



HAL
open science

Coxiella burneti dans les poussières de bâtiments d'élevage de ruminants domestiques : étude transversale répétée dans la région de Niort et mise au point d'une méthode de géotypage

Marion Larribe, Elsa Jourdain

► To cite this version:

Marion Larribe, Elsa Jourdain. Coxiella burneti dans les poussières de bâtiments d'élevage de ruminants domestiques : étude transversale répétée dans la région de Niort et mise au point d'une méthode de géotypage. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. hal-03318649

HAL Id: hal-03318649

<https://hal.inrae.fr/hal-03318649>

Submitted on 10 Aug 2021

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License



Faculté de Médecine
Master Santé publique 2e année
Zoonoses et Environnement

2020/2021

***Coxiella burnetii* dans les poussières de bâtiments
d'élevage de ruminants domestiques : étude transversale
répétée dans la région de Niort et mise au point d'une
méthode de génotypage**

Marion LARRIBE

Stage effectué du 4 janvier au 30 juin 2021

Centre INRAE Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes

UMR EPIA – Épidémiologie des maladies animales et zoonotiques

Site de Theix

Stage encadré par

Elsa JOURDAIN

Chargée de Recherche



Remerciements

Je remercie Xavier BAILLY, directeur de l'Unité Mixte de Recherche Épidémiologie des maladies animales et zoonotiques (UMR EPIA) pour m'avoir accueilli au sein de l'unité.

Elsa JOURDAIN, chargée de recherche et maître de stage pour m'avoir permis de réaliser ce stage ainsi que pour son encadrement et sa bienveillance.

Je remercie également David ABRIAL, ingénieur d'étude, pour son accompagnement lors des analyses statistiques et Aminah KELIET, ingénieur d'étude, pour la création des alignements de génomes utilisés pour le design des marqueurs. Enfin, je remercie Séverine BARRY, technicienne de recherche, pour son partage des connaissances en laboratoire.

Pour finir, je tiens à remercier l'ensemble des acteurs participant à ce volet du projet EXPAIRCOX ;

- L'Anses de Niort et les GDS des départements 79 et du 85 pour leur participation aux prélèvements et à la création de la base de données ;
- Le laboratoire d'analyse Qualyse pour avoir réalisé les extractions d'ADN et les qPCR ;
- Le LNR fièvre Q à l'Anses de Sophia Antipolis pour avoir fourni les matériaux de référence pour les analyses ainsi que les séquences de génome complet utilisées pour le design des amorces PCR pour le génotypage ;
- La plateforme génome-transcriptome de Bordeaux pour avoir réalisé les ddPCR

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Liste des abréviations

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ddPCR : PCR digitale

GDS : Groupement de Défense Sanitaire

ICD : Isocitrate dehydrogenase

IGN : Institut national de l'information géographique et forestière

IS1111 : Séquence d'insertion 1111

qPCR : PCR quantitative en temps réel

LD : Limite de détection

LQ : Limite de quantification

LNR : Laboratoire National de Référence

MLVA : Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats

MST : Multispacer Sequence Typing

SNP : Single nucleotide polymorphism

TM : Température de fusion

Coxiella burnetii dans les poussières de bâtiments d'élevage de ruminants domestiques : étude transversale répétée dans la région de Niort et mise au point d'une méthode de génotypage

La fièvre Q est une maladie zoonotique de distribution mondiale causée par la bactérie *Coxiella burnetii*. Les ruminants domestiques sont les principaux réservoirs et la principale source des infections humaines par voie aérienne. Début juin 2017, une augmentation inhabituelle des cas humains de fièvre Q en région niortaise a été observée. La présente étude a pour objectif d'évaluer la situation épidémiologique des élevages caprins, ovins et bovins de cette région en utilisant comme indicateurs des prélèvements de poussières effectués dans les bâtiments d'élevage.

Pour chaque espèce de ruminant, 100 ateliers ont été tirés au sort et ont fait l'objet en 2018 et 2019 d'un prélèvement de poussières avec une chiffonnette. Chaque échantillon a été analysé en PCR quantitative et digitale. Après constitution d'une base de données, des analyses univariées ont été réalisées pour identifier d'éventuels facteurs associés à la positivité et la charge bactérienne des chiffonnettes. Enfin, une méthode de génotypage, basée sur le séquençage de 16 marqueurs MLVA et 10 marqueurs MST, a été développée pour caractériser les échantillons positifs. Les marqueurs et couples d'amorces publiés ont été retravaillés pour les adapter à la méthodologie utilisée et augmenter leur pouvoir discriminant. Ils ont ensuite été testés sur une souche de référence et sur des poussières.

Les résultats obtenus avec les deux méthodes de PCR étaient corrélés mais la PCR digitale s'est avérée mieux adaptée aux analyses sur poussières, en permettant de s'affranchir des problèmes d'inhibition PCR. Parmi les facteurs explorés, l'espèce du bâtiment prélevé et la présence de caprins sur le site des ateliers bovins étaient statistiquement associées à la positivité des chiffonnettes et aux charges estimées. Enfin, toutes les amorces testées ont amplifié les marqueurs attendus.

