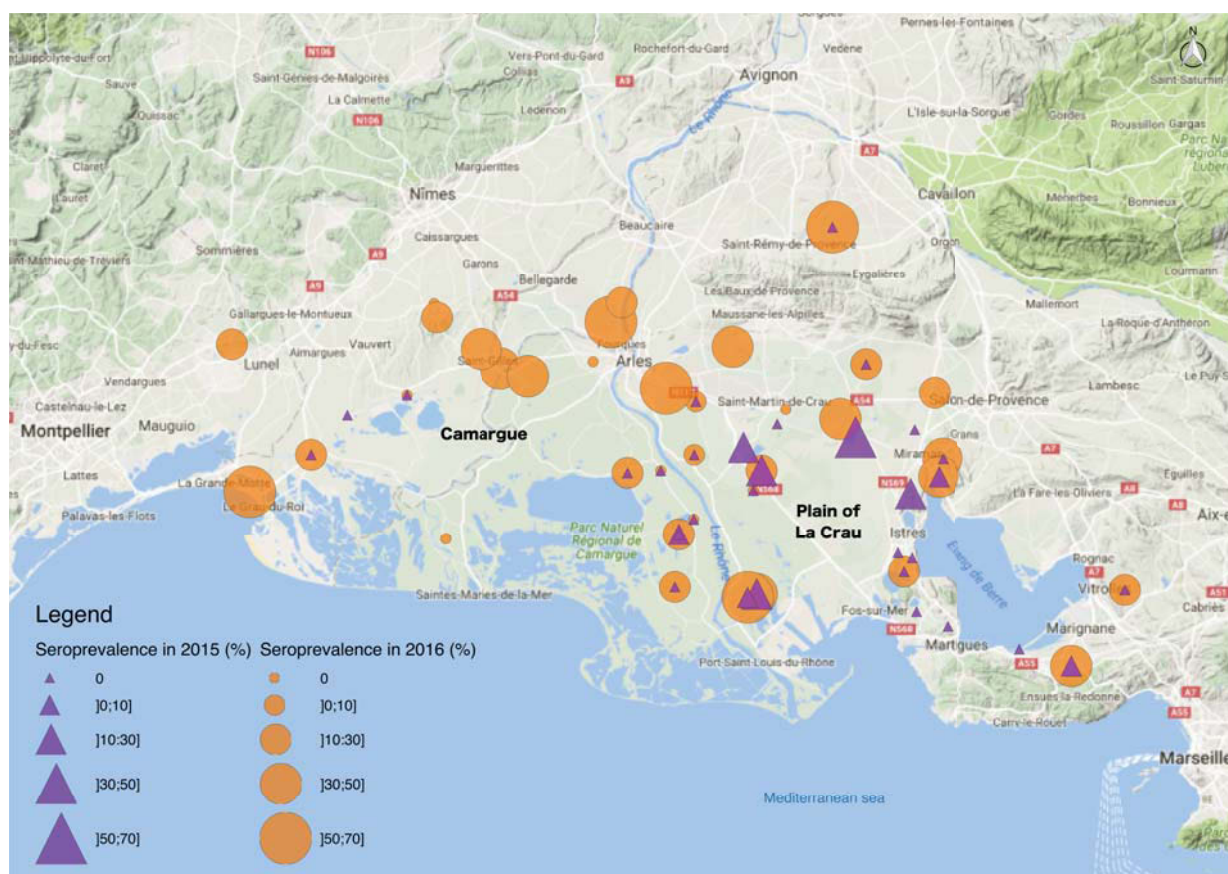


Figure 2 *art.6* : Map showing intra-stable seroprevalence in 2015 and 2016

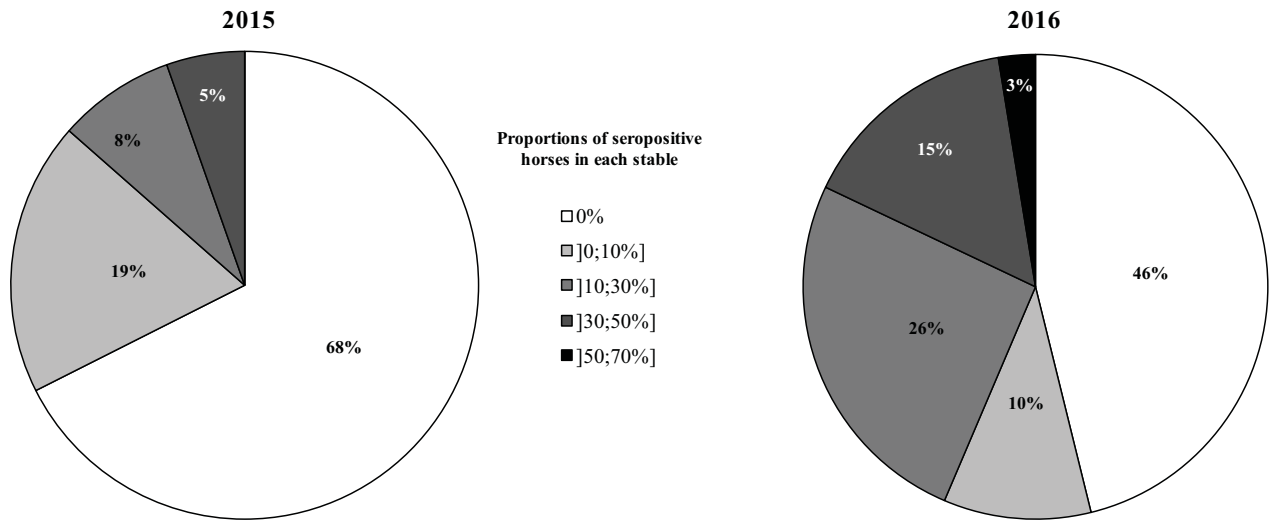


Figure 3 *art. 6* : Circular diagrams showing the distribution of intra-stable seroprevalence depending on the number of seropositive horses

Seropositivity in horses. Out of 338 horse sera tested in 2015 and 294 in 2016, 13 (4%) and 35 (12%) were seropositive respectively (*Figure 4a*). Positive S/P values found in 2015 ranged from 47.2 to 98.2 and from 43.3 to 223 in 2016. The seroprevalence observed tended to increase ($p=0.08$) in horses sampled both years ($n=199$), ranging from 5% [2% - 8%] in 2015 to 13% [8% - 18%] in 2016 (*Figure 4b*). Of these, 13 seroconverted in 2016 (7%); eight remained seropositive on the second year (14%), and one seroreverted (0.5%). The 13 horses that became positive between the two sampling years were located in 11 stables, seven on the Plain of La Crau and four in Camargue. Five of these 11 stables still included at least one seropositive horse in 2015.

None of the seropositive horses displayed clinical signs compatible with a *C. burnetii* infection during the year prior to blood sampling. Among the seronegative horses located in a stable including at least one seropositive horse, 14% ($n=6/44$) had clinical signs compatible with Q fever in 2015 compared to 10% ($n = 6/58$) in 2016. The corresponding clinical signs were mainly chronic fever and weight loss. In one of these nine stables, abortions and the birth of sickly foals were also observed.

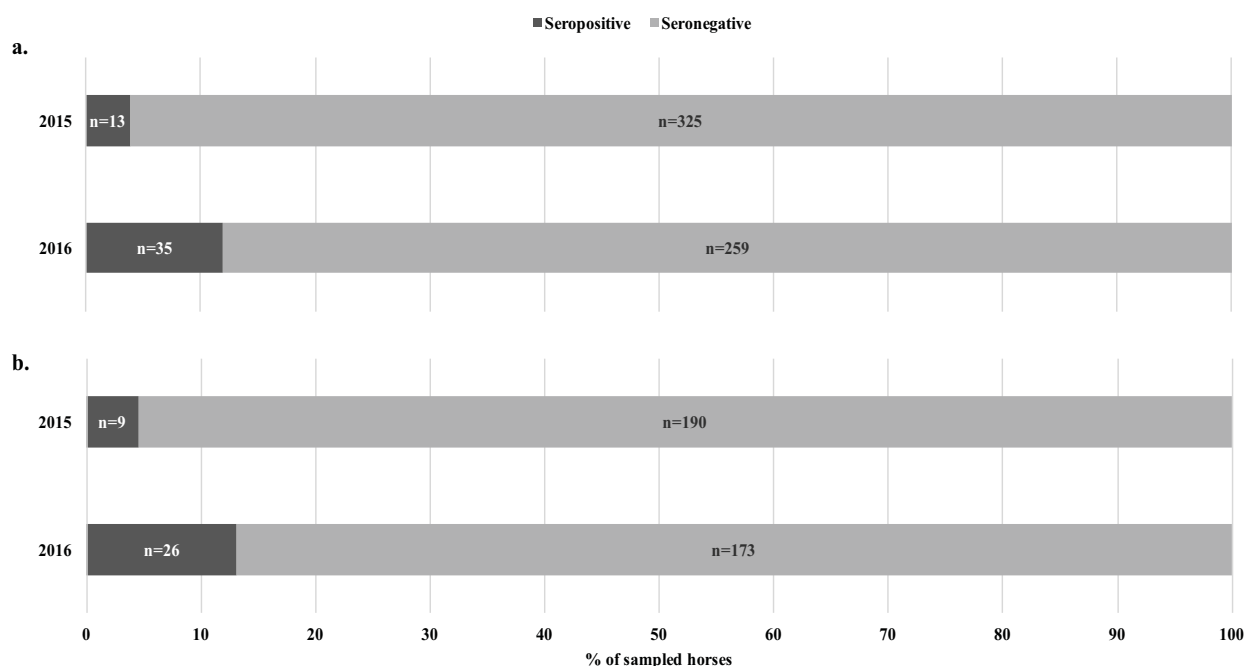


Figure 4 *art. 6* : Histograms showing in 2015 and 2016: (a) overall horse seroprevalence and (b) horse seroprevalence for those sampled in the two consecutive years

Coxiella burnetii DNA detection

Blood. All blood samples were negative by PCR.

Dust samples. *C. burnetii* DNA was detected in 3/46 and 1/14 of the dust samples collected in 2015 and 2016 respectively (Figure 5). In 2015, two of the three PCR-positive dust samples were harvested from ruminant pens, while the third was from a horse shelter. The highest bacterial burden (about 4.36×10^9 GE per swab cloth) was detected in dust samples collected from the same ruminant pen in 2015 and in 2016. Interestingly, all the positive dust samples were found on the Plain of La Crau (Figure 5).

Ticks. One hundred forty-nine ticks (111 *Rhipicephalus* spp., 24 *Haemaphysalis* spp., nine *Hyalomma* spp. and five *Dermacentor* spp.) collected on horses in 2015, and 305 (269 *Rhipicephalus* spp. and 36 *Hyalomma* spp.) in 2016 were analyzed by qPCR to detect *Coxiella* DNA (Table 1).

Overall, 40% (n=59/149) and 34% (n=104/305) of ticks collected in 2015 and 2016 respectively were found positive by qPCR (Table 1). *Coxiella* DNA was detected in *Rhipicephalus* spp., *Haemaphysalis* spp. and *Rhipicephalus* spp.

Positive ticks were mostly found in 14 stables with seropositive horses, including seven on the Plain of La Crau and seven in Camargue (Figures 2 and 5), but we did not observe any association between seropositive horses and positive ticks ($p > 0.05$).

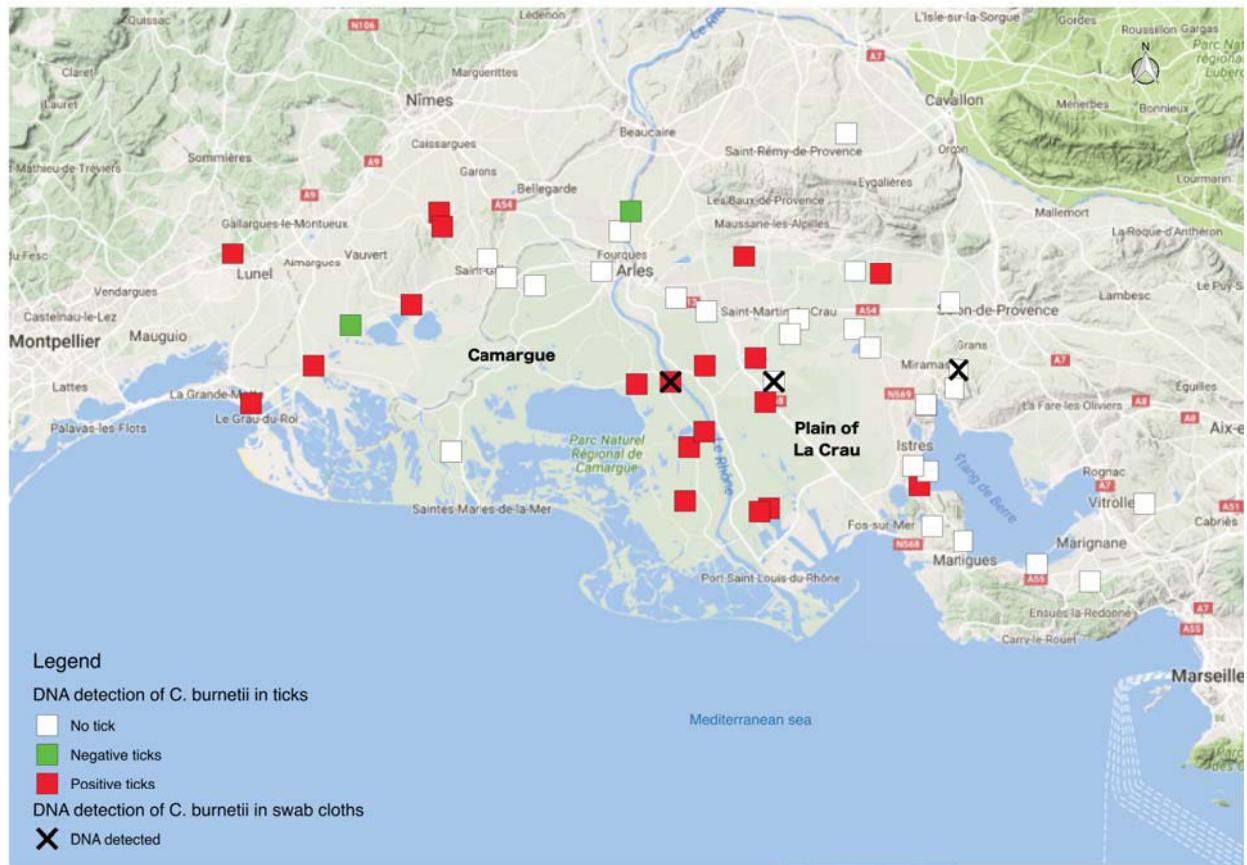


Figure 5 *art. 6* : Map showing the distribution of ticks and dust samples collected in 2015 and 2016

Table 1 *art. 6* : Number of positive and sampled ticks depending on their classification.

Tick classification	Sampling year			
	2015		2016	
Genus	No. of positive ticks	No. sampled	No. of positive ticks	
<i>Rhipicephalus spp.</i>	44	114	96	269
<i>Haemaphysalis spp.</i>	5	21	0	0
<i>Hyalomma spp.</i>	8	9	8	36
<i>Dermacentor spp.</i>	2	5	0	0
Total	59	149	104	305

Discussion

Main findings

Few studies have investigated the horse's potential role as a risk indicator for the transmission of Q fever to humans. This study first showed that horses were exposed to *C. burnetii* in a hyperendemic area for humans. Second, we observed an increase in horse seroprevalence in certain stables between 2015 and 2016, although this was not related to the observation of clinical signs compatible with chronic Q fever infections in seropositive horses. Finally, we reported that the bacteria of genus *Coxiella* was present in the equine environment, especially in dust where ruminants were housed or in ticks feeding on horses.

Serological studies in horses are scarce and difficult to compare

The use of a single ELISA kit for both sampling years allowed us to reliably compare our results for the two sampling periods. However, it is difficult to compare our results with other serological surveys conducted on horses (*Agerholm et al., 2015; George and Marrie, 1987; Martinov, 2007; Pitre, 1960*) due to heterogeneity in terms of specificity and sensitivity of the serological methods used (complement fixation, seroagglutination and ELISA using various bacterial strains as antigens). Moreover, information on the abortion periods in ruminants (main reservoirs), the age of sampled horses as well as on farm concentrations in the investigated areas are generally lacking.

Clinical signs of Q fever in horses are unknown

Clinical signs that we assumed to be compatible with Q fever disease in horses included chronic fever, weight loss of unknown origin, idiopathic lower respiratory disease, abortions and stillbirths, which are non-specific (*Smith, 2014*). Differential diagnosis comprises many other etiologies including piroplasmosis, leptospirosis, anaplasmosis, borreliosis, or gastro-intestinal parasitism. The final diagnosis of such chronic syndromes in horses represents a significant challenge to veterinary practitioners, but the cost of arriving at a clear diagnosis may be dissuasive to the owner.

Coxiella DNA is present in the equine environment

Two stables on the Plain of La Crau had positive dust samples. Interestingly, they are both in the specific area where most of the seropositive stables were found. The high density of sheep could be a source of environmental contamination just as could the Mistral wind (*Tissot-Dupont et al., 2004; Tissot-Dupont et al., 1999*). The topography of the landscape may also facilitate dissemination of the bacteria, especially along the Rhône River. A few studies have also demonstrated that *C. burnetii* detection is higher in soil due to its high resistance in the environment (*Maurin and Raoult, 1999; OIE, 2015; Tozer et al., 2014*). Therefore, it would be

beneficial in the future to investigate the presence of *C. burnetii* in horse litter through DNA detection.

A significant proportion of ticks found on horses were infected by bacteria of the *Coxiella* genus. However, the role of ticks in the transmission of *C. burnetii* is poorly understood (Duron *et al.*, 2015). Recent findings have shown that ticks may carry endosymbiotic bacteria genetically close to *C. burnetii* and named *Coxiella*-like bacteria (Duron *et al.*, 2015), which are potentially non-pathogenic for ruminants, humans or horses. Interestingly, these newly-discovered bacteria have also recently been described for the first time in horses (Seo *et al.*, 2016), thus confirming the possible circulation of *Coxiella* bacteria in the equine environment, including ticks, dust or soil samples (Tozer *et al.*, 2014). Furthermore, there is an important risk of misidentification, given that the current protocols for detecting *C. burnetii* in ticks depend on PCR-based detection of a multicopy gene, without subsequent confirmation by rRNA sequencing (Jourdain *et al.*, 2015; Seo *et al.*, 2016). Consequently, further investigations to distinguish *C. burnetii* from *Coxiella*-like bacteria should be conducted to better assess the exact role of ticks in Q fever epidemiology.

Horses could be sentinels for the circulation of the bacteria

A previous study reported the detection of *C. burnetii* in equine blood or urine by PCR, but in low burdens and a limited number of horses (Tozer *et al.*, 2014). In our study, antibodies against *C. burnetii* were frequently detected but no bacterial DNA could be amplified from horse blood. Although non-significant, our study suggested a slight increase in seroprevalence of horses between 2015 and 2016. Some horses seroconverted and others remained seropositive. This finding reflects the fact that the population sampled in 2016 was likely exposed or re-exposed to *C. burnetii* between the two sampling periods in the Camargue and Plain of La Crau regions. However, as in ruminants, antibody dynamics in horses is unknown (de Cremoux *et al.*, 2012b; Guatteo *et al.*, 2012; Rousset *et al.*, 2009). In humans, immunity persists for many years and re-vaccination is generally not recommended even if occasional relapses have been observed (ECDC, 2010).

The different locations of human cases appear to be consistent with the distribution of horse stables where we found high seroprevalence. Indeed, horses are a domestic species typically at the interface between infected domestic ruminants and humans, especially in the studied peri-urban areas. Thus, their role as sentinels for the risk of zoonosis should be further evaluated in the case of Q fever.

Perspectives

In this study, we showed that horses were particularly exposed to *C. burnetii* and potentially to *Coxiella*-like bacteria in an area of high horse density and regular reports of human cases. Therefore, horses could be a relevant indicator of *C. burnetii* circulation in areas at risk for humans. Findings so far warrant further studies to fully assess the clinical consequences of Q fever in horses, the proportion of symptomatic infections and shedders, and their role as a potential reservoir of the bacteria. Thus, if clinical signs of Q fever were confirmed, ultimately horses could be used as a relevant serological or clinical sentinel species for public health needs.

Ethics statement

Each owner signed an informed consent document which exposed the main results expected and the confidentiality of all the information collected (protected by the French National Commission of Information Technology and Liberties, agreement number 1822460). The sampling protocols were submitted to and validated by the ethics committee of VetagroSup (National Veterinary School of Lyon, France), agreement number 1534.

Acknowledgments

This study was financed by the French Horse and Riding Institute, IFCE, and the EPERON fund (Encouragement aux Projets Equestres Régionaux Ou Nationaux). We would like to thank Aurore Fourcot and Louis Szukalowksi from France's National Institute for Agricultural Research (INRA Auvergne-Rhône-Alpes) and Sara Sardi and Camille Belle from VetAgroSup for their involvement in field sampling in Camargue and on the Plain of La Crau. We are also grateful to Séverine Barry and Valérie Poux from INRA Auvergne-Rhône-Alpes, and Frédéric Stachurski from the French Agricultural Research Center for Development, CIRAD Montpellier, for tick collection and identification, and for their help in PCR analysis.

References

- Agerholm, J.S., Svejstrup, C.A., Christoffersen, A.B., Agger, J.F.G., 2015. Apparent seroprevalence for *Coxiella burnetii* in the Danish horse population. *Dansk Veterinaertidsskrift* 98, 26-29.
- Agreste, 2010. Agricultural census 2010.
- Amitai, Z., Bromberg, M., Bernstein, M., Raveh, D., Keysary, A., David, D., Pitlik, S., Swerdlow, D., Massung, R., Rzotkiewicz, S., Halutz, O., Shohat, T., 2010. A large Q

- fever outbreak in an urban school in Central Israel. *Clinical Infectious Diseases* 50, 1433-1438.
- Angelakis, E., Mediannikov, O., Socolovschi, C., Mouffok, N., Bassene, H., Tall, A., Niangaly, H., Doumbo, O., Znazen, A., Sarih, M., Sokhna, C., Raoult, D., 2014. *Coxiella burnetii*-positive PCR in febrile patients in rural and urban Africa. *International Journal of Infectious Diseases* 28, 107-110.
- Armengaud, A., Kessalis, N., Desenclos, J.C., Maillot, E., Brousse, P., Brouqui, P., Obadia, Y., 1997. Urban outbreak of Q fever, Briançon, France, March to June 1996. *Eurosurveillance* 2, 12-13.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., Garcia-Perez, A.L., 2011. Four-year evaluation of the effect of vaccination against *Coxiella burnetii* on reduction of animal infection and environmental contamination in a naturally infected dairy sheep flock (vol 77, pg 7405, 2011). *Applied and Environmental Microbiology* 77, 8799.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Crochet, D., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2001. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Veterinary Record* 148, 502-505.
- Blinov, P.N., 1957. Experimental Q fever in horses. 34, 34-40.
- de Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicollet, P., Ribaud, D., David, V., Le Pape, M., 2012a. Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii*-inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 64, 104-106.
- de Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicollet, P., Ribaud, D., David, V., Le Pape, M., 2012b. *Coxiella burnetii* vaginal shedding and antibody responses in dairy goat herds in a context of clinical Q fever outbreaks. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 64, 120-122.
- Duron, O., Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Moutailler, S., Jourdain, E., 2015. The importance of ticks in Q fever transmission: what has (and has not) been demonstrated? *Trends Parasitol* 31, 536-552.
- ECDC, 2010. (European Centre for Disease Prevention and Control) Panel with representatives from the Netherlands, France, Germany, UK, United States. Asher, A., Bernard, H., Coutino, R., Durat, G., De Valk, H., Desenclos, J-C., Holmberg, J., Kirkbridge, H., More, S., Scheenberger, P., van der Hoek, W., van der Poel, C., van Steenbergen, J., Villanueva, S., Coulombier, D., Forland, F., Giesecke, J., Jansen, A., Nilsson, M.,

- Guichard, C., Mailles, A., Pouchol, E., Rousset, E. 2010. Risk assessment on Q fever. ECDC Technical report. [40 pp.]. doi:10.2900/28860. May. Available online: www.ecdc.europa.eu.
- EFSA, 2010. Contributors: More, S., Stegeman, J. A., Rodolakis, A., Roest, H-J., Vellema, P., Thiéry, R., Neubauer, H., van der Hoek, W., Staerk, K., Needham, H., Afonso, A., Georgiev, M., Richardson, J. Scientific opinion on Q Fever. EFSA 1723, 280.
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., Mege, J.L., Maurin, M., Raoult, D., 2017. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. Clinical Microbiology Reviews 30, 15-190.
- Estrada-Pena, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R., 2004. Ticks of domestic animal in the Mediterranean region: A guide to identification of species. University of Zaragoza, Spain, 131 p. p.
- Fournier, P.E., 2014. Activity report 2014. National reference center of Rickettsies, *Coxiella*, *Bartonella*.
- Fournier, P.E., 2015. Activity report 2015. National reference center of Rickettsies, *Coxiella*, *Bartonella*.
- Frankel, D., Richet, H., Renvoise, A., Raoult, D., 2011. Q fever in France, 1985-2009. Emerging Infectious Diseases 17, 350-356.
- George, J., Marrie, T.J., 1987. Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in horses in Atlantic Canada. The Canadian veterinary journal 28, 425.
- Georgiev, M., Afonso, A., Neubauer, H., Needham, H., Thiery, R., Rodolakis, A., Roest, H.J., Stark, K.D., Stegeman, J.A., Vellema, P., van der Hoek, W., More, S.J., 2013. Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982 to 2010. Eurosurveillance 18, 13-25.
- Gonzalez-Barrio, D., Maio, E., Vieira-Pinto, M., Ruiz-Fons, F., 2015. European rabbits as reservoir for *Coxiella burnetii*. Emerging Infectious Diseases 21, 1055-1058.
- Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2012. Shedding and serological patterns of dairy cows following abortions associated with *Coxiella burnetii* DNA detection. Veterinary Microbiology 155, 430-433.
- Guidi, E., Pradier, S., Lebert, I., Leblond, A., 2015. Piroplasmosis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of Theileriosis and Babesiosis in horses. Parasitology Research 114, 71-83.

- Joshi, M.V., Padbidri, V.S., Rodrigues, F.M., Gupta, N.P., 1978. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection among humans and domestic animals of Rajasthan State, India. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology* 23, 67-73.
- Joulié, A., Laroucau, K., Bailly, X., Prigent, M., Gasqui, P., Lepetitcolin, E., Blanchard, B., Rousset, E., Sidi-Boumedine, K., Jourdain, E., 2015. Circulation of *Coxiella burnetii* in a naturally infected flock of dairy sheep: shedding dynamics, environmental contamination, and genotype diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 7253-7260.
- Jourdain, E., Duron, O., Barry, S., González-Acuña, D., Sidi-Boumedine, K., 2015. Molecular methods routinely used to detect *Coxiella burnetii* in ticks cross-react with *Coxiella*-like bacteria. *Infection Ecology & Epidemiology* 5, 29230.
- Karagiannis, I., Schimmer, B., Van Lier, A., Timen, A., Schneeberger, P., Van Rotterdam, B., De Bruin, A., Wijkman, C., Rietveld, A., Van Duynhoven, Y., 2009. Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of The Netherlands. *Epidemiology and Infection* 137, 1283-1294.
- Khaled, H., Sidi-Boumedine, K., Merdja, S., Dufour, P., Dahmani, A., Thiéry, R., Rousset, E., Bouyoucef, A., 2016. Serological and molecular evidence of Q fever among small ruminant flocks in Algeria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 19-25.
- Lang, G.H. 1990. Coxiellosis (Q fever) in animals, In: Marrie, T.J. (Ed.) Q FEVER : Volume 1 The Disease. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida USA, 23-48.
- Leon, A., Richard, E., Fortier, C., Laugier, C., Fortier, G., Pronost, S., 2012. Molecular detection of *Coxiella burnetii* and *Neospora caninum* in equine aborted fetuses and neonates. *Preventive Veterinary Medicine* 104, 179-183.
- Marenzoni, M.L., Stefanetti, V., Papa, P., Proietti, P.C., Bietta, A., Coletti, M., Passamonti, F., Henning, K., 2013. Is the horse a reservoir or an indicator of *Coxiella burnetii* infection? Systematic review and biomolecular investigation. *Veterinary Microbiology* 167, 662-669.
- Martinov, S., 2007. Contemporary state of the problem Q fever in Bulgaria. *BIOTECHNOL. & BIOTECHNOL. EQ*, 353-361.
- Maurin, M., Raoult, D.F., 1999. Q fever. *Clinical microbiology reviews* 12, 518-553.
- Michelet, L., Delannoy, S., Devillers, E., Umhang, G., Aspan, A., Juremalm, M., Chirico, J., van der Wal, F.J., Sprong, H., Pihl, T.P.B., Klitgaard, K., Bodker, R., Fach, P.,

- Moutailler, S., 2014. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4.
- Nett, R.J., Book, E., Anderson, A.D., 2012. Q Fever with unusual exposure history: a classic presentation of a commonly misdiagnosed disease. *Case reports in infectious diseases* 2012, 916142.
- OIE, 2015. Contributors: Rousset, E., Sidi-Boumedine, K. Q fever. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)* OIE.
- Palmela, C., Badura, R., Valadas, E., 2012. Acute Q fever in Portugal. *Epidemiological and clinical features of 32 hospitalized patients. Germs* 2, 43.
- Pérez-Eid, C., 2007. Les tiques - Identification, biologie, importance médicale et vétérinaire (Collection: Monographies de microbiologie). Tec et Doc, Editions médicales (Lavoisier), 314 p. p.
- Pitre, J., 1960. Rickettsial infections of cattle and horses in Calvados, France. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 33, 459-462.
- Raseta, B., Mihajlovic, B., 1983. Q-fever in domestic animals in the province of Vojvodina. *Veterinarski Glasnik* 37, 695-704.
- Roest, H.I.J., van Solt, C.B., Tilburg, J.J.H.C., Klaassen, C.H.W., Hovius, E.K., Roest, F.T.F., Vellema, P., van den Brom, R., van Zijderveld, F.G., 2013. Search for possible additional reservoirs for human Q fever, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 19, 834-835.
- Rousset, E., Berri, M., Durand, B., Dufour, P., Prigent, M., Delcroix, T., Touratier, A., Rodolakis, A., 2009. *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 428-433.
- Runge, M., Hilbert, A., Henning, K., 2012. Contribution to the occurrence of *Coxiella burnetii*-infection in horses. *Praktische Tierarzt* 93, 220-222.
- Schimmer, B., ter Schegget, R., Wegdam, M., Zuchner, L., de Bruin, A., Schneeberger, P.M., Veenstra, T., Vellema, P., van der Hoek, W., 2010. The use of a geographic information system to identify a dairy goat farm as the most likely source of an urban Q-fever outbreak. *BMC Infectious Diseases* 10, 7.
- Scientific, T. 2013. Binding characteristics of antibody-binding proteins: Protein A, Protein G, Protein A/G and Protein L, Inc., T.F.S., ed.

- Seo, M.G., Lee, S.H., VanBik, D., Ouh, I.O., Yun, S.H., Choi, E., Park, Y.S., Lee, S.E., Kim, J.W., Cho, G.J., Kwon, O.D., Kwak, D., 2016. Detection and genotyping of *Coxiella burnetii* and *Coxiella*-like bacteria in horses in South Korea. Plos One 11.
- Smith, B.P., 2014. Large animal internal medicine. Elsevier Health Sciences.
- Stein, A., Raoult, D., 1999. Pigeon pneumonia in Provence: a bird-borne Q fever outbreak. Clinical Infectious Diseases 29, 617-620.
- Sun, W.W., Cong, W., Li, M.H., Wang, C.F., Shan, X.F., Qian, A.D., 2016. *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk Factors in cattle farmers and farm residents in three Northeastern provinces and inner Mongolia autonomous region, China. Biomed Research International.
- Tissot-Dupont, H., Amadei, M.A., Nezri, M., Raoult, D., 2004. Wind in November, Q fever in December. Emerging Infectious Diseases 10, 1264-1269.
- Tissot-Dupont, H., Torres, S., Nezri, M., Raoult, D., 1999. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. American Journal of Epidemiology 150, 67-74.
- Tozer, S.J., Lambert, S.B., Strong, C.L., Field, H.E., Sloots, T.P., Nissen, M.D., 2014. Potential animal and environmental sources of Q fever infection for humans in Queensland. Zoonoses and Public Health 61, 105-112.
- Van den Brom, R., Schimmer, B., Schneeberger, P.M., Swart, W.A., van der Hoek, W., Vellema, P., 2013. Seroepidemiological survey for *Coxiella burnetii* antibodies and associated risk factors in Dutch livestock veterinarians. Plos One 8.
- Zotov, A.P., Chumakov, M.P., Markov, A.A., Stepanova, N.I., Petrov, A.N., 1956. The experimental reproduction of Q-fever and serological studies. Veterinariya, 44-53.

Principaux résultats

- ✚ Les **séroprévalences** observées en **2015** et **2016** sont de **4%** et **10%**, respectivement.
- ✚ Sur les 299 chevaux échantillonnés les deux années, **13 ont séroconverti**, ce qui suggère une **exposition récente à la bactérie**.
- ✚ Les **chevaux séropositifs** sont majoritaires **dans les zones où des cas humains de fièvre Q** ont été diagnostiqués ces dernières années.
- ✚ En moyenne, **10% des chevaux séronégatifs** et **aucun séropositif** présentent des **signes cliniques compatibles** à une infection par *C. burnetii*.
- ✚ L'ADN de *C. burnetii* a été détecté dans **40% des tiques** échantillonnées.
- ✚ L'ADN de *C. burnetii* a été détecté dans **5% des échantillons de poussières** réalisés dans les écuries investiguées.

CHAPITRE V

DISCUSSION GENERALE
PERSPECTIVES

V.1 Synthèse des résultats

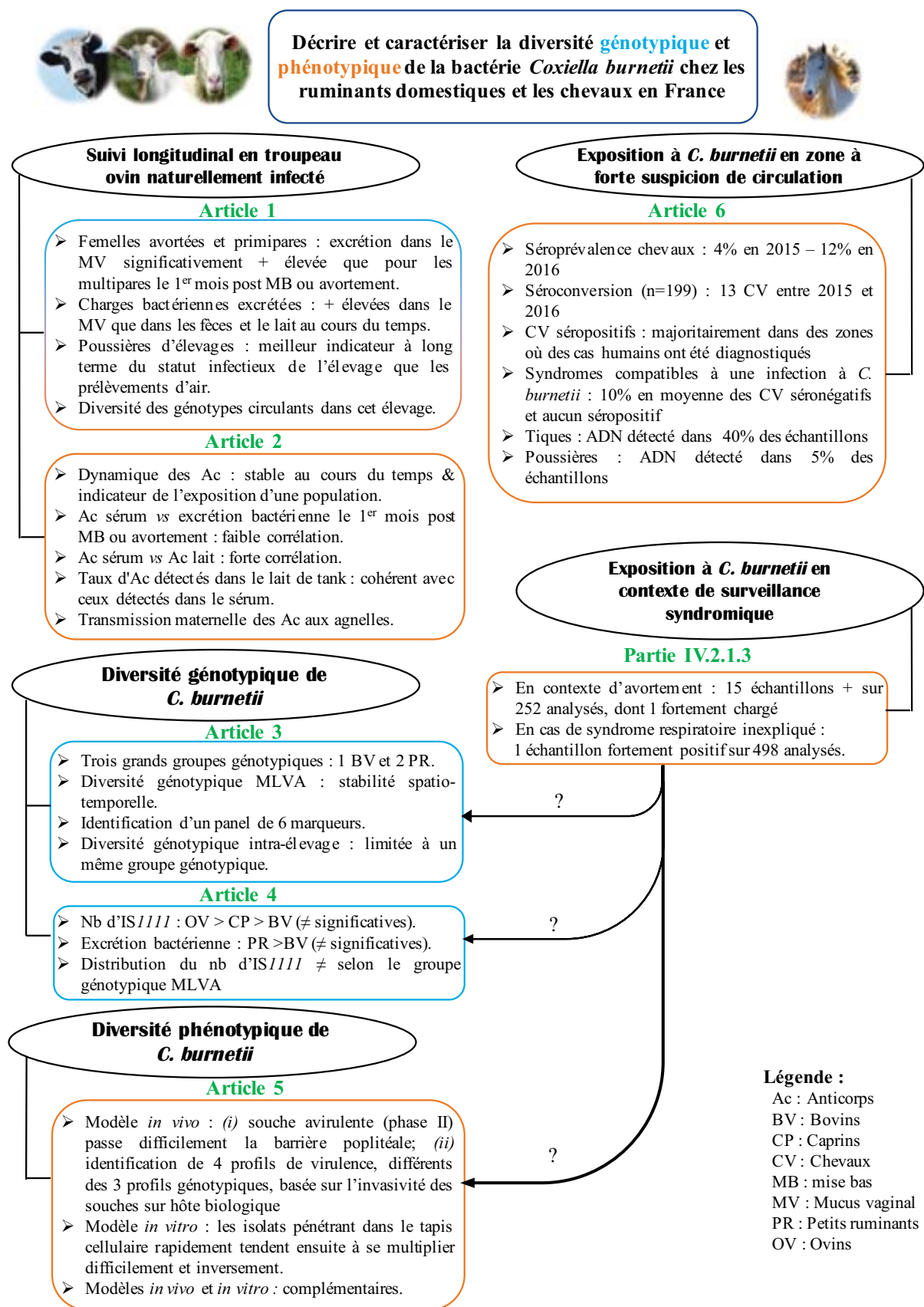


Figure 8 : Schéma récapitulatif des principaux résultats présentés dans ce manuscrit

V.2 Enjeu de santé publique et vétérinaire : nécessité des suivis longitudinaux pour une meilleure compréhension de la circulation de *Coxiella burnetii* en élevage

V.2.1 Évaluer le statut d'un troupeau via le suivi des femelles infectées

Le nombre très limité de suivis de cohorte en élevage est principalement dû à une mise en place fastidieuse et coûteuse. En effet, les conditions de terrain rendent complexe l'adaptation des protocoles expérimentaux aux conditions de productions choisies par les éleveurs. Pourtant, seul ce type de suivi permet de mieux comprendre la circulation des pathogènes dans les troupeaux et éventuellement la dynamique d'excrétion des femelles infectées. Ces suivis permettent également d'identifier des indicateurs pertinents à utiliser pour le diagnostic des maladies infectieuses en élevages et d'adapter les mesures de lutte dans les troupeaux, en réponse à des enjeux de santé publique et vétérinaire.