En perspective de ce travail, un modèle multivarié incluant l'ensemble des facteurs explorés et les données de typages va être construit.

Mots-clés : *Coxiella burnetii*, fièvre Q, prélèvements environnementaux, MLVA, MST

Coxiella burnetii in dust sampled from domestic ruminant buildings: repeated cross-sectional study in the Niort region and development of a genotyping method

Q fever is a zoonotic disease of worldwide distribution caused by the bacterium *Coxiella burnetii*. Domestic ruminants are the main reservoirs of the disease and the main source of human infections, which are essentially airborne. In June 2017, an increase in the number human Q fever cases in the Niort region was observed. The objective of the present study is to assess the epidemiological situation of goat, sheep and cattle farms in this region using dust sampled from livestock buildings as an indicator.

For each ruminant species, 100 herds from the study area were randomly selected. Dust was sampled from the corresponding farm buildings using a swab-cloth in 2018 and 2019. Each dust sample was analyzed by quantitative and digital PCR. A database was built and univariate analyzes performed to identify factors potentially associated with swab-cloth positivity and bacterial load. Finally, a genotyping method, based on the sequencing of MLVA and MST markers, was developed to characterize the positive samples. The published markers and primer pairs were adapted to fit with the methodology used and gain in discriminatory power. They were then tested on a reference strain and on dust samples.

The results obtained with both PCR methods were satisfactorily correlated but digital PCR proved better suitable for use on dust samples because of the absence of PCR inhibition. Among the potential factors explored, the ruminant species present in the building sampled and, for ovine and cattle farms, the presence of goats on the farm, were statistically associated with swab-cloth positivity and estimated bacterial loads. Finally, all pairs of primers successfully amplified the targeted markers.

A perspective this work will consist in building a multivariate model including all the factors explored and the genotyping data.

Keywords : *Coxiella burnetii*, Q fever, environmental samples, MLVA, MST

Table des matières

| | |
|--|----|
| 1. Introduction | 8 |
| 2. Matériels et méthodes..... | 10 |
| 2.1. Étude transversale répétée sur poussières de bâtiments d'élevage..... | 10 |
| 2.1.1. Collecte des données | 10 |
| 2.1.2. Détection et quantification de l'ADN de <i>C. burnetii</i> | 12 |
| 2.1.3. Constitution d'une base de données..... | 14 |
| 2.1.4. Analyses descriptives et statistiques des résultats..... | 15 |
| 2.2. Mise au point d'une méthode de génotypage haut débit applicable aux poussières de bâtiment d'élevage | 16 |
| 2.2.1. Choix des marqueurs..... | 17 |
| 2.2.2. Mise au point des amorces..... | 17 |
| 2.2.3. Préparation des échantillons..... | 18 |
| 3. Résultats..... | 19 |
| 3.1. Données disponibles | 19 |
| 3.2. Comparaison des méthodes qPCR et ddPCR | 19 |
| 3.3. Description des charges estimées en qPCR..... | 21 |
| 3.4. Facteurs associés aux charges estimées | 25 |
| 3.4.1. Présence d'une autre espèce de ruminant sur le site de l'atelier tiré au sort | 25 |
| 3.4.2. Effectif de l'atelier..... | 26 |
| 3.4.3. Densité par commune de ruminants domestiques et d'ateliers | 27 |
| 3.4.4. Préleveur..... | 28 |
| 3.4.5. Date de prélèvement..... | 29 |
| 3.4.6. Données collectées par questionnaire..... | 29 |
| 3.5. Résultats des essais des amorces PCR pour génotypage | 31 |
| 4. Discussion..... | 34 |
| 4.1. Intérêt d'une approche par ddPCR ciblant les gènes IS1111 et ICD | 34 |
| 4.2. Facteurs associés aux charges estimées | 35 |
| 4.3. Une approche de génotypage prometteuse | 39 |
| 4.4. Le prélèvement des poussières des bâtiments d'élevage est-il un bon indicateur de la circulation de <i>C. burnetii</i> ?..... | 40 |
| 5. Conclusion et perspectives | 42 |
| Implication personnelle | 43 |
| Références bibliographiques | 45 |
| Annexes | 51 |

1. Introduction

La fièvre Q est une maladie zoonotique de distribution mondiale (à l'exception de la Nouvelle Zélande) causée par la bactérie *Coxiella burnetii*. Découverte en 1937 en Australie chez des travailleurs en abattoir (1). L'agent de la fièvre Q appartient à la famille des Coxiellaceae. C'est une bactérie non cultivable intracellulaire stricte dont les principales cellules cibles sont les macrophages. Lorsque la bactérie se retrouve dans l'environnement, son