Dans le cas de la fièvre Q, les suivis longitudinaux mis en place en élevages bovins (Barlow et al., 2008; Guatteo et al., 2006a), ovins (Astobiza et al., 2010; Berri et al., 2005; Joulie et al., 2015; Joulie et al., 2017) et caprins (de Cremoux et al., 2012a, b; Rousset et al., 2009) ont permis d'identifier les lots de femelles à prélever (avortées vs non-avortées, primipares vs multipares en fonction de leur âge) ; les matrices les plus pertinentes à utiliser (mucus vaginal, fèces, lait ou sang) ; les méthodes d'analyses à choisir pour une détection rapide, fiable et peu coûteuse de la bactérie (outils de biologie moléculaire vs sérologiques) et les périodes de prélèvements les plus appropriées (24h post-mise bas ou avortement pour optimiser la détection de la bactérie par PCR, durées d'excrétion ou de détection des anticorps selon les matrices pour des suivis épidémiologiques).

V.2.2 Évaluer le statut d'un troupeau via les contaminations environnementales

Les suivis longitudinaux sont également nécessaires pour évaluer la persistance de *C. burnetii* dans l'environnement des élevages de ruminants infectés. En effet, ces prélèvements peuvent s'avérer essentiels pour identifier rapidement et à moindre coût la potentiel infectieux d'un troupeau. En élevages de ruminants, le statut d'un troupeau vis-à-vis de la fièvre Q a été évalué sur un large panel d'élevages cliniquement ou non cliniquement atteints à partir de la charge bactérienne détectée dans les poussières des bâtiments d'élevage (Carrie, 2016). La détection de l'ADN de *C. burnetii* était significativement plus fréquente dans les élevages cliniquement atteints que non cliniquement atteints (modèle multivarié). Précédemment, des études ont également suggéré une fréquence de détection et des niveaux de charges bactériens plus élevés

dans les poussières d'élevages chez les caprins (Reichel et al., 2012) ou chez les ovins (article 1) que chez les bovins (Bielawska-Drozd et al., 2014; Pinero et al., 2015).

Une étude aux Pays-Bas a également montré que la fréquence de détection de l'ADN de *C. burnetii* dans les aérosols d'élevages infectés (lait de tank PCR positif) était plus élevée que dans les élevages non infectés (de Bruin et al., 2012) et de la même façon dans les fumiers et les litières d'élevages caprins infectés (van den Brom et al., 2015a). Toutefois, les tentatives d'isolement de *C. burnetii* à partir de ce type de prélèvement n'ont à ce jour que très rarement fonctionnées (Kersh et al., 2016), suggérant une fraction importante de bactéries non-viables dans ce type de matrice.

Une des limites de l'utilisation des prélèvements environnementaux réside dans le choix de la méthode de détection pour évaluer le statut vis-à-vis de la fièvre Q d'un élevage. A ce jour, la méthode PCR utilisée pour la détection de l'ADN de *C. burnetii* dans l'environnement des ruminants ou des chevaux ne permet pas de différencier la proportion de bactéries mortes ou vivantes. Comme nous l'avons suggéré au paragraphe III.3.2 (article 5), il est cependant possible d'utiliser un intercalant PCR (EMA ou PMA) pour marquer les cellules mortes. Il est également possible d'inoculer des suspensions bactériennes obtenues à partir d'échantillons environnementaux à des souris (Kersh et al., 2013; Kersh et al., 2010) ou par passage sur cultures cellulaires (van den Brom et al., 2015a). Bien que fastidieuses à mettre en œuvre, ces méthodes sont des étapes indispensables pour déterminer la fraction de bactéries vivantes dans un prélèvement environnemental et ainsi le potentiel infectieux des souches circulantes dans l'environnement des élevages.

Ces différentes approches, aussi bien en élevages bovins qu'en élevages de petits ruminants, suggèrent donc la possibilité d'utiliser les prélèvements environnementaux comme des outils complémentaires permettant d'aider à la caractérisation du statut d'un troupeau vis-à-vis de la fièvre Q et ainsi du risque d'infection. Toutefois, la diversité des stratégies d'échantillonnage, du matériel utilisé pour la réalisation des prélèvements ou encore les méthodes de biologie moléculaires utilisées complexifient les comparaisons en termes de charges bactériennes détectées entre les différentes études (de Bruin et al., 2012). Il est donc nécessaire de mettre au point des méthodes plus standardisées pour évaluer précisément la pathogénicité et la viabilité des bactéries trouvées dans les prélèvements environnementaux. Bien que certaines perspectives soient encourageantes, une harmonisation des méthodes de prélèvements et d'analyses est nécessaire avant d'envisager la généralisation de ce type de prélèvements pour la détermination du statut d'un élevage vis-à-vis de la fièvre Q.

Enfin, les suivis longitudinaux permettent aussi d'avoir un aperçu de la diversité génotypique des souches circulantes en intra-élevage. Toutefois, sommes-nous confrontés à une réelle diversité des souches ou uniquement une variabilité relative des génotypes d'un même groupe génotypique ? A partir de quel « seuil » de marqueurs MLVA peut-on considérer que les profils génotypiques obtenus sont différents ?

V.3 Enjeu socio-économique : nécessité d'optimiser la caractérisation génotypique et phénotypique des souches de *Coxiella burnetii* afin d'adapter les mesures de lutte

V.3.1 Caractérisation génotypique

Nos résultats sont en faveur d'une diversité MLVA des souches d'origine animales circulantes dans les élevages de ruminants domestiques en France, avec des spécificités en termes d'espèces hôtes et de zone géographique. Néanmoins, les comparaisons entre le peu d'études disponibles sont difficiles en raison d'un manque de « standards ». En effet, il est urgent d'uniformiser les analyses afin que chaque nouvelle étude puisse compléter les données déjà existantes, comme certains auteurs l'ont d'ores-et-déjà suggéré (Frangoulidis et al., 2014; Prigent et al., 2015; Sidi-Boumedine and Rousset, 2011).

Une meilleure caractérisation des souches est également indispensable pour identifier les co-infections à l'échelle individuelle ou en intra-troupeau. En effet, bien que jamais décrites chez *C. burnetii* à ce jour, les co-infections pourraient limiter l'efficacité des mesures de lutte envisagées. Ces co-infections pourraient également se manifester par une diminution de l'immunité vaccinale ou le développement de résistances aux traitements. Une meilleure connaissance de la circulation des souches dans les élevages permettra donc de mieux comprendre les manifestations cliniques observées sur le terrain : excrétion plus élevée, avortements plus nombreux, développement d'une immunité plus forte chez certaines femelles. De même, ces connaissances sont indispensables pour adapter la spécificité des outils de diagnostic moléculaire ou sérologique. En effet, il est nécessaire de développer des protocoles peu coûteux et facilement utilisables en routine sur des échantillons de terrain afin d'identifier rapidement les souches circulantes dans l'environnement. Une approche One Health permettrait ainsi *in fine* de limiter le risque zoonotique en adaptant les mesures de lutte aux souches détectées tout en limitant les coûts pour les éleveurs. Toutefois, cette approche ne peut être mise en place qu'en ayant *a priori* une connaissance en santé publique et vétérinaire de la virulence des souches circulantes dans l'environnement.

V.3.2 Caractérisation phénotypique

Nos résultats ont montré à partir des deux modèles de virulence choisis une diversité phénotypique en termes de virulence entre les isolats testés.

L'analyse de l'invasivité des isolats *in vivo* sur souris a permis d'identifier quatre groupes phénotypiques. La méthode d'inoculation en *footpad* développée dans notre modèle de virulence semble plus discriminante que la méthode en intrapéritonéale classiquement utilisée sur souris. En effet, notre modèle permet une différenciation des isolats en phase I (virulents) et en phase II (avirulents) lorsque *C. burnetii* est quantifiée dans la rate des souris. Ainsi, nous suggérons pour de futures études de privilégier ce modèle pour l'évaluation de la virulence des isolats.

In vitro, des différences entre les souches ont également été observées, en s'inspirant du modèle développé et déjà publié par Mori et al. (2015). Il serait éthiquement plus adapté car en faveur d'une réduction de l'utilisation du nombre d'animaux de laboratoire comparativement au modèle *in vivo*. Néanmoins, nos résultats suggèrent de mieux développer ce modèle sur lignées macrophagiques du fait qu'il soit complémentaire du modèle sur souris mais non substitutif.

Il serait également intéressant de tester la virulence des isolats prélevés sur le terrain à partir d'autres espèces animales que les ruminants domestiques. En effet, dans le cadre de ce travail de thèse, deux échantillons collectés sur des chevaux présentant des troubles de la reproduction ou des syndromes respiratoires inexpliqués ont été trouvés fortement positifs par qPCR. Une des perspectives de ce projet sera de réaliser les mêmes protocoles d'isolement et de virulence décrits dans ce manuscrit à partir de ces deux échantillons afin de comparer les profils génotypiques et phénotypiques avec ceux obtenus à partir d'isolats provenant de ruminants domestiques.

V.4 Enjeu épidémiologique : nécessité de mieux identifier les espèces animales exposées à *Coxiella burnetii*

V.4.1 Le cheval, une espèce exposée

L'étude exploratoire réalisée chez cheval dans le cadre ce travail de thèse confirme une exposition de l'espèce équine à *C. burnetii*. En effet, les analyses sérologiques et moléculaires réalisées à partir de différentes matrices prélevées chez des chevaux potentiellement infectés par *C. burnetii* soutiennent cette hypothèse. Néanmoins, nous suggérons de réaliser des études

complémentaires afin de mieux évaluer le rôle d'excréteur voire de réservoir du cheval dans l'épidémiologie de la fièvre Q.

Les formes cliniques associées à la fièvre Q restent méconnues chez cette espèce et sont probablement exceptionnelles. D'autant que les potentiels syndromes (avortements ou respiratoires), même s'ils sont associés à une détection de *C. burnetii*, peuvent être d'étiologies variées. De plus, il serait également intéressant d'investiguer plus précisément les affections cardiaques, les problèmes d'infertilité tels que les métrites, ou encore les hépatites chroniques. Ces affections sont classiquement diagnostiquées chez l'Homme (Million et al., 2009) et occasionnellement chez les ruminants domestiques (Agerholm, 2013). En effet, les organes cibles de *C. burnetii* chez une espèce ne se retrouvent pas systématiquement à l'identique chez une autre.

L'objectif à termes serait de déterminer si les chevaux, bien qu'exposés au pathogène, sont strictement asymptomatiques ou si des formes cliniques peuvent aussi être observées plus précocement que chez l'Homme.

V.4.2 D'autres espèces animales sont potentiellement exposées

De nombreux exemples dans la littérature ont montré l'exposition d'autres espèces animales à *C. burnetii* (Gonzalez-Barrio et al., 2015; Lang, 1990; Roest et al., 2013b; Tozer et al., 2014). Néanmoins, leur rôle en tant que potentiels réservoirs voire comme sources de contamination de l'environnement n'a été que partiellement évalué (Angelakis and Raoult, 2010; Gonzalez-Barrio et al., 2015; Lang, 1990). Pourtant, des investigations complémentaires, à l'image des études que nous avons réalisées chez les chevaux, sont primordiales afin de mieux comprendre le rôle de ces espèces animales dans l'épidémiologie de la fièvre Q. C'est le cas en particulier, pour des espèces tels que les petits carnivores de compagnie qui se situent typiquement à l'interface entre les ruminants domestiques et l'Homme, spécifiquement dans les élevages. Selon le contexte épidémiologique, ces espèces pourraient potentiellement constituer des sentinelles pertinentes pour l'Homme.

V.5 Vers une meilleure surveillance pour une gestion intégrée de la maladie

Le dispositif de surveillance événementielle de la fièvre Q chez les ruminants domestiques mis en place en septembre 2012, pour une durée de trois ans, dans dix départements pilotes a permis de mieux connaître la situation épidémiologique de cette maladie sur le territoire. L'objectif principal de cette surveillance en élevage de ruminants était d'évaluer la proportion d'élevages

considérés comme « cliniquement atteints de fièvre Q », parmi les élevages présentant des avortements répétés chez les trois espèces de ruminants domestiques.

Ce dispositif a laissé place à l'Observatoire et Suivi des Causes d'Avortements chez les Ruminants (OSCAR). Le dispositif OSCAR vise à recueillir et valoriser les résultats de diagnostic différentiel des avortements entrepris en routine par les laboratoires vétérinaires partenaires. Sa finalité est d'améliorer la connaissance des causes infectieuses des avortements. Cette connaissance permettra d'adapter les mesures de diagnostic, de prévention, et de lutte contre ces maladies. En effet, les avortements représentent à différents titres une pathologie très importante chez les animaux de rente. D'une part, ils constituent un signe d'appel de zoonoses majeures, qu'elles soient sporadiques, comme la brucellose, ou enzootiques comme la fièvre Q. D'autre part, ils peuvent engendrer des pertes économiques lourdes pour les éleveurs. Ainsi, bien que coûteux à mettre en œuvre, il serait intéressant de favoriser à termes le processus de déclaration obligatoire des avortements en élevages en encourageant financièrement les éleveurs et les propriétaires. Cette démarche est essentielle au renforcement de la surveillance de l'ensemble des maladies abortives.

Par ailleurs, nous encourageons le RESPE à intensifier sa démarche de surveillance événementielle des maladies infectieuses chez les chevaux. Il serait notamment intéressant d'envisager plus systématiquement la détection de *C. burnetii* dans les prélèvements analysés dans le cadre de la surveillance des avortements et des syndromes respiratoires, cardiaques et hépatiques chroniques.

Pour finir, la surveillance des maladies en élevages doit à terme plus systématiquement intégrer la triptyque santé publique, santé vétérinaire et environnement. Ainsi, les collaborations en cours entre les CNR et LNR sont amenées à s'intensifier dans les années à venir pour s'orienter vers une gestion intégrée des maladies infectieuses zoonotiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agerholm, J.S., 2013. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals- a critical review. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55, 13.
- Agerholm, J.S., 2014. *Coxiella burnetii* and reproductive disorders in cattle. *Infection Genetics and Evolution* 28, 150.
- Agerholm, J.S., Svejstrup, C.A., Christoffersen, A.B., Agger, J.F.G., 2015. Apparent seroprevalence for *Coxiella burnetii* in the Danish horse population. *Dansk Veterinaertidsskrift* 98, 26-29.
- Agreste, 2010. Agricultural census 2010.
- Amitai, Z., Bromberg, M., Bernstein, M., Raveh, D., Keysary, A., David, D., Pitlik, S., Swerdlow, D., Massung, R., Rzotkiewicz, S., Halutz, O., Shohat, T., 2010. A large Q fever outbreak in an urban school in Central Israel. *Clinical Infectious Diseases* 50, 1433-1438.
- Andoh, M., Nagaoka, H., Yamaguchi, T., Fukushima, H., Hirai, K., 2004. Comparison of Japanese isolates of *Coxiella burnetii* by PCR - RFLP and sequence analysis. *Microbiology and Immunology* 48, 971-975.
- Angelakis, E., Mediannikov, O., Socolovschi, C., Mouffok, N., Bassene, H., Tall, A., Niangaly, H., Doumbo, O., Znazen, A., Sarih, M., Sokhna, C., Raoult, D., 2014. *Coxiella burnetii*-positive PCR in febrile patients in rural and urban Africa. *International Journal of Infectious Diseases* 28, 107-110.
- Angelakis, E., Million, M., D'Amato, F., Rouli, L., Richet, H., Stein, A., Rolain, J.M., Raoult, D., 2013. Q fever and pregnancy: disease, prevention, and strain specificity. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 32, 361-368.
- Angelakis, E., Raoult, D., 2010. Q Fever. *Veterinary Microbiology* 140, 297-309.
- ANSES 2012. Hiérarchisation de 103 maladies animales présentes dans les filières ruminants, équidés, porcs, volailles et lapins en France métropolitaine, report, A.t., ed.
- Armengaud, A., Kessalis, N., Desenclos, J.C., Maillot, E., Brousse, P., Brouqui, P., Obadia, Y., 1997. Urban outbreak of Q fever, Briançon, France, March to June 1996. *Eurosurveillance* 2, 12-13.
- Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, C.C., Souriau, A., Meyer, H., Neubauer, H., Rodolakis, A., Vergnaud, G., 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiology* 6, 38.

- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Veterinary Research* 36, 327-349.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Bodier, C., Dufour, P., Rousset, E., Rodolakis, A., 2005. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine* 23, 4392-4402.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Moutoussamy, A., Ladenise, K., Rodolakis, A., 2001. Étude de l'excrétion de *Coxiella burnetii* dans un modèle expérimental caprin et décontamination des lisiers par la cyanamide calcique. *Rencontres recherche ruminants* 8, 153–156.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Juste, R.A., Garcia-Perez, A.L., 2010. Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. *Veterinary Journal* 184, 172-175.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Juste, R.A., Hurtado, A., Garcia-Perez, A.L., 2013. Evaluation of the efficacy of oxytetracycline treatment followed by vaccination against Q fever in a highly infected sheep flock. *Veterinary Journal* 196, 81-85.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., Garcia-Perez, A.L., 2011. Four-year evaluation of the effect of vaccination against *Coxiella burnetii* on reduction of animal infection and environmental contamination in a naturally infected dairy sheep flock (vol 77, pg 7405, 2011). *Applied and Environmental Microbiology* 77, 8799.
- Astobiza, I., Tilburg, J., Pinero, A., Hurtado, A., Garcia-Perez, A.L., Nabuurs-Franssen, M.H., Klaassen, C.H.W., 2012. Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants in northern Spain. *BMC veterinary research* 8.
- Baca, O.G., Paretsky, D., 1983. Q fever and *Coxiella burnetii*: a model for host-parasite interactions. *Microbiological Reviews* 47, 127-149.
- Barlow, J., Rauch, B., Welcome, F., Kim, S.G., Dubovi, E., Schukken, Y., 2008. Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. *Veterinary Research*, 39, 9.
- Beare, P.A., Gilk, S.D., Larson, C.L., Hill, J., Stead, C.M., Omsland, A., Cockrell, D.C., Howe, D., Voth, D.E., Heinzen, R.A., 2011. Dot/Icm type IVB secretion system requirements for *Coxiella burnetii* growth in human macrophages. *Mbio* 2.
- Beare, P.A., Unsworth, N., Andoh, M., Voth, D.E., Omsland, A., Gilk, S.D., Williams, K.P., Sobral, B.W., Kupko, J.J., Porcella, S.F., Samuel, J.E., Heinzen, R.A., 2009. Comparative

- genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infection and Immunity* 77, 642-656.
- Bellini, C., Magouras, I., Chapuis - Taillard, C., Clerc, O., Masserey, E., Peduto, G., Greub, G., 2014. Q fever outbreak in the terraced vineyards of Lavaux, Switzerland. *New Microbes and New Infections* 2, 93-99.
- Berri, M., Crochet, D., Santiago, S., Rodolakis, A., 2005. Spread of *Coxiella burnetii* infection in a flock of sheep after an episode of Q fever. *The Veterinary Record* 157, 737-740.
- Berri, M., Rousset, E., Champion, J.L., Arricau-Bouvery, N., Russo, P., Pepin, M., Rodolakis, A., 2003. Ovine manure used as a garden fertiliser as a suspected source of human Q fever. *Veterinary Record* 153, 269-270.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Crochet, D., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2001. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Veterinary Record* 148, 502-505.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Rodolakis, A., 2002. Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. *Veterinary Microbiology* 85, 55-60.
- Bewley, K.R., 2013. Animal models of Q fever (*Coxiella burnetii*). *Comparative Medicine* 63, 469-476.
- Bielawska-Drozd, A., Cieslik, P., Mirski, T., Gawel, J., Michalski, A., Niemcewicz, M., Bartoszcze, M., Zakowska, D., Lasocki, K., Knap, J., Kocik, J., 2014. Prevalence of *Coxiella burnetii* in environmental samples collected from cattle farms in Eastern and Central Poland (2011-2012). *Veterinary Microbiology* 174, 600-606.
- Blinov, P.N., 1957. Experimental Q fever in horses. 34, 34-40.
- Boarbi, S., Fretin, D., Mori, M., 2016. *Coxiella burnetii*, the Q fever agent. *Canadian Journal of Microbiology* 62, 102-122.
- Boden, K., Wolf, K., Hermann, B., Frangoulidis, D., 2015. First isolation of *Coxiella burnetii* from clinical material by cell-free medium (ACCM2). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 34, 1017-1022.
- Boni, M., Davoust, B., Tissot-Dupont, H., Raoult, D., 1998. Survey of seroprevalence of Q fever in dogs in the southeast of France, French Guyana, Martinique, Senegal and the Ivory Coast. *Veterinary Microbiology* 64, 1-5.

- Boschini, A., Di Perri, G., Legnani, D., Fabbri, P., Ballarini, P., Zucconi, R., Boros, S., Rezza, G., 1999. Consecutive epidemics of Q fever in a residential facility for drug abusers: impact on persons with human immunodeficiency virus infection. *Clinical Infectious Diseases* 28, 866-872.
- Boulogne, O., Der Sahakian, G., Pascal, L., Armengaud, A., Malfait, P. 2014. Épidémie de fièvre Q liée à la visite d'une ferme d'élevage, Vaucluse-Drôme, Mai-juin 2014, sanitaire, ed., 1-34.
- Bronner, A., Henaux, V., Fortane, N., Hendrikx, P., Calavas, D., 2014. Why do farmers and veterinarians not report all bovine abortions, as requested by the clinical brucellosis surveillance system in France? *BMC Veterinary Research* 10.
- Bronner, A., Henaux, V., Vergne, T., Vinard, J.L., Morignat, E., Hendrikx, P., Calavas, D., Gay, E., 2013. Assessing the mandatory bovine abortion notification system in France using unilist capture-recapture approach. *Plos One* 8.
- Bronner, A., Morignat, E., Touratier, A., Gache, K., Sala, C., Calavas, D., 2015. Was the French clinical surveillance system of bovine brucellosis influenced by the occurrence and surveillance of other abortive diseases? *Preventive Veterinary Medicine* 118, 498-503.
- Brooke, R.J., Kretzschmar, M.E.E., Mutters, N.T., Teunis, P.F., 2013. Human dose response relation for airborne exposure to *Coxiella burnetii*. *BMC Infectious Diseases* 13.
- Buhariwalla, F., Cann, B., Marrie, T.J., 1996. A dog-related outbreak of Q fever. *Clinical Infectious Diseases* 23, 753-755.
- Burnet, F.M., Freeman, M., 1983. Experimental studies on the virus of "Q" fever. Review of *Infectious Diseases* 5, 800-808.
- Buzoni-Gatel, D., Rodolakis, A., 1983. A mouse model to compare virulence of abortive and intestinal ovine strains of *Chlamydia psittaci*: influence of the route of inoculation. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie* 134, 91-99.
- Carcopino, X., Raoult, D., Bretelle, F., Boubli, L., Stein, A., 2009. Q fever during pregnancy a cause of poor fetal and maternal outcome. *Rickettsiology and Rickettsial Diseases - Fifth International Conference: Annals of the New York Academy of Sciences* 1166, 79-89.
- Caron, F., Meurice, J.C., Ingrand, P., Bourgoin, A., Masson, P., Roblot, P., Patte, F., 1998. Acute Q fever pneumonia: a review of 80 hospitalized patients. *Chest* 114, 808-813.
- Carrie, P., 2016. Fièvre Q en élevage de ruminants domestiques : intérêt des prélèvements environnementaux. VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon, Marcy-l'Etoile.

- Carrieri, M., Tissot-Dupont, H., Rey, D., Brousse, P., Renard, H., Obadia, Y., Raoult, D., 2002. Investigation of a slaughterhouse-related outbreak of Q fever in the French Alps. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 21, 17-21.
- Chmielewski, T., Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Podsiadly, E., Thiery, R., Tylewska-Wierzbanowska, 2009. Molecular epidemiology of Q fever in Poland. Polish Journal of Microbiology 58, 9-13.
- Chmielewski, T., Tylewska-Wierzbanowska, S., 2013. Q fever outbreaks in Poland during 2005-2011. Medical Science Monitor 19, 1073-1079.
- Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Mungall, K., 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature 409, 1007-1011.
- Coleman, S.A., Fischer, E.R., Howe, D., Mead, D.J., Heinzen, R.A., 2004. Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. The Journal of Bacteriology 186, 7344-7352.
- D'Amato, F., Eldin, C., Georgiades, K., Edouard, S., Delerce, J., Labas, N., Raoult, D., 2015. Loss of TSS1 in hypervirulent *Coxiella burnetii* 175, the causative agent of Q fever in French Guiana. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases 41, 35-41.
- D'Amato, F., Million, M., Edouard, S., Delerce, J., Robert, C., Marrie, T., Raoult, D., 2014a. Draft genome sequence of *Coxiella burnetii* Dog Utad, a strain isolated from a dog - related outbreak of Q fever. New microbes and New Infections 2, 136-137.
- D'Amato, F., Robert, C., Azhar, E.I., Fournier, P.E., Raoult, D., 2014b. Draft genome sequence of *Coxiella burnetii* strain Cb196, an agent of endocarditis in Saudi Arabia. Genome Announcements 2, e01180-01114.
- D'Amato, F., Rouli, L., Edouard, S., Tyczka, J., Million, M., Robert, C., Nguyen, T.T., Raoult, D., 2014c. The genome of *Coxiella burnetii* Z3055, a clone linked to the Netherlands Q fever outbreaks, provides evidence for the role of drift in the emergence of epidemic clones. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 37, 5, 281-288.
- de Bruin, A., van Alphen, P.T.W., van der Plaats, R.Q.J., de Heer, L.N.D., Reusken, C., van Rotterdam, B.J., Janse, I., 2012. Molecular typing of *Coxiella burnetii* from animal and environmental matrices during Q fever epidemics in the Netherlands. BMC Veterinary research 8.
- de Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicollet, P., Ribaud, D., David, V., Le Pape, M., 2012a. Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii*-inactivated

- vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. FEMS Immunology and Medical Microbiology 64, 104-106.
- de Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicollet, P., Ribaud, D., David, V., Le Pape, M., 2012b. *Coxiella burnetii* vaginal shedding and antibody responses in dairy goat herds in a context of clinical Q fever outbreaks. FEMS Immunology and Medical Microbiology 64, 120-122.
- de Lamballerie, X., Chapel, F., Vignoli, C., Zandotti, C., 1994. Improved current methods for amplification of DNA from routinely processed liver tissue by PCR. Journal of Clinical Pathology 47, 466-467.
- de los Ríos-Martín, R., Sanz-Moreno, J.C., Martín-Martínez, F., Tébar-Betegón, M.A., Cortes-García, M., Escudero-Nieto, R., 2006. Q fever outbreak in an urban area following a school-farm visit. Medicina Clínica 126, 573-575.
- Denison, A.M., Thompson, H.A., Massung, R.F., 2007. IS1111 insertion sequences of *Coxiella burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates. BMC Microbiology 7, 8.
- Derrick, E.H., 1983. " Q" Fever, a New Fever Entity: Clinical Features, Diagnosis and Laboratory Investigation. Reviews of Infectious Diseases 5, 790-800.
- Di Domenico, M., Curini, V., De Massis, F., Di Provvido, A., Scacchia, M., Camma, C., 2014. *Coxiella burnetii* in Central Italy: novel genotypes are circulating in cattle and goats. Vector Borne Zoonotic Dis 14, 710-715.
- Dupont, H.T., Thirion, X., Raoult, D., 1994. Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 1, 189-196.
- Duron, O., Noel, V., McCoy, K.D., Bonazzi, M., Sidi-Boumedine, K., Morel, O., Vavre, F., Zenner, L., Jourdain, E., Durand, P., Arnathau, C., Renaud, F., Trape, J.F., Biguezoton, A.S., Cremaschi, J., Dietrich, M., Leger, E., Appelgren, A., Dupraz, M., Gomez-Diaz, E., Diatta, G., Dayo, G.K., Adakal, H., Zoungrana, S., Vial, L., Chevillon, C., 2015a. The recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q fever pathogen, *Coxiella burnetii*. Plos Pathogens 11, Open Access.
- Duron, O., Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Moutailler, S., Jourdain, E., 2015. The importance of ticks in Q fever transmission: what has (and has not) been demonstrated? Trends Parasitology 31, 536-552.

- ECDC, 2010. (European Centre for Disease Prevention and Control) Panel with representatives from the Netherlands, France, Germany, UK, United States. Asher, A., Bernard, H., Coutino, R., Durat, G., De Valk, H., Desenclos, J-C., Holmberg, J., Kirkbridge, H., More, S., Scheenberger, P., van der Hoek, W., van der Poel, C., van Steenberg, J., Villanueva, S., Coulombier, D., Forland, F., Giesecke, J., Jansen, A., Nilsson, M., Guichard, C., Mailles, A., Pouchol, E., Rousset, E. 2010. Risk assessment on Q fever. ECDC Technical report. [40 pp.]. doi:10.2900/28860. May. Available online: www.ecdc.europa.eu.
- EFSA, 2010. Contributors: More, S., Stegeman, J. A., Rodolakis, A., Roest, H-J., Vellema, P., Thiéry, R., Neubauer, H., van der Hoek, W., Staerk, K., Needham, H., Afonso, A., Georgiev, M., Richardson, J. Scientific opinion on Q Fever. EFSA 1723, 280.
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., Mege, J.L., Maurin, M., Raoult, D., 2017. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. *Clinical Microbiology Reviews* 30, 15-190.
- Elizaquível, P., Sánchez, G., Selma, M.V., Aznar, R., 2012. Application of propidium monoazide-qPCR to evaluate the ultrasonic inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in fresh-cut vegetable wash water. *Food Microbiology* 30, 316-320.
- Estrada-Pena, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R., 2004. Ticks of domestic animal in the Mediterranean region : A guide to identification of species. University of Zaragoza, Spain, 131 p. p.
- Fournier, P.E., 2014. Activity report 2014. National reference center of Rickettsias, *Coxiella*, *Bartonella*.
- Fournier, P.E., 2015. Activity report 2015. National reference center of Rickettsias, *Coxiella*, *Bartonella*.
- Fournier, P.E., El Karkouri, K., Leroy, Q., Robert, C., Giumelli, B., Renesto, P., Raoult, D., 2009. Analysis of the *Rickettsia africae* genome reveals that virulence acquisition in *Rickettsia* species may be explained by genome reduction. *BMC Genomics* 10, 166.
- Frangoulidis, D., Walter, M.C., Antwerpen, M., Zimmermann, P., Janowetz, B., Alex, M., Bottcher, J., Henning, K., Hilbert, A., Ganter, M., Runge, M., Munsterkotter, M., Splettstoesser, W.D., Hanczaruk, M., 2014. Molecular analysis of *Coxiella burnetii* in Germany reveals evolution of unique clonal clusters. *International Journal of Medical Microbiology* 304, 868-876.
- Frankel, D., Richet, H., Renvoise, A., Raoult, D., 2011. Q fever in France, 1985-2009. *Emerging Infectious Diseases* 17, 350-356.

- Franti, C.E., Behymer, D.E., Goggin, J.E., Wright, M.E., 1974. Splenomegaly, sex, and other characteristics of laboratory-animals used for primary isolations of *Coxiella burnetii*. *Laboratory Animal Science* 24, 656-665.
- Gache, K., Hosteing, S., E., R., Sala, C., Perrin, J.B., Nicollet, P., Lars, F., Bronner, A., Guatteo, R., de Cremoux, R. 2016. Situation épidémiologique de la fièvre Q chez les ruminants domestiques. Résultats d'un programme de trois ans dans dix départements pilotes. Journées Nationales des Groupements Techniques Vétérinaires; Nantes (France) - mai 2015 / Congrès, 465-471.
- García-Clemente, M., Seco-García, A.J., Gutiérrez-Rodríguez, M., Romero-Álvarez, P., Fernández-Bustamante, J., Rodríguez-Pérez, M., 2007. Brote epidémico de neumonía por *Coxiella burnetii*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 25, 184-186.
- García-Ispuerto, I., López-Helguera, I., Tutusaus, J., Serrano, B., Monleon, E., Badiola, J.J., López-Gatius, F., 2013. *Coxiella burnetii* shedding during the peripartum period and subsequent fertility in dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 48, 441-446.
- García-Ispuerto, I., Tutusaus, J., López-Gatius, F., 2014. Does *Coxiella burnetii* affect reproduction in cattle? A clinical update. *Reproduction in Domestic Animals* 49, 529-535.
- George, J., Marrie, T.J., 1987. Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in horses in Atlantic Canada. *The Canadian Veterinary Journal* 28, 425.
- Georgiev, M., Afonso, A., Neubauer, H., Needham, H., Thiery, R., Rodolakis, A., Roest, H.J., Stark, K.D., Stegeman, J.A., Vellema, P., van der Hoek, W., More, S.J., 2013. Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982 to 2010. *Eurosurveillance* 18, 13-25.
- Ghigo, E., Capo, C., Raoult, D., Mege, J.L., 2001. Interleukin-10 stimulates *Coxiella burnetii* replication in human monocytes through tumor necrosis factor down-modulation: Role in microbicidal defect of Q fever. *Infection and Immunity* 69, 2345-2352.
- Gilsdorf, A., Kroh, C., Grimm, S., Jensen, E., Wagner-Wiening, C., Alpers, K., 2008. Large Q fever outbreak due to sheep farming near residential areas, Germany, 2005. *Epidemiology and Infection* 136, 1084-1087.
- Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fournous, G., Tyczka, J., Tokarevich, N., Kovacava, E., Marrie, T.J., Raoult, D., 2005. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerging Infectious Diseases* 11, 1211-1217.

- Gonder, J.C., Kishimoto, R.A., Kastello, M.D., Pedersen Jr, C.E., Larson, E.W., 1979. *Cynomolgus* monkey model for experimental Q fever infection. Journal of Infectious Diseases 139, 191-196.
- González-Barrio, D., Hagen, F., Tilburg, J.J., Ruiz-Fons, F., 2016. *Coxiella burnetii* Genotypes in Iberian Wildlife. Microbial Ecology 1-8.
- Gonzalez-Barrio, D., Jado, I., Fernandez-de-Mera, I.G., Fernandez-Santos, M.D., Rodriguez-Vargas, M., Garcia-Amil, C., Beltran-Beck, B., Anda, P., Ruiz-Fons, F., 2016. Genotypes of *Coxiella burnetii* in wildlife: disentangling the molecular epidemiology of a multi-host pathogen. Environmental Microbiology Reports 8, 708-714.
- Gonzalez-Barrio, D., Maio, E., Vieira-Pinto, M., Ruiz-Fons, F., 2015. European rabbits as reservoir for *Coxiella burnetii*. Emerging Infectious Diseases 21, 1055-1058.
- Grilc, E., Socan, M., Koren, N., Ucakar, V., Avsic, T., Pogacnik, M., Kraigher, A., 2007. Outbreak of Q fever among a group of high school students in Slovenia, March-April 2007. Eurosurveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles, European Communicable Disease Bulletin 12.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Berri, M., Rodolakis, A., Joly, A., Seegers, H., 2006a. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. Veterinary Research 37, 827-833.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Joly, A., Seegers, H., 2007. Assessing the within-herd prevalence of *Coxiella burnetii* milk-shedder cows using a real-time PCR applied to bulk tank milk. Zoonoses and Public Health 54, 191-194.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Richard, R., Joly, A., Rodolakis, A., Seegers, H., 2006b. Modalités de l'excrétion de *Coxiella burnetii* par les vaches laitières: implications pour la détection et le contrôle de la Fièvre Q. Rencontres autour des recherches sur les ruminants, 403-406.
- Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2012. Shedding and serological patterns of dairy cows following abortions associated with *Coxiella burnetii* DNA detection. Veterinary Microbiology 155, 430-433.
- Guatteo, R., Nicollet, P., LeDréan, E., Ninio, C., Joly, A. 2014. Diagnostic différentiel des causes infectieuses d'avortements chez les bovins intérêt d'une démarche harmonisée et d'une technique PCR multi-agents. Journées Nationales des Groupements Techniques Vétérinaires; Reims (France) - mai 2014 / Congrès, 165-182.

- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F., 2008. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine* 26, 4320-4328.
- Guatteo, R., Seegers, H., Taurel, A.F., Joly, A., Beaudeau, F., 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: a critical review. *Veterinary Microbiology* 149, 1-16.
- Guidi, E., Pradier, S., Lebert, I., Leblond, A., 2015. Piroplasmosis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of Theileriosis and Babesiosis in horses. *Parasitology Research* 114, 71-83.
- Gurtler, L., Bauerfeind, U., Blumel, J., Burger, R., Drosten, C., Groner, A., Heiden, M., Hildebrandt, M., Jansen, B., Offergeld, R., Pauli, G., Seitz, R., Schlenkrich, U., Schottstedt, V., Strobel, J., Willkommen, H., Arbeitskreis Blut Untergrp, B., 2014. *Coxiella burnetii* - Pathogenic Agent of Q (Query) Fever. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 41, 60-72.
- Gyuranecz, M., Sulyok, K.M., Balla, E., Mag, T., Balazs, A., Simor, Z., Denes, B., Hornok, S., Bajnoczl, P., Hornstra, H.M., Pearson, T., Keim, P., Dan, A., 2014. Q fever epidemic in Hungary, April to July 2013. *Eurosurveillance* 19, 9-13.
- Hanczaruk, M., Meyer, H., Frangoulidis, D., 2009. A genotyping system for *Coxiella burnetii* based on IS1111-elements. *International Journal of Medical Microbiology* 299, 101-101.
- Harris, P., Eales, K.M., Squires, R., Govan, B., Norton, R., 2013. Acute Q fever in northern Queensland: variation in incidence related to rainfall and geographical location. *Epidemiology and Infection* 141, 1034-1038.
- Hatchette, T.F., Hudson, R.C., Schlech, W.F., Campbell, N.A., Hatchette, J.E., Ratnam, S., Raoult, D., Donovan, C., Marrie, T.J., 2001. Goat-associated Q fever: a new disease in Newfoundland. *Emerging Infectious Diseases* 7, 413-419.
- Hawker, J.I., Ayres, J.G., Blair, I., Evans, M.R., Smith, D.L., Smith, E.G., Desselberger, U., 1998. A large outbreak of Q fever in the West Midlands: windbourne spread into a metropolitan area?. *Communicable Disease and Public Health* 1, 180-187.
- HCSP (Haut Conseil de la Santé Publique), 2013. Fièvre Q : Recommandations de prise en charge des personnes infectées par *Coxiella burnetii*, et des personnes exposées à *Coxiella burnetii* dont les acteurs des filières d'élevage, 82.

- Henning, K., Hotzel, H., Peters, M., Welge, P., Popps, W., Theegarten, D., 2008. Unanticipated outbreak of Q fever during a study using sheep, and its significance for further projects. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 122, 13-19.
- HCSP 2013. Fièvre Q : Recommandations de prise en charge des personnes infectées par *Coxiella burnetii*, et des personnes exposées à *Coxiella burnetii* dont les acteurs des filières d'élevage (Haut Conseil de la Santé Publique), p. 82.
- He, Y., Chen, C.Y., 2010. Quantitative analysis of viable, stressed and dead cells of *Campylobacter jejuni* strain 81-176. *Food Microbiology* 27, 439-446.
- Heinzen, R.A., Hackstadt, T., Samuel, J.E., 1999. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends in Microbiology* 7, 149-154.
- Hendrix, L.R., Samuel, J.E., Mallavia, L.P., 1991. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *Journal of General Microbiology* 137, 269-276.
- Hoover, T.A., Culp, D.W., Vodkin, M.H., Williams, J.C., Thompson, H.A., 2002. Chromosomal DNA deletions explain phenotypic characteristics of two antigenic variants, phase II and RSA 514 (crazy), of the *Coxiella burnetii* Nine Mile strain. *Infection and Immunity* 70, 6726-6733.
- Horigan, M.W., Bell, M.M., Pollard, T.R., Sayers, A.R., Pritchard, G.C., 2011. Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 924-931.
- Huijsmans, C.J.J., Schellekens, J.J.A., Wever, P.C., Toman, R., Savelkoul, P.H.M., Janse, I., Hermans, M.H.A., 2011. Single-nucleotide-polymorphism genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q fever outbreak in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2051-2057.
- Humphres, R.C., Hinrichs, D.J., 1981. Role of antibody in *Coxiella burnetii* infection. *Infection and Immunity* 31, 641-645.
- Jager, C., Lautenschlager, S., Willems, H., Baljer, G., 2002. *Coxiella burnetii* plasmid types QpDG and QpH1 are closely related and likely identical. *Veterinary Microbiology* 89, 161 - 166.
- Jager, C., Willems, H., Thiele, D., Baljer, G., 1998. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiology and Infection* 120, 157 - 164.

- Jeon, S.J., Vieira-Neto, A., Gobikrushanth, M., Daetz, R., Mingoti, R.D., Parize, A.C.B., de Freitas, S.L., Lima da Costa, A.N., Bicalho, R.C., Lima, S., Jeong, K.C., Galvao, N., 2015. Uterine microbiota progression from calving until establishment of metritis in dairy cows. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 6324-6332.
- Josefsen, M.H., Löfström, C., Hansen, T.B., Christensen, L.S., Olsen, J.E., Hoorfar, J., 2010. Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 5097-5104.
- Joshi, M.V., Padbidri, V.S., Rodrigues, F.M., Gupta, N.P., 1978. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection among humans and domestic animals of Rajasthan State, India. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology* 23, 67-73.
- Jourdain, E., Duron, O., Barry, S., González-Acuña, D., Sidi-Boumedine, K., 2015. Molecular methods routinely used to detect *Coxiella burnetii* in ticks cross-react with *Coxiella*-like bacteria. *Infection Ecology & Epidemiology* 5, 29230.
- Karagiannis, I., Schimmer, B., Van Lier, A., Timen, A., Schneeberger, P., Van Rotterdam, B., De Bruin, A., Wijkmans, C., Rietveld, A., Van Duynhoven, Y., 2009. Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of The Netherlands. *Epidemiology and Infection* 137, 1283-1294.
- Kazar, J., 2005. *Coxiella burnetii* infection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1063, 105-114.
- Kersh, G.J., Fitzpatrick, K.A., Self, J.S., Priestley, R.A., Kelly, A.J., Lash, R.R., Marsden-Haug, N., Nett, R.J., Bjork, A., Massung, R.F., Anderson, A.D., 2013. Presence and persistence of *Coxiella burnetii* in the environments of goat farms associated with a Q fever outbreak. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 1697-1703.
- Kersh, G.J., Priestley, R.A., Hornstra, H.M., Self, J.S., Fitzpatrick, K.A., Biggerstaff, B.J., Keim, P., Pearson, T., Massung, R.F., 2016. Genotyping and axenic growth of *Coxiella burnetii* isolates found in the United States Environment. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 16, 588-594.
- Kersh, G.J., Wolfe, T.M., Fitzpatrick, K.A., Candee, A.J., Oliver, L.D., Patterson, N.E., Self, J.S., Priestley, R.A., Loftis, A.D., Massung, R.F., 2010. Presence of *Coxiella burnetii* DNA in the environment of the United States, 2006 to 2008. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4469-4475.

- Khaled, H., Sidi-Boumedine, K., Merdja, S., Dufour, P., Dahmani, A., Thiery, R., Rousset, E., Bouyoucef, A., 2016. Serological and molecular evidence of Q fever among small ruminant flocks in Algeria. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 47, 19-25.
- King, L.A., Goirand, L., Tissot-Dupont, H., Giunta, B., Giraud, C., Colardelle, C., Duquesne, V., Rousset, E., Aubert, M., Thiery, R., Calatayud, L., Daurat, G., Hocqueloux, L., Cicchelerio, V., Golliot, F., de Valk, H., 2011. Outbreak of Q fever, Florac, Southern France, spring 2007. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11, 341-347.
- Kishimoto, R.A., Gonder, J.C., Johnson, J.W., Reynolds, J.A., Larson, E.W., 1981. Evaluation of a killed phase I *Coxiella burnetii* vaccine in *Cynomolgus* monkeys (*Macaca Fascicularis*). Army medical research inst. of infectious diseases Fort Detrick MD.
- Kishimoto, R.A., Johnson, J.W., Kenyon, R.H., Ascher, M.S., Larson, E.W., Pedersen, C.E., 1978. Cell-mediated immune responses of guinea pigs to an inactivated phase I *Coxiella burnetii* vaccine. *Infection and Immunity* 19, 194-198.
- Klee, S.R., Tyczka, J., Ellerbrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G., Appel, B., 2006. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiology* 6.
- Kruszewska, D., Lembowicz, K., Tylewska-Wierzbanska, S., 1996. Possible sexual transmission of Q fever among humans. *Clinical Infectious Diseases* 22, 1087-1088.
- Kruszewska, D., Tylewska-Wierzbanska, S., 1997. Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Research in Veterinary Science* 62, 299-300.
- Kuley, R., Bossers-deVries, R., Smith, H.E., Smits, M.A., Roest, H.I.J., Bossers, A., 2015. Major differential gene regulation in *Coxiella burnetii* between *in vivo* and *in vitro* cultivation models. *BMC Genomics* 16.
- Kuley, R., Smith, H.E., Janse, I., Harders, F.L., Baas, F., Schijlen, E., Bossers, A., 2016. First complete genome sequence of the Dutch veterinary *Coxiella burnetii* strain NL3262, originating from the largest global Q fever outbreak, and draft genome sequence of its epidemiologically linked chronic human isolate NLhu3345937. *Genome Announcements* 4, e00245-00216.
- La Scola, B., Lepidi, H., Raoult, D., 1997. Pathologic changes during acute Q fever: influence of the route of infection and inoculum size in infected guinea pigs. *Infection and Immunity* 65, 2443-2447.

- Lang, G.H., 1990. Coxiellosis (Q fever) in animals, In: Marrie, T.J. (Ed.) Q FEVER : Volume 1 The Disease. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida USA, pp. 23-48.
- Lautenschlager, S., Willems, H., Jager, C., Baljer, G., 2000. Sequencing and characterization of the cryptic plasmid QpRS from *Coxiella burnetii*. Plasmid 44, 85 - 88.
- Leon, A., Richard, E., Fortier, C., Laugier, C., Fortier, G., Pronost, S., 2012. Molecular detection of *Coxiella burnetii* and *Neospora caninum* in equine aborted fetuses and neonates. Preventive Veterinary Medicine 104, 179-183.
- Leone, M., Honstetter, A., Lepidi, H., Capo, C., Bayard, F., Raoult, D., Mege, J.L., 2004. Effect of sex on *Coxiella burnetii* infection: protective role of 17 β -estradiol. Journal of Infectious Diseases 189, 339-345.
- Lyytikäinen, O., Ziese, T., Schwartländer, B., Matzdorff, P., Kuhnhen, C., Jäger, C., Petersen, L., 1998. An outbreak of sheep-associated Q fever in a rural community in Germany. European Journal of Epidemiology 14, 193-199.
- Marchette, N.J., Sidwell, R.W., Nicholes, P.S., Bushman, J.B., 1962. Studies on infectious diseases in wild animals in Utah. III. Experimental Q fever in wild vertebrates. Zoonoses Research 1, 321-339.
- Marenzoni, M.L., Stefanetti, V., Papa, P., Proietti, P.C., Bietta, A., Coletti, M., Passamonti, F., Henning, K., 2013. Is the horse a reservoir or an indicator of *Coxiella burnetii* infection? Systematic review and biomolecular investigation. Veterinary Microbiology 167, 662-669.
- Marrie, T.J., Durant, H., Williams, J.C., Mintz, E., Waag, D.M., 1988. Exposure to parturient cats: a risk factor for acquisition of Q fever in maritime Canada. Journal of Infectious Diseases 158, 101-108.
- Martinov, S., 2007. Contemporary state of the problem Q fever in Bulgaria. BIOTECHNOL. & BIOTECHNOL. EQ, 353-361.
- Maurin, M., Raoult, D.F., 1999. Q fever. Clinical Microbiology Reviews 12, 518-553.
- Medic, A., Dzelalija, B., Punda Polic, V., Gjenero Margan, I., Turokovic, B., Gilic, V., 2005. Q fever epidemic among employees in a factory in the suburb of Zadar, Croatia. Croatian Medical Journal 46, 315-319.
- Meghari, S., Bechah, Y., Capo, C., Lepidi, H., Raoult, D., Murray, P.J., Mege, J.L., 2008. Persistent *Coxiella burnetii* infection in mice overexpressing IL-10: an efficient model for chronic Q fever pathogenesis. PloS Pathogens 4, e23.

- Melenotte, C., Lepidi, H., Nappez, C., Bechah, Y., Audoly, G., Terras, J., Raoult, D., Bregeon, F., 2016. Mouse model of *Coxiella burnetii* aerosolization. *Infection and Immunity* 84, 2116-2123.
- Merhej, V., Raoult, D., 2011. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biological Reviews* 86, 379-405.
- Michelet, L., Delannoy, S., Devillers, E., Umhang, G., Aspan, A., Juremalm, M., Chirico, J., van der Wal, F.J., Sprong, H., Pihl, T.P.B., Klitgaard, K., Bodker, R., Fach, P., Moutailler, S., 2014. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4.
- Million, M., Lepidi, H., Raoult, D., 2009. Fièvre Q: actualités diagnostiques et thérapeutiques. *Médecine et Maladies Infectieuses* 39, 82-94.
- Moos, A., Hackstadt, T., 1987. Comparative virulence of intra- and interstrain lipopolysaccharide variants of *Coxiella burnetii* in the guinea pig model. *Infection and Immunity* 55, 144-1150.
- Mori, M., Boarbi, S., Michel, P., Bakinahe, R., Rits, K., Wattiau, P., Fretin, D., 2013. *In Vitro* and *In Vivo* infectious potential of *Coxiella burnetii*: a study on Belgian livestock isolates. *Plos One* 8, 1-9.
- Narasaki, C.T., Toman, R., 2012. Lipopolysaccharide of *Coxiella burnetii*, In: Toman, R., Heinzen, R.A., Samuel, J.E., Mege, J.-L. (Eds.) *Coxiella burnetii*: recent advances and new perspectives in research of the Q Fever bacterium. Springer, pp. 65-90.
- Nett, R.J., Book, E., Anderson, A.D., 2012. Q Fever with unusual exposure history: a classic presentation of a commonly misdiagnosed disease. *Case reports in infectious diseases* 2012, 916142.
- Nocker, A., Mazza, A., Masson, L., Camper, A.K., Brousseau, R., 2009. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *Journal of microbiological methods* 76, 253-261.
- OIE, 2015. Contributors: Rousset, E., Sidi-Boumedine, K. Q fever. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)* OIE.
- Ollivier, R., Leftah-Marie, N., Hubert, B. 2009. Épidémie de fièvre Q dans une usine de traitement de viande, Maine-et-Loire, Rapport de l'Institut de Veille Sanitaire, 1-17.
- Palmela, C., Badura, R., Valadas, E., 2012. Acute Q fever in Portugal. *Epidemiological and clinical features of 32 hospitalized patients. Germs* 2, 43.

- Pan, Y., Breidt, F., 2007. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 8028-8031.
- Panaiotov, S., Ciccozzi, M., Brankova, N., Levterova, V., Mitova-Tiholova, M., Amicosante, M., Rezza, G., Kantardjiev, T., 2009. An outbreak of Q fever in Bulgaria. *Ann Ist Super Sanita* 45, 83-86.
- Parisi, A., Fraccalvieri, R., Cafiero, M., Miccolupo, A., Padalino, I., Montagna, C., Sottili, R., 2006. Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. *Veterinary Microbiology* 118, 101-106.
- Philip, C.B., 1948. Observations on experimental Q fever. *The Journal of Parasitology* 34, 457-464.
- Pérez-Eid, C., 2007. Les tiques - Identification, biologie, importance médicale et vétérinaire (Collection : Monographies de microbiologie). Tec et Doc, Editions médicales (Lavoisier), 314 p. p.
- Pholwat, S., Heysell, S., Stroup, S., Foongladda, S., Houpt, E., 2011. Rapid first-and second-line drug susceptibility assay for *Mycobacterium tuberculosis* isolates by use of quantitative PCR. *Journal of clinical microbiology* 49, 69-75.
- Pinero, A., Barandika, J.F., Garcia-Perez, A.L., Hurtado, A., 2015. Genetic diversity and variation over time of *Coxiella burnetii* genotypes in dairy cattle and the farm environment. *Infection Genetics and Evolution* 31, 231-235.
- Pitre, J., 1960. Rickettsial infections of cattle and horses in Calvados, France. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 33, 459-462.
- Porten, K., Rissland, J., Tigges, A., Broll, S., Hopp, W., Lunemann, M., van Treeck, U., Kimmig, P., Brockmann, S.O., Wagner-Wiening, C., Hellenbrand, W., Buchholz, U., 2006. A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. *BMC Infectious Diseases* 6, 13.
- Prigent, M., Rousset, E., Yang, E., Thiery, R., Sidi-Boumedine, K., 2015. Validation study for using lab-on-chip technology for *Coxiella burnetii* multi-locus-vntr-analysis MLVA typing. *Microbes and Infection* 17, 782-788.
- Raoult, D., Marrie, T.J., Mege, J.L., 2005. Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infectious Diseases* 5, 219-226.

- Raoult, D., Tissot-Dupont, H., Foucault, C., Gouvernet, J., Fournier, P.E., Bernit, E., Stein, A., Nesri, M., Harle, J.R., Weiller, P.J., 2000. Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. *Medicine* 79, 109 - 123.
- Raseta, B., Mihajlovic, B., 1983. Q-fever in domestic animals in the province of Vojvodina. *Veterinarski Glasnik* 37, 695-704.
- Rawsthorne, H., Phister, T.G., 2009. Detection of viable *Zygosaccharomyces bailii* in fruit juices using ethidium monoazide bromide and real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 131, 246-250.
- Reichel, R., Mearns, R., Brunton, L., Jones, R., Horigan, M., Vipond, R., Vincent, G., Evans, S., 2012. Description of a *Coxiella burnetii* abortion outbreak in a dairy goat herd, and associated serology, PCR and genotyping results. *Research in Veterinary Science* 93, 1217-1224.
- Rey, S., Aubert, M., Denetière, G., Devalk, H., Duncat, J., Languille, J., Rousset, E., Strugar, S., Tissot-Dupont, H., Vaillant, V. 2005. Épidémie de fièvre Q (Chamonix, Haute-Savoie), juin-septembre 2002, Rapport de l'Institut de Veille Sanitaire, 1-64.
- Rey, S., Vianez-Gaide, A.M., Saviuc, P., Vaillant, V., Valenciano, M., Capek, I., 2003. Investigation sur des cas groupés de fièvre Q (Montoison, Drôme). Rapport de l'Institut de Veille Sanitaire, 1-44.
- Rieder, A., Schwartz, T., Schön - Hölz, K., Marten, S.M., Süß, J., Gusbeth, C., Frey, W., 2008. Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field treatment of clinical wastewater. *Journal of Applied Microbiology* 105, 2035-2045.
- Rodolakis, A., Bernard, F., Lantier, F., 1989. Mouse models for evaluation of virulence of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants. *Research in Veterinary Science* 46, 34-39.
- Rodolakis, A., Berri, M., Hechard, C., Caudron, C., Souriau, A., Bodier, C.C., Blanchard, B., Camuset, P., Devillechaise, P., Natorp, J.C., Vadet, J.P., Arricau-Bouvery, N., 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *Journal of Dairy Science* 90, 5352-5360.
- Rodolakis, A., Salinas, J., Papp, J., 1998. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Veterinary Research* 29, 275-288.
- Roest, H.I.J., van Solt, C.B., Tilburg, J., Klaassen, C.H.W., Hovius, E.K., Roest, F.T.F., Vellema, P., van den Brom, R., van Zijderveld, F.G., 2013a. Search for possible additional reservoirs for human Q fever, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 19, 834-835.

- Roest, H.I.J., van Solt, C.B., Tilburg, J.J.H.C., Klaassen, C.H.W., Hovius, E.K., Roest, F.T.F., Vellema, P., van den Brom, R., van Zijderveld, F.G., 2013b. Search for possible additional reservoirs for human Q fever, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 19, 834-835.
- Rouli, L., Rolain, J.M., El Filali, A., Robert, C., Raoult, D., 2012. Genome sequence of *Coxiella burnetii* 109, a doxycycline-resistant clinical isolate. *Journal of Bacteriology* 194, 6939-6939.
- Rousset, E., Berri, M., Durand, B., Dufour, P., Prigent, M., Delcroix, T., Touratier, A., Rodolakis, A., 2009. *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 428-433.
- Rousset, E., Dufour, P., Hans, A., Gaudaire, D., Madeline, A., Lecollinet, S., Leblond, A., Thierry, R., Jourdain, E., Gasqui, P. 2015. Probabilistic model approach for evaluation of a multi-species serological method for Q fever, International Congress on Rickettsia and other Intracellular Bacteria ; Lausanne (Suisse) - (2015-06-16) / Congrès.
- Rousset, E., Prigent, M., Ameziane, G., Brugidou, R., Martel, I., Grob, A., Gall, G.L., Kerninon, S., Delaval, J., Chassin, A., Vassiloglou, B., S, A., Valogne, A., Ogier, M., Audeval, C., Colocci, F., Perennes, S., Cazalis, L., Nicollet, Sidi-Boumedine, K., 2012. Adoption by a network's laboratories of a validated quantitative real-time PCR method for monitoring Q fever abortions in ruminant livestock. *Euroreference* 8, 21-28.
- Rousset, E., Russo, P., Pépin, M., Raoult, D., 2001. Épidémiologie de la fièvre Q animale. Situation en France. *Médecine et Maladies Infectieuses* 31, 233-246.
- Ruiz-Fons, F., Astobiza, I., Barandika, J.F., Juste, R.A., Hurtado, A., Garcia-Perez, A.L., 2011. Measuring antibody levels in bulk-tank milk as an epidemiological tool to search for the status of *Coxiella burnetii* in dairy sheep. *Epidemiology and Infection* 139, 1631-1636.
- Ruiz-Fons, F., Gonzalez-Barrio, D., Aguilar-Rios, F., Soler, A.J., Garde, J.J., Gortazar, C., Fernandez-Santos, M.D., 2014. Infectious pathogens potentially transmitted by semen of the black variety of the Manchega sheep breed: health constraints for conservation purposes. *Animal Reproduction Science* 149, 152-157.
- Runge, M., Hilbert, A., Henning, K., 2012. Contribution to the occurrence of *Coxiella burnetii*-infection in horses. *Praktische Tierarzt* 93, 220-222.
- Russell-Lodrigue, K.E., Andoh, M., Poels, M.W., Shive, H.R., Weeks, B.R., Zhang, G.Q., Tersteeg, C., Masegi, T., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., McMurray,

- D.N., Samuel, J.E., 2009. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. *Infection and Immunity* 77, 5640-5650.
- Russell-Lodrigue, K.E., Zhang, G.Q., McMurray, D.N., Samuel, J.E., 2006. Clinical and pathologic changes in a guinea pig aerosol challenge model of acute Q fever. *Infection and Immunity* 74, 6085-6091.
- Saegerman, C., Speybroeck, N., Dal Pozzo, F., Czaplicki, G., 2015. Clinical indicators of exposure to *Coxiella burnetii* in dairy herds. *Transboundary and Emerging Diseases* 62, 46-54.
- Santos, A.S., Tilburg, J., Botelho, A., Barahona, M.J., Nuncio, M.S., Nabuurs-Franssen, M.H., Klaassen, C.H.W., 2012. Genotypic diversity of clinical *Coxiella burnetii* isolates from Portugal based on MST and MLVA typing. *International Journal of Medical Microbiology* 302, 253-256.
- Schimmer, B., ter Schegget, R., Wegdam, M., Zuchner, L., de Bruin, A., Schneeberger, P.M., Veenstra, T., Vellema, P., van der Hoek, W., 2010. The use of a geographic information system to identify a dairy goat farm as the most likely source of an urban Q-fever outbreak. *BMC Infectious Diseases* 10, 7.
- Schneider, T., Jahn, H.U., Steinhoff, D., Guschoreck, H.M., Liesenfeld, O., Mäter-Böhm, H., Zeitz, M., 1993. Q-Fieber-Epidemie in Berlin: Epidemiologische und klinische Aspekte. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift* 118, 689-695.
- Schulze, K., Schwalen, A., Klein, R.M., Thomas, L.F., Leschke, M., Strauer, B.E., 1996. A Q-fever pneumonia epidemic in Dusseldorf. *Pneumologie* 50, 469-473.
- Scientific, T. 2013. Binding characteristics of antibody-binding proteins: Protein A, Protein G, Protein A/G and Protein L, Inc., T.F.S., ed.
- Scott, G.H., Williams, J.C., Stephenson, E.H., 1987. Animal models in Q fever: pathological responses of inbred mice to phase I *Coxiella burnetii*. *Journal of General Microbiology* 133, 691-700.
- Sekeyova, Z., Roux, V., Raoult, D., 1999. Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by com1 and mucZ sequence comparison. *FEMS Microbiology Letters* 180, 61-67.
- Selvaggi, T.M., Rezza, G., Scagnelli, M., Rigoli, R., Rassu, M., De Lalla, F., Belloni, M., 1996. Investigation of a Q-fever outbreak in northern Italy. *European Journal of Epidemiology* 12, 403-408.

- Seo, M.G., Lee, S.H., VanBik, D., Ouh, I.O., Yun, S.H., Choi, E., Park, Y.S., Lee, S.E., Kim, J.W., Cho, G.J., Kwon, O.D., Kwak, D., 2016. Detection and genotyping of *Coxiella burnetii* and *Coxiella*-like bacteria in horses in South Korea. Plos One 11.
- Serbezov, V.S., Kazar, J., Novkirishki, V., Gatcheva, N., Kovacova, E., Voynova, V., 1999. Q fever in Bulgaria and Slovakia. Emerging Infectious Diseases 5, 338.
- Seshadri, R., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Nelson, K.E., Nelson, W.C., Ward, N.L., Tettelin, H., Davidsen, T.M., Beanan, M.J., Deboy, R.T., Daugherty, S.C., Brinkac, L.M., Madupu, R., Dodson, R.J., Khouri, H.M., Lee, K.H., Carty, H.A., Scanlan, D., Heinzen, R.A., Thompson, H.A., Samuel, J.E., Fraser, C.M., Heidelberg, J.F., 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 100, 5455-5460.
- Shannon, J.G., Heinzen, R.A., 2008. Infection of human monocyte-derived macrophages with *Coxiella burnetii*. Bacterial Pathogenesis: Methods and Protocols, 189-200.
- Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Prigent, M., Yang, E., Joulié, A., Thiery, R., Rousset, E., 2015. Impact of IS1111 insertion on the MLVA genotyping of *Coxiella burnetii*. Microbes and Infection 17, 11, 789-794.
- Sidi-Boumedine, K., Ellis, R.J., Adam, G., Prigent, M., Angen, Ø., Aspán, A., Thiéry, R., Rousset, E., 2014. Draft genome sequences of six ruminant *Coxiella burnetii* isolates of European origin. Genome Announcements 2.
- Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., 2011. Molecular epidemiology of Q fever: a review of *Coxiella burnetii* genotyping methods and main achievements. Euroreference, 30-38.
- Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Henning, K., Ziller, M., Niemczuck, K., Roest, H.I.J., Thiery, R., 2010. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. EFSA Scientific report on question No EFSA-Q-2009-00511 (Art. 36 of Regulation (EC) No 178/2002 de l'EFSA-Zoonose). 48 pp. May. Available online: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/48e.htm>.
- Sidwell, R.W., Gebhardt, L.P., 1962. Q fever antibody response in experimentally infected wild rodents and laboratory animals. The Journal of Immunology 89, 318-322.
- Slimani, S., Robyns, A., Jarraud, S., Molmeret, M., Dusserre, E., Mazure, C., Ginevra, C., 2012. Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by qPCR. Journal of Microbiological Methods 88, 319-321.
- Smith, B.P., 2014. Large animal internal medicine. Elsevier Health Sciences.

- Sobral, D., Schwarz, S., Bergonier, D., Brisabois, A., Feßler, A.T., Gilbert, F.B., Pourcel, C., 2012. High throughput multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of *Staphylococcus aureus* from human, animal and food sources. PloS One 7, e33967.
- Starnini, G., Caccamo, F., Farchi, F., Babudieri, S., Brunetti, B., Rezza, G., 2005. An outbreak of Q fever in a prison in Italy. Epidemiology and Infection 133, 377-380.
- Stein, A., Raoult, D., 1999. Pigeon pneumonia in Provence: a bird-borne Q fever outbreak. Clinical Infectious Diseases 29, 617-620.
- Sting, R., Molz, K., Hoferer, M., 2015. Creating standards for absolute quantification of *Coxiella burnetii* in real-time PCR - A comparative study based on transmission electron microscopy. Biologicals 43, 18-22.
- Sun, W.W., Cong, W., Li, M.H., Wang, C.F., Shan, X.F., Qian, A.D., 2016. *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk Factors in cattle farmers and farm residents in three Northeastern provinces and inner Mongolia autonomous region, China. Biomed Research International.
- Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K., Homan, W.L., 2006. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. Fems Microbiology Letters 254, 268-274.
- Tamrakar, S.B., Haluska, A., Haas, C.N., Bartrand, T.A., 2011. Dose-response model of *Coxiella burnetii* (Q fever). Risk Analysis 31, 120-128.
- Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2012. Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of *Coxiella burnetii* in cows. Epidemiology and Infection 140, 1710-1713.
- Taurel, A.F., Guatteo, R., Lehebel, A., Joly, A., Beaudeau, F., 2014. Vaccination using phase I vaccine is effective to control *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy cattle herds. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases 37, 1-9.
- Tigertt, J.J., Benenson, S., Gochenour, W.S., 1961. Airborne Q fever. Bacteriological Reviews 25, 285-293.
- Tissot-Dupont, H., Amadei, M.A., Nezri, M., Raoult, D., 2004. Wind in November, Q fever in December. Emerging Infectious Diseases 10, 1264-1269.
- Tissot-Dupont, H., Torres, S., Nezri, M., Raoult, D., 1999. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. American Journal of Epidemiology 150, 67-74.

- Tozer, S.J., Lambert, S.B., Strong, C.L., Field, H.E., Sloots, T.P., Nissen, M.D., 2014. Potential animal and environmental sources of Q fever infection for humans in Queensland. *Zoonoses and Public Health* 61, 105-112.
- Tramuta, C., Lacerenza, D., Zoppi, S., Gorla, M., Dondo, A., Ferroglio, E., Nebbia, P., Rosati, S., 2011. Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 657-664.
- Van den Brom, R., Roest, H.J., de Bruin, A., Dercksen, D., Santman-Berends, I., van der Hoek, W., Dinkla, A., Vellema, J., Vellema, P., 2015a. A probably minor role for land-applied goat manure in the transmission of *Coxiella burnetii* to humans in the 2007-2010 Dutch Q fever outbreak. *Plos One* 10, e0121355.
- Van den Brom, R., Schimmer, B., Schneeberger, P.M., Swart, W.A., van der Hoek, W., Vellema, P., 2013. Seroepidemiological survey for *Coxiella burnetii* antibodies and associated risk factors in Dutch livestock veterinarians. *Plos One* 8.
- Van den Brom, R., van Engelen, E., Roest, H.I.J., van der Hoek, W., Vellema, P., 2015b. *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. *Veterinary Microbiology* 181, 119-129.
- van Leuken, J.P.G., van de Kasstele, J., Sauter, F.J., van der Hoek, W., Heederik, D., Havelaar, A.H., Swart, A.N., 2015. Improved correlation of human Q fever incidence to modelled *Coxiella burnetii* concentrations by means of an atmospheric dispersion model. *International Journal of Health Geographics* 14.
- van Loenhout, J.A.F., Paget, W.J., Vercoulen, J.H., Wijkmans, C.J., Hautvast, J.L.A., van der Velden, K., 2012. Assessing the long-term health impact of Q-fever in the Netherlands: a prospective cohort study started in 2007 on the largest documented Q-fever outbreak to date. *BMC Infectious Diseases* 12, 1, 280.
- Van Nguyen, S., Hirai, K., 1999. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene. *FEMS microbiology letters* 180, 249 - 254.
- van Schaik, E.J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M.M., Samuel, J.E., 2013. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nature Reviews Microbiology* 11, 561-573.
- van Woerden, H.C., Mason, B.W., Nehaul, L.K., Smith, R., Salmon, R.L., Healy, B., Valappil, M., Westmoreland, D., de Martin, S., Evans, M.R., Lloyd, G., Hamilton-Kirkwood, M.,

- Williams, N.S., 2004. Q fever outbreak in industrial setting. *Emerging Infectious Diseases* 10, 1282-1289.
- Waag, D.M., Byrne, W.R., Estep, J., Gibbs, P., Pitt, M., Louise, M., Banfield, C.M., 1999. Evaluation of cynomolgus (*Macaca fascicularis*) and rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys as experimental models of acute Q fever after aerosol exposure to phase-I *Coxiella burnetii*. *Comparative Medicine* 49, 634-638.
- Waag, D.M., Williams, J., Peacock, M., Raoult, D., 1991. Methods for isolation, amplification, and purification of *Coxiella burnetii*, In: Williams, J.C., Thompson, H.A. (Eds.) *Q fever: the biology of Coxiella burnetii*. CRC Press, pp. 73-115.
- Walter, M.C., Vincent, G.A., Stenos, J., Graves, S., Frangoulidis, D., 2014. Genome sequence of *Coxiella burnetii* strain AuQ01 (Arandale) from an australian patient with acute Q fever. *Genome Announcements* 2.
- Willeberg, P., Ruppanner, R., Behymer, D.E., Haghighi, S., Kaneko, J.J., Franti, C.E., 1980. Environmental exposure to *Coxiella burnetii*: a sero-epidemiologic survey among domestic animals. *American Journal of Epidemiology* 111, 437-443.
- Wilson, L.E., Couper, S., Prempeh, H., Young, D., Pollock, K.G.J., Stewart, W.C., Browning, L.M., Donaghy, M., 2010. Investigation of a Q fever outbreak in a Scottish co-located slaughterhouse and cutting plant. *Zoonoses and Public Health* 57, 493-498.
- Zamboni, D.S., Rabinovitch, M., 2004. Phagocytosis of apoptotic cells increases the susceptibility of macrophages to infection with *Coxiella burnetii* phase II through down-modulation of nitric oxide production. *Infection and Immunity* 72, 2075-2080.
- Zhang, G.Q., Russell-Lodrigue, K.E., Andoh, M., Zhang, Y., Hendrix, L.R., Samuel, J.E., 2007. Mechanisms of vaccine-induced protective immunity against *Coxiella burnetii* infection in BALB/c mice. *Journal of Immunology* 179, 8372-8380.
- Zhou, Z., White, K.A., Polissi, A., Georgopoulos, C., Raetz, C.R., 1998. Function of *Escherichia coli* MsbA, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 273, 12466-12475.
- Zotov, A.P., Chumakov, M.P., Markov, A.A., Stepanova, N.I., Petrov, A.N., 1956. The experimental reproduction of Q-fever and serological studies. *Veterinariya*, 44-53.

ANNEXES

Table des annexes

Annexe I : Activités scientifiques ----- **I**

Annexe II : Répartition des échantillons sélectionnés pour l'étude génotypique MLVA par département et par espèce ----- **V**

Annexe III : Répartition des échantillons restants pour l'étude du nombre de copies du gène IS1111 sur le génome de *C. burnetii* par département et par espèce ----- **VI**

Annexe IV : Autres publications en lien avec la thèse ----- **VII**

ANNEXE I : Activités scientifiques

I. Publications en premier auteur

- P1.** Joulié A., Laroucau K., Bailly X., Prigent M., Gasqui P., Lepetitcolin E., Blanchard B., Rousset E., Sidi-Boumedine K., Jourdain E. *Coxiella burnetii* circulation in a naturally infected flock of dairy sheep: shedding dynamics, environmental contamination, and genotype diversity. 2015. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume: 81, Issue: 20. Doi:10.1128/AEM.02180-15. IF₂₀₁₄=3.668
- P2.** Joulié A., Sidi-Boumedine K., Bailly X., Gasqui P., Barry S., Jaffrelo L., Poncet C., Abrial D., Yang E., Animal diagnostic laboratories consortium, Leblond A., Rousset E., Jourdain E. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* in French livestock reveals the existence of three main genotype clusters and suggests species-specific associations as well as regional stability. 2017. *Infection, genetics and Evolution*, Volume: 48, Doi: 10.1016/j.meegid.2016.12.015142-149. IF₂₀₁₆=2.591
- P3.** Joulié A., Rousset E., Gasqui P., Lepetitcolin E., Leblond A., Sidi-Boumedine K., Jourdain E. *Coxiella burnetii* circulation in a naturally infected flock of sheep: individual follow-up of antibodies in milk and serum. 2017. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume: 83, Issue: 13. Doi:10.1128/AEM.00222-17. IF₂₀₁₇=3.952
- P4.** Joulié A., Fourcot A., Barry S., Massegli S., Gasqui P., Leblond A., Thiéry R., Rousset E., Jourdain E., Sidi-Boumedine K. qPCR-based determination of the number of IS1111 elements in the genome of *Coxiella burnetii* strains circulating in France. *In progress*.
- P5.** Joulié A., Desjardins I., Pradier S., Lecollinet S., Beck C., Vial L., Dufour P., Legrand L., Edouard S., Sidi-Boumedine K., Jourdain E., Rousset E., Leblond A. Is the horse a relevant indicator of *Coxiella burnetii* circulation in the vicinity of human Q fever cases? 2017. *Under review*.
- P6.** Joulié A., Yang E., Prigent M., Gasqui P., Bailly X., Leblond A., Rousset E., Jourdain E., Thiéry R., Sidi-Boumedine K. *In vitro* and *in vivo* infectivity of *Coxiella burnetii* strains from French livestock. *In progress*.

II. Publications en co-auteur

- P7.** Sidi-Boumedine K, Duquesne V, Prigent M, Yang E, **Joulié A**, Thiéry R, Rousset E. In revision. Impact of IS1111 insertion on the MLVA genotyping of *Coxiella burnetii*. *Microbes and Infection*. Doi: 10.1016/j.micinf.2015.08.009. IF₂₀₁₄=2.861
- P8.** Dugat T, Leblond A, Keck N, Lagrée A-C, Desjardins I, **Joulié A**, Pradier S, Durand B, Boulouis H-J, Haddad N. One particular *Anaplasma phagocytophilum* ecotype infects cattle in French Camargue. *Parasites & Vectors*. IF₂₀₁₇=3.080

III. Actes de colloques publiés

- P9.** **Joulié A**, Laroucau K, Bailly X., Prigent M., Gasqui P., Lepetitcolin E., Blanchard B., Rousset E., Sidi-Boumedine K., Jourdain E. Circulation de *Coxiella burnetii* dans un troupeau ovin lait naturellement infecté : dynamiques d'excrétion, contamination environnementale et diversité génotypique. *Actes des Journées Rencontre Recherches Ruminants 2015*.

IV. Communications dans des congrès internationaux

IV.1. Communications orales

- C1.** **Joulié A**, Sidi-Boumedine K, Bailly X, Gasqui P, Barry S, Jaffrelo L, Poncet C, Abrial D, Yang E, Animal diagnostic laboratories consortium, Leblond A, Rousset E, Jourdain E. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* reveals the circulation of three main genotype clusters in French ruminant farms. *Q fever symposium organized by the Coda-Cerva*, April 20-21, 2016, Bruxelles, Belgium.
- C2.** **Joulié A**, Desjardins I, Pradier S, Lecollinet S, Beck C, Vial L, Dufour P, Jourdain E, Rousset E, Leblond A. Horse exposition to *Coxiella burnetii* in France: antibody dynamics in serum, environmental risk assessment and potential links with symptomatology. *International Conference on Epidemiology and Infectious Diseases*, April 24-25, 2017, Boston, USA.

IV.2. Posters

- C3.** **Joulié A**, Laroucau K., Bailly X., Prigent M., Gasqui P., Lepetitcolin E., Blanchard B., Rousset E., Sidi-Boumedine K., Jourdain E. *Coxiella burnetii* circulation in a naturally infected dairy sheep flock: individual shedding, environmental contamination and strain diversity. *25th International Congress on Rickettsia and other Intracellular Bacteria*, June 13-16, 2015, Lausanne, Switzerland.

- C4.** Joulié A., Sidi-Boumedine K, Bailly X, Gasqui P, Barry S, Jaffrelo L, Poncet C, Abrial D, Yang E, Animal diagnostic laboratories consortium, Leblond A, Rousset E, Jourdain E. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* reveals the circulation of three main genotype clusters in French ruminant farms. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* reveals the circulation of three main genotype clusters in French ruminant's farms. *Society for Veterinary, Epidemiology and Preventive Medicine*, March 16-17, 2016, Elsinore, Denmark.
- C5.** Joulié A., A. Fourcot, S. Barry, S. Masseglia, P. Gasqui, Agnès Leblond^{1,2}, R. Thiéry, E. Rousset, E. Jourdain, K. Sidi-Boumedine. qPCR-based determination of the number of IS1111 elements in the genome of *Coxiella burnetii* strains circulating in France. 26th *International Congress on Rickettsia and other Intracellular Bacteria*, June 19-21, 2017, Marseille, France.
- C6.** Joulié A., Yang E., Prigent M., Gasqui P., Bailly X., Leblond A., Rousset E., Jourdain E., Thiéry R., Sidi-Boumedine K. *In vitro* and *in vivo* infectivity of *Coxiella burnetii* strains from French livestock. 26th *International Congress on Rickettsia and other Intracellular Bacteria*, June 19-21, 2017, Marseille, France.

V. Communications orales dans des congrès francophones

- C7.** Joulié A., Jourdain E., Leblond A., Sidi-Boumedine K., Etude de la diversité génétique de la bactérie *Coxiella burnetii* dans les élevages de ruminants domestiques en France : virulence et spécificité d'hôtes. 12^{èmes} *rencontres des microbiologistes clermontois*, 9 Avril 2015, Clermont-Ferrand.
- C8.** Joulié A., Laroucau K., Bailly X., Prigent M., Gasqui P., Lepetitcolin E., Blanchard B., Rousset E., Sidi-Boumediene K., Jourdain E. Circulation de *Coxiella burnetii* dans un troupeau ovin lait naturellement infecté : dynamiques d'excrétion, contamination environnementale et diversité génotypique. *Rencontre Recherche Ruminants*, 2-3 décembre 2015, Paris.

VI. Séminaires (présentations invitées)

- S1.** Épidémiologie moléculaire de *Coxiella burnetii*, agent étiologique de la fièvre Q, chez les ruminants domestiques en France. *Séminaire biannuel de l'équipe Épidémiologie et Economie de la Santé Animale (EPIDEC) – UMR Interactions Hôtes – Agents Pathogènes*. 5 octobre 2015, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

- S2. Diversité génotypique de *Coxiella burnetii*, agent étiologique de la fièvre Q, chez les ruminants domestiques en France. *Journée de clôture du dispositif pilote de la fièvre Q en France*. 1^{er} décembre 2015, Maisons-Alfort.
- S3. Épidémiologie moléculaire de *Coxiella burnetii* dans les troupeaux de ruminants en France. *Journée des doctorants de l'école doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement de Clermont-Ferrand* (le 03 juin 2016 à Clermont-Ferrand) et *journée des doctorants de l'ANSES* (le 06 octobre 2016 à Maisons-Alfort).
- S4. Diversité génotypique et phénotypique de la bactérie *Coxiella burnetii* chez les ruminants domestiques et les chevaux en France. *Séminaire scientifique annuel de l'ANSES de Sophia-Antipolis*. 19 octobre 2016, Nice.
- S5. Etude des fièvres et fatigues inexplicables chez le cheval en Camargue et plaine de Crau - Focus sur la fièvre Q. *Restitution auprès des éleveurs et des vétérinaires partenaires des résultats obtenus suite aux campagnes d'échantillonnage réalisées en Camargue et plaine de Crau en 2015 et 2016*. 10 novembre 2016, Arles.

VII. Activités d'enseignement

Étudiants en spécialité Élevage et Systèmes de Productions (janvier 2016 et 2017) à l'école d'ingénieur agronome VetAgro Sup à Clermont-Ferrand. Module d'enseignement gestion sanitaire et connaissances des animaux (6 heures de cours) :

- 3h de cours magistral sur la gestion des avortements chez les animaux de rente (ruminants, équins, porcins)
- 3h de cours magistral sur la gestion du parasitisme chez les gros animaux de rente (ruminants, équins, porcins).

ANNEXE II : Répartition des échantillons sélectionnés pour l'étude génotypique MLVA par département et par espèce

Origines des échantillons		Échantillons inter-élevage			Échantillons intra-élevage			TOTAL par départ.	TOTAL par zone géog.
Zones géographiques	Départements	Bovins	Caprins	Ovins	Bovins	Caprins	Ovins		
Nord-ouest	Finistère	38	-	-	3	-	-	41	133
	Manche	53	-	-	-	-	-	53	
	Mayenne	33	-	-	6	-	-	39	
Centre-sud	Aveyron	2	10	33	-	2	6	53	60
	Gard	-	-	1	-	-	-	1	
	Hérault	-	-	1	-	-	-	1	
	Lozère	-	-	5	-	-	-	5	
Centre-ouest	Deux-Sèvres	8	27	6	-	15	-	56	106
	Charente-Maritime	2	4	-	-	-	-	6	
	Indre-et-Loire	3	6	-	1	1	-	11	
	Vienne	4	13	5	-	9	-	31	
	Vendée	-	2	-	-	-	-	2	
Hautes-Alpes	Hautes-Alpes	1	-	6	-	-	-	7	7
Puy-de-Dôme	Puy-de-Dôme	-	-	2	-	-	3	5	5
Saône-et-Loire	Saône-et-Loire	9	1	-	4	31	-	45	45
Pays Basque	Pyrénées-Atlantiques	7	-	16	-	-	3	26	26
	Hautes-Pyrénées	-	-	1	-	-	-	1	1
TOTAL		160	63	76	14	58	12	383	383

ANNEXE III : Répartition des échantillons restants pour l'étude du nombre de copies du gène IS1111 sur le génome de *C. burnetii* par département et par espèce

Origines des échantillons		Espèces			TOTAL par départ.	TOTAL par zone géog.
Zones géographiques	Départements	Bovins	Caprins	Ovins		
Nord-ouest	Finistère	40	-	-	40	121
	Manche	52	-	-	52	
	Mayenne	29	-	-	29	
Centre-sud	Aveyron	1	11	30	42	48
	Gard	-	-	1	1	
	Hérault	-	-	1	1	
	Lozère	-	-	4	4	
Centre-ouest	Deux-Sèvres	2	22	4	28	66
	Charente-Maritime	2	4	-	6	
	Indre-et-Loire	4	7	-	11	
	Vienne	2	15	2	19	
	Vendée	-	2	-	2	
Hautes-Alpes	Hautes-Alpes	-	-	6	6	6
Puy-de-Dôme	Puy-de-Dôme	-	-	5	5	5
Saône-et-Loire	Saône-et-Loire	12	32	-	44	44
Pays Basque	Pyrénées-Atlantiques	6	-	17	24	24
	Hautes-Pyrénées	-	-	1	1	1
TOTAL		151	92	71	314	314

ANNEXE IV : Autres publications en lien avec la thèse


www.elsevier.com/locate/micinf
Impact of IS1111 insertion on the MLVA genotyping of *Coxiella burnetii*

Karim Sidi-Boumedine^{a,*}, Véronique Duquesne^a, Myriam Prigent^a, Elise Yang^a,
Aurélien Joulié^b, Richard Thiéry^a, Elodie Rousset^a

^a Anses, Sophia-Antipolis Laboratory, Animal Q Fever Unit, Sophia-Antipolis, France

^b Unité d'Epidémiologie Animale UR0346, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Saint Genès Champanelle, France

Received 19 June 2015; revised 25 August 2015; accepted 25 August 2015

Available online 3 September 2015

Abstract

Q fever epidemiological investigations of the likely sources of contamination may involve *Coxiella burnetii* MLVA for direct and rapid typing from clinical samples. However, little information is available with regards to PCR amplification failures in *C. burnetii* MLVA typing. This paper focuses on difficulties encountered with MLVA loci that may impact the interpretation of MLVA data and shows that some loci may constitute hotspots for mutational events.

MLVA genotyping, using 17 different loci, was used on vaginal swabs (VS) from clinically infected animals as described elsewhere (Chmielewski et al., 2009). Amplicons of interest were sequenced and identified using the BLAST software by comparison with sequences available in GenBank.

All VS samples produced MLVA patterns. However, amplification failures or unexpected sizes amplicons (>to 1.5 kbp), making the interpretation of MLVA complicated, were also observed. Sequencing of these amplicons revealed the presence of IS1111 element insertion.

In this *C. burnetii* MLVA study some difficulties encountered with genotyping are highlighted and the role of IS1111 element in genome plasticity is confirmed. Finally, the need for the selection of a set of VNTRs for an efficient MLVA scheme and the question of standardization and harmonization for comparable MLVA typing data are raised again.

© 2015 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Q fever; *Coxiella burnetii*; MLVA genotyping; IS1111 element insertion; Standardization and harmonization of MLVA typing

1. Introduction

The intracellular bacterium *Coxiella burnetii* is the agent of Q fever, a worldwide distributed zoonosis, with the exception of New Zealand.

In humans two clinical forms of Q fever can be observed; an acute disease, most often asymptomatic or resembling a flu-like syndrome, and a chronic disease, which may present either soon (within 6 weeks) after an acute infection or years later. Usually it manifests as an endocarditis or granulomatous hepatitis. Some patients exposed to Q fever may develop a

chronic fatigue syndrome. In addition, *C. burnetii* infection can lead to abortions, stillbirth, or pre-mature deliveries in pregnant women [1].

The large reservoir of *C. burnetii* includes mammals, birds, and arthropods, mainly ticks. Generally, the clinical expression of Q fever is nonspecific in most animals, with the exception of ruminants where *C. burnetii* is responsible for late term-abortion, mortinatalité, prematurity and low birth weight [2]. Domestic ruminants are considered to be the main source of transmission to humans as they shed *C. burnetii* in feces, and birth products. High concentrations of *C. burnetii* are found in infected animal's birth products, such as placenta and vaginal secretions.

Most human cases follow direct or indirect exposure to livestock and could be attributed to the breeding practices,

* Corresponding author.

E-mail address: Karim.SIDI-BOUMEDINE@anses.fr (K. Sidi-Boumedine).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2015.08.009>

1286-4579/© 2015 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

such as lambing and shearing. The infection occurs after inhalation of contaminated aerosols. Therefore human cases or outbreaks are considered as an indicator for the disease activity, leading to reinforcement for the investigation of the likely source [2].

Q fever is endemic in most European countries. Outbreaks in urban or residential areas involving, more or less, large numbers of human cases can be observed (Bulgaria, The Netherlands, Germany) and linked to small ruminant flocks [3]. The Q fever outbreak in the Netherlands, one of the largest Q fever outbreaks in the world, involving 4000 human cases in 4 successive years, should serve as a warning signal. It highlights how zoonoses, such as Q fever, may represent a public health threat also for urban populations and emphasizes the need for strengthening control measures against this emerging problem. Thus, the implementation, development and standardization of detection and genotyping methods are crucial for the prevention and control of this zoonosis.

Fast fingerprinting of *C. burnetii* isolates using molecular genotyping tools is essential for epidemiological surveys from different geographical areas or hosts. To date, two MLVA schemes have been described [4,5]. MLVA is depicted as being highly discriminatory allowing the identification of up to 36 distinct genotypes [5]. As a PCR-based method, theoretically, MLVA can be used for direct and rapid typing of *C. burnetii* from clinical samples without the need of isolating this fastidious intracellular bacterium.

However, so far, few studies have used the same MLVA schemes or marker panels for *C. burnetii* genotyping from field clinical samples, thus there is a lack of standardisation. Moreover, difficulties for obtaining complete MLVA patterns for some samples were observed and little information is available with regards to PCR amplification failures in *C. burnetii* MLVA typing. This paper, mainly, focuses on difficulties that could be encountered with three MLVA loci due to mutational events that may impact the interpretation of MLVA data used for epidemiologic investigations.

2. Material and methods

2.1. Samples and bacterial strains

A set of vaginal swabs (VS) from clinically infected goat herds were selected to realize the genotyping of *C. burnetii* by MLVA. These samples are part of a larger study aiming at describing the genotypes of strains circulating in France [6] and they originate, more specifically, from a follow up study of three dairy goat flocks. These flocks experienced Q fever abortion waves, confirmed by at least two *C. burnetii* PCR-positive in aborted animals and negative results for other abortive pathogens. Sampling of vaginal swabs was performed on the day of kidding [7].

The *C. burnetii* Nine Mile strain (NM) was used as reference control and was included in all the experiments to normalize the count of repetitions in each assay and to compare the MLVA profiles.

2.2. DNA extraction

Total genomic DNA from the *C. burnetii* Nine Mile strain and VS was extracted using the “Dneasy Blood and Tissue kit” (Qiagen, Courtaboeuf, France), following the manufacturer's instructions. DNA samples were stored at -20°C until needed.

2.3. MLVA genotyping

MLVA typing was performed using 17 MLVA loci for the PCR amplification of *C. burnetii* VNTR loci, which primer's sequences were described elsewhere [5]. The PCR cycling conditions used, were reported elsewhere [8].

The PCR products were run on 4% high resolution agarose gel or on the Agilent's 2100 Bioanalyzer. This latter was performed using DNA 1000 or 7500 Labchip Kit according to the amplification product size and to the manufacturer's protocol (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Briefly, each DNA 1000 or 7500 chip contains 16 wells: 12 for the samples, 3 for gel mix and 1 for the DNA ladder. The gel matrix containing intercalating dye, from the DNA 1000 or 7500 Labchip Kit, was prepared following manufacturer's protocol and added on the chip in the corresponding wells. Then all the wells (each sample and the ladder well) were loaded with 5 μL of an internal marker. Finally 1 μL of each sample and 1 μL of ladder were deposited in the corresponding wells. For separation of the fragments the chip was inserted into Agilent 2100 Bioanalyzer. The samples were analyzed sequentially and each lasted 35 min.

Differences in PCR products were analysed with Quantity One – 1D Analysis Software (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) or the Agilent's 2100 expert software (Agilent Technologies, Les Ulis, France).

For ease of interpretation and number of repeat units estimation: a reference control strain Nine Mile for which the expected MLVA pattern is known was included in all the experiments, and two size ladders (the 100 pb ladder (Invitrogen_Life Technologies, Saint Aubin, France) and the Simplyload 20 pb DNA ladder (Lonza, Levallois-Perret, France) arranged regularly were included for agarose gel electrophoresis.

2.4. Sequencing

Following amplification, amplicons of interest were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol with slight modification. DNA was eluted with deionised water, instead of the kit's elution buffer.

Sequencing was subcontracted to external services (MilGen sequencing service, Labège, France and Beckman Coulter Genomics, Essex, United Kingdom). It consisted of DNA sequencing, of purified amplicons, following the dideoxy chain-termination procedure. The chromatograms were manually inspected, cleaned and analyzed with either BioEdit

v. 7.0.5.3 or Vector NTI v. 11 and identified with the BLAST software by comparison with sequences available in GenBank. The sequences obtained in this study have been deposited in GenBank (Accession numbers KT391013–KT391016, KT391009–KT391012 and KT391017–KT391020 for MLVA locus ms23, ms26 and ms33 respectively).

3. Results

As part of a larger epidemiologic study to describe the genotypes of strains circulating in France using MLVA typing, we faced some difficulties in amplifying three loci: ms23, ms26 and ms33 [6]. These MLVA markers, producing no amplicons or unexpected large sizes (Fig. 1), were further analysed.

The MLVA typing was performed using both panel markers (panel 1 and 2), representing 17 different loci, described by Arricau-Bouvery et al., 2006, and revealed a good level of discrimination between the *C. burnetii* positive samples [6]. However, incomplete patterns were observed for some samples. For instance, the amplification of specific *C. burnetii* products was achieved for some VS samples at the level of 14/17 loci [6]. For three loci: ms23, ms26 and ms33 (Fig. 1), the results were either absence of amplification (ms26 and ms23) or presence of amplicons with unexpected sizes which was superior to 1500 pb (ms23 and ms33) when compared to the reference NM amplicon after agarose gel electrophoresis and indicated by the red arrows (Fig. 1A). Due to low DNA volumes, the electrophoretic patterns observed on agarose gel

were confirmed on the Agilent's 2100 Bioanalyzer only for some of the amplicons (Fig. 1B). These results were repeatedly observed with these samples despite multiple amplification attempts. Therefore the interpretation of MLVA patterns was complicated.

The sequencing results, obtained for some samples showing amplicons with unusually large sizes, i.e. ms23 and ms33 markers (GenBank accession numbers KT391013–KT391016 and KT391017–KT391020 respectively), revealed the presence of an *IS1111* element inserted in front of the tandem repeats, between the two primers in all sequenced cases (Fig. 2). A detailed analysis of the Nine Mile sequence of ms23 and ms33 revealed the presence of 7 bp motif corresponding to the recognition site for the insertion element *IS1111*. This motif is fully conserved in ms33 and showed a one point mutation in ms23 (Fig. 2).

Regarding, locus ms26 this latter was characterised by a lack of amplification. Sequence investigations of flanking regions; GenBank accession numbers KT391009–KT391012; revealed the presence of a deletion that included the ms26 loci sequence and thus led to the amplification failure of this marker (Fig. 3).

Besides, as a collateral finding, in an attempt to elucidate discrepancies found between amplicon size estimations obtained by agarose gel electrophoresis versus 2100 Bioanalyzer analysis, the sequencing of ms20 and ms36 loci revealed the overlapping of these two markers making the coding of the number of repeats particularly difficult or unexploitable for ms36 (Fig. 4).

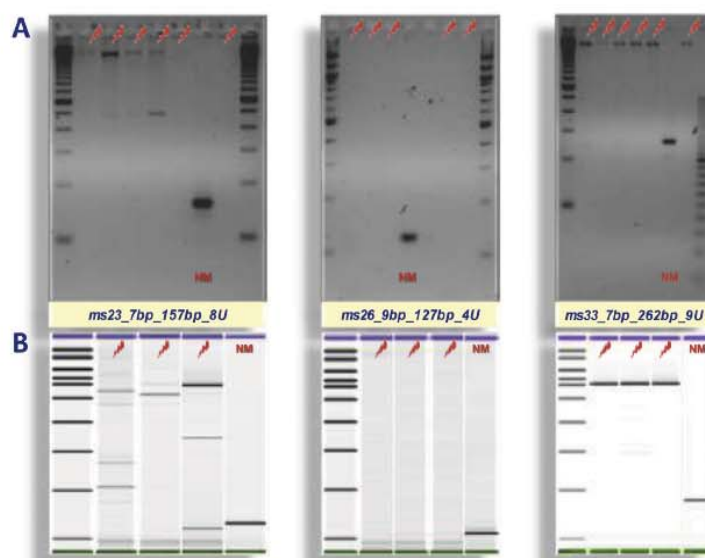


Fig. 1. MLVA profiles obtained for three MLVA markers ms23, ms26 and ms33: A) 4% agarose gel and B) Agilent's 2100 Bioanalyzer. The reference NM is included as a control in each assay to normalize the count of repetitions and to compare the MLVA profiles. Red arrows indicate unexpected results: absence of amplification (ms26) and/or presence of amplicons with sizes superior to 1500 pb (ms23 and ms33). Due to low DNA volumes only some samples were re-analyzed using Agilent's 2100 Bioanalyzer).

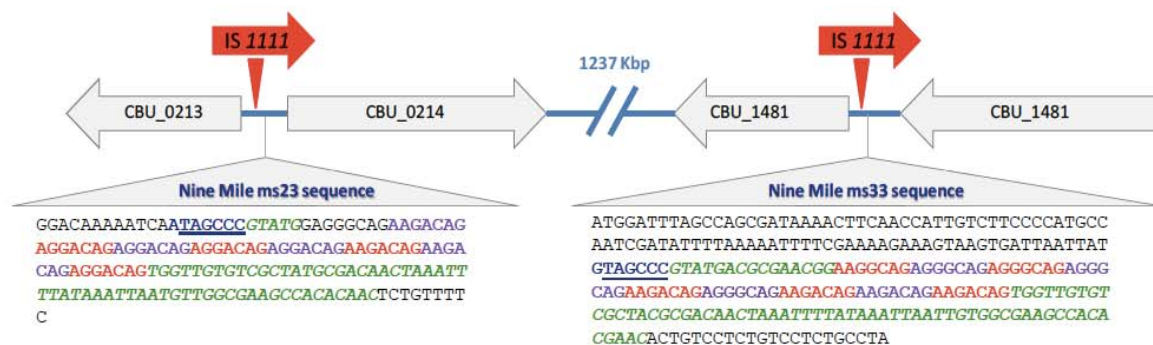


Fig. 2. Schematic representation of the sequencing results of the amplicons of unexpected size (>to 1.5 kbp) for ms23 and ms33. Sequence details of the reference strain are highlighted: the 7 bp motif corresponding to the recognition site for the insertion element IS1111 is in bold and underlined. The tandem repeat motif sequence is indicated by the red and blue colours. Also similarities between the sequences are italicised and in green colour. GenBank accession numbers KT391013-KT391016 and KT391017-KT391020 for MLVA locus ms23 and ms33 respectively.

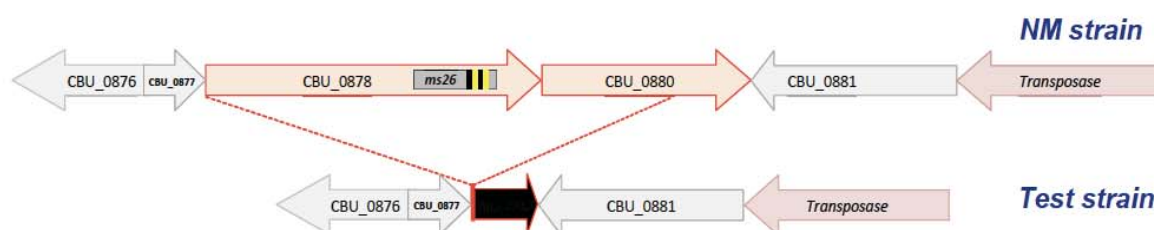


Fig. 3. Schematic representation of the sequencing results of the flanking ms26 region. Comparison between Nine Mile and test strains revealed the deletion of two genes CBU_0878 (including the ms26 marker) and CBU_0880. GenBank accession numbers KT391009-KT391012.

4. Discussion

MLVA is actively implemented in laboratories for *C. burnetii* genotyping, particularly in the veterinary field. However, lack of standardisation and harmonisation was confirmed in

routine practices, which make its use difficult as a robust *C. burnetii* typing scheme [9].

Moreover, the presence of PCR products of unexpected size (larger than the upper limit of the size standard) and/or of amplification failures are rarely discussed or more deeply

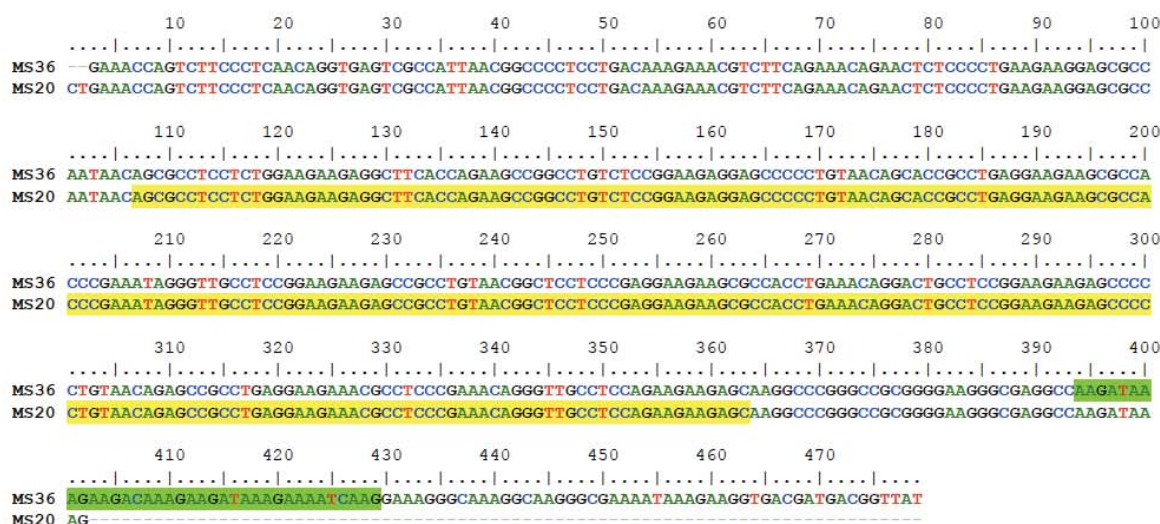


Fig. 4. VNTR loci ms36 and ms20 sequence alignment. The repeats are highlighted in green for ms36 and in yellow for ms20 respectively.

investigated. So, as little information is available with regards to these PCR problems, the interpretation of the MLVA typing profiles can be difficult.

The first published experiments describing or using the MLVA schemes were performed on purified DNA from established strains [4,5] or on DNA from cultivated isolates [8]. As such, these studies were not confronted to difficulties that can be found when dealing with clinical field samples, such as amplification failures leading to incomplete MLVA patterns and making MLVA interpretation difficult. Indeed, amplification failures or incomplete patterns were described in several *C. burnetii* MLVA genotyping publications [10–20].

In some studies the rate of partial genotypes can be very high. This rate ranged from 22% [14,15,20] to 78% [11] of the typeable samples.

This report shed light on some difficulties encountered when MLVA is implemented. It would help for the interpretation of MLVA data for epidemiologic investigations or in the choice of loci to be used. It revealed that ms23 and ms33 are targeted by IS1111 element (Fig. 2). They both harbour the recognition site for the insertion element IS1111 in front of the repeat units and thus may constitute privileged targets for IS1111. So, the role of IS1111 element in *C. burnetii* genomic plasticity is supported by these data.

Moreover, this work, shows that a deletion, occurring between CBU_0877 and CBU_0881, results in the loss of ms26, which explains the amplification failures that might be observed at this marker during MLVA typing (Fig. 3).

The sequence alignment of ms20 and ms36 revealed that locus ms36 comprises the full sequence of locus ms20. Thus ms36 primers amplify both loci and the size of the obtained PCR product may be due to variations at the 9 bp motif of ms36, the 18 bp motif of ms20 or at both (Fig. 4). Hence, interpretation errors could be possible and comparisons with data obtained for this locus in previous studies should be performed with caution [8,11,20]. To prevent misinterpretation it is strongly advisable to carefully analyse the results obtained with these two loci.

5. Conclusion

A number of inconsistencies and/or difficulties are faced when implementing *C. burnetii* MLVA typing in routine practice. Also there is a lack of standardisation and harmonisation for the used *C. burnetii* MLVA scheme typing. This was illustrated by the outcome of an interlaboratory comparison with 7 European participants [9]. Since, significant improvements and recommendations were described (<http://mlva.u-psud.fr/MLVAnet/spip.php?rubrique50>) and, we strongly believe, should be better publicised and explained to the *C. burnetii* research community.

In this report light was shed, regarding some other difficulties encountered when MLVA is implemented, that would help for the interpretation of MLVA data for epidemiologic investigations. Finally, along with previous observations, it raises again the need regarding choice of VNTRs loci for an

efficient MLVA scheme and the question of standardisation and harmonization for secured comparable *C. burnetii* MLVA typing data.

Conflicts of interest statement

The authors declare that they have no conflicts of interest associated with this publication.

References

- [1] Maurin M, Raoult D. Q fever. Clin Microbiol Rev 1999;12:518–53.
- [2] Cutler SJ, Bouzid M, Cutler RR. Q fever. J Infect 2007;34:313–8.
- [3] Sidi-Boumedine K, Rousset E, Henning K, Ziller M, Niemczuck K, Roest HJ, et al. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. 2010. p. 48. EFSA Scientific Report on question No EFSA-Q-2009-00511.
- [4] Svraka S, Toman R, Skultety L, Slaba K, Homan WL. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. FEMS Microbiol Lett 2006;254:268–74.
- [5] Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier CC, Souriau A, et al. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. BMC Microbiol 2006;6:38.
- [6] Prigent M, Rousset E, Yang E, Thierry E, Sidi-Boumedine K. Validation study for using lab-on-chip technology for *Coxiella burnetii* multi-locus VNTR-analysis (MLVA) typing. application for studying genotypic diversity of domestic ruminants' strains in France. Microb Infect 2015.
- [7] de Cremoux, Rousset E, Touratier A, Audusseau G, Nicolle P, Ribaud D, et al. *Coxiella burnetii* vaginal shedding and antibody responses in dairy goat herds in a context of clinical Q fever outbreaks. FEMS Immunol Med Microbiol 2012;64:120–2.
- [8] Chmielewski T, Sidi-Boumedine K, Duquesne V, Podsiadly E, Thierry R, Tylewska-Wierzbanska S. Molecular epidemiology of Q fever in Poland. Pol J Microbiol 2009;58:9–13.
- [9] de Bruin A, van Alphen PT, van der Plaats RQ, de Heer LN, Reusken CB, van Rotterdam BJ, et al. Molecular typing of *Coxiella burnetii* from animal and environmental matrices during Q fever epidemics in the Netherlands. BMC Vet Res 2012;8:165.
- [10] Klaassen CH, Nabuurs-Franssen MH, Tilburg JJ, Hamans MA, Horrevorts AM. Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. Emerg Infect Dis 2009;15:613–4.
- [11] Roest HJ, Ruuls RC, Tilburg JJ, Nabuurs-Franssen MH, Klaassen CHW, Vellema P, et al. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in the Dutch Q fever outbreak. Emerg Infect Dis 2011;17.
- [12] Santos AS, Tilburg JJ, Botelho A, Barahona MJ, Nuncio MS, Nabuurs-Franssen MH, et al. Genotypic diversity of clinical *Coxiella burnetii* isolates from Portugal based on MST and MLVA typing. Int J Med Microbiol 2012;302:253–6.
- [13] Tilburg JJ, Rossen JW, van Hanne EJ, Melchers WJ, Hermans MH, van de Bovenkamp J, et al. Genotypic diversity of *Coxiella burnetii* in the 2007–2010 Q fever outbreak episodes in The Netherlands. J Clin Microbiol 2012;50:1076–8.
- [14] Astobiza I, Tilburg JJ, Pinero A, Hurtado A, Garcia-Perez AL, Nabuurs-Franssen MH, et al. Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants in northern Spain. BMC Vet Res 2012;8:241.
- [15] Reichel R, Mearns R, Brunton L, Jones R, Horigan M, Vipond R, et al. Description of a *Coxiella burnetii* abortion outbreak in a dairy goat herd, and associated serology, PCR and genotyping results. Res Vet Sci 2012;93:1217–24.
- [16] Sulyok KM, Kreizinger Z, Hornstra HM, Pearson T, Szigeti A, Dan A, et al. Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants and human in Hungary: indication of various genotypes. BMC Vet Res 2014;10:107.
- [17] Gyuranecz M, Sulyok K, Balla E, Mag T, Balazs A, Simor Z et al. Q fever epidemic in Hungary, April to July 2013. Euro Surveill 2014; 19:

- [18] Sulyok KM, Hornok S, Abichu G, Erdelyi K, Gyuranecz M. Identification of novel *Coxiella burnetii* genotypes from Ethiopian ticks. *PLoS One* 2014;9. e113213.
- [19] Boarbi S, Mori M, Rousset E, Sidi-Boumedine K, Van EM, Fretin D. Prevalence and molecular typing of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk in Belgian dairy goats, 2009–2013. *Vet Microbiol* 2014;170:117–24.
- [20] Racic I, Spicic S, Galov A, Duvnjak S, Zdelar-Tuk M, Vujnovic A, et al. Identification of *Coxiella burnetii* genotypes in Croatia using multi-locus VNTR analysis. *Vet Microbiol* 2014;173:340–7.

TITRE ET RESUME

Diversité génotypique et phénotypique de la bactérie *Coxiella burnetii* chez les ruminants domestiques et les chevaux en France

La fièvre Q est une zoonose de répartition mondiale due à une bactérie intracellulaire stricte, *Coxiella burnetii*. Les ruminants domestiques contaminent l'environnement en excréant la bactérie principalement dans les produits de parturition, le mucus vaginal et les fèces. L'Homme et l'animal s'infectent ensuite par inhalation de pseudo-spores circulantes dans l'environnement.

Des enjeux de santé publique et vétérinaires ont ainsi motivés la mise en place de ce projet de thèse afin de mieux maîtriser les infections par *C. burnetii* dans les élevages. Les objectifs de ce travail étaient de produire des connaissances épidémiologiques descriptives sur : (a) la dynamique de circulation de *C. burnetii* en élevage ovin naturellement infecté ; (b) la diversité génotypique des souches de *C. burnetii* circulantes dans les élevages de ruminants domestiques en France ; (c) la diversité phénotypique de ces souches *via* l'utilisation de deux modèles de virulence, un *in vivo* et un *in vitro* ; et (d) l'implication du cheval dans l'épidémiologie de la fièvre Q, en étudiant son exposition à *C. burnetii* ainsi qu'une potentielle symptomatologie.

Le suivi longitudinal réalisé en élevage ovin a permis de fournir des indicateurs pertinents à utiliser pour évaluer rapidement le risque de transmission de *C. burnetii* en contexte infectieux, en termes de lots d'animaux, d'outils diagnostics ou encore de périodes d'échantillonnage à privilégier. Par ailleurs, nous avons également identifié trois grands clusters génotypiques de souches circulantes dans les élevages de ruminants domestiques en contexte d'avortement fièvre Q en France. Deux clusters génotypiques regroupent majoritairement les petits ruminants, dont un principalement les ovins et l'autre les caprins. Le troisième cluster génotypique est composé quasi-exclusivement de bovins. Nous avons montré que le gène *IS1111* impacte significativement la diversité génotypique MLVA observée. Nous avons également montré qu'en plus d'une spécificité d'espèce, les génotypes circulants en France sont stables d'un point de vue spatio-temporel. Pour l'étude phénotypique, nous avons mis au point deux modèles d'infection, l'un *in vivo* par inoculation dans le coussinet plantaire de souris mâle CD1 et l'autre *in vitro* par infection de deux lignées cellulaires macrophagiques : l'une bovine (SV40) et l'autre ovine (MoCl4). Ces modèles nous ont permis d'identifier 4 clusters phénotypiques, qui n'étaient pas systématiquement corrélés aux trois clusters génotypiques, identifiés *in vivo* à partir de l'analyse de la charge bactérienne dans la rate de souris, ni aux cinétiques de multiplication de *C. burnetii* observés *in vitro*. Enfin, les séroprévalences obtenues chez le cheval dans une zone considérée hyperendémique pour l'Homme (Camargue et Plaine de La Crau) suggèrent que les chevaux sont exposés à la fièvre Q dans cette région et pourrait éventuellement être utilisés comme des indicateurs pertinents du risque zoonotique. Néanmoins, nos résultats ne nous permettent pas de conclure sur les formes cliniques potentiellement associées à la fièvre Q chez le cheval.

À l'avenir, les résultats obtenus dans ce travail de thèse permettront une meilleure compréhension de la dynamique de circulation et des conséquences de l'infection par *C. burnetii* en élevages de ruminants domestiques et de chevaux. Ces données permettront *in fine* d'améliorer la surveillance, le diagnostic ainsi que la mise en œuvre de mesures de gestion sanitaire de la fièvre Q en santé publique et vétérinaire.

Mots clés : Fièvre Q, brebis, vaches, chèvres, chevaux, MLVA, virulence, surveillance

TITLE AND SUMMARY

Genotypic and phenotypic diversity of the bacterium *Coxiella burnetii* in domestic ruminants and horses in France

Q fever is a worldwide zoonosis, due to a strict intracellular bacterium: *Coxiella burnetii*. Domestic ruminants mainly shed the bacteria in parturition products, vaginal mucus and feces. Humans and animals infect by inhalation of circulating pseudo-spores into the environment.

Public and veterinary health issues therefore motivated the implementation of this PhD project in order to better control *C. burnetii* infections on farms. The objectives of this thesis were to provide descriptive epidemiological findings about: (a) circulation dynamics of *C. burnetii* in a naturally infected flock of sheep; (b) the genotypic diversity of circulating *C. burnetii* strains on domestic ruminant farms in France; (c) the phenotypic diversity of these strains as demonstrated by the use of two virulence models, one *in vivo* and one *in vitro*; and (d) the involvement of horses in the epidemiology of *C. burnetii*, by studying their exposure and a potential symptomatology.

Longitudinal follow-up in a flock of sheep provided relevant tools to rapidly assess the risk of *C. burnetii* transmission when a flock was identified as infected, in terms of animal pens, diagnostic tools, or sampling periods to be preferred. We also identified three main genotypic groups of circulating strains in domestic ruminant farms in France where Q fever abortion were recorded. Two genotypic groups mainly included small ruminants, with one group mainly composed of sheep and the other mainly composed of goats. The third genotypic group was comprised almost exclusively of cattle. We have shown that the *IS1111* gene significantly impacts the genotypic MLVA diversity observed. In addition to this species specificity, we have shown that the circulating genotypes in France were also spatiotemporally stable. We then developed two models of infection, one *in vivo* by inoculating CD1 male mice in the footpad of and one *in vitro* by infecting two macrophage cell lines: one bovine (SV40) and one ovine (MoCl4). These two models allowed us to show that the genotypic clusters were not systematically correlated with both the four phenotypic clusters identified *in vivo* from the analysis of the bacterial load in the mouse spleens and the analysis *in vitro* of the *C. burnetii* multiplication kinetics.

Finally, the seroprevalence observed in horses within hyperendemic areas for Q fever in humans (Camargue and Plain of La Crau) suggests that horses are exposed to the bacteria in the area and that they may be a relevant indicator of the zoonotic risk. Nevertheless, our results were inconclusive on the clinical forms associated with Q fever in horses.

In the future, the findings found in our work will allow a global understanding of the circulation dynamics of *C. burnetii* on domestic ruminant farms as well as in others animal species. Thus, all these data will ultimately improve surveillance, diagnosis and management of Q fever in public and veterinary health.

Keys words: Q fever, sheep, cattle, goats, horses, MLVA, virulence, surveillance

Unités d'accueil : UMR0346 - Épidémiologie des Maladies Animales et Zoonotiques, INRA Auvergne-Rhône-Alpes, Route de Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle & VetAgro Sup, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy L'Etoile / Unité fièvre Q animale, ANSES Sophia Antipolis, 105 Route des Chappes, 06902 Sophia Antipolis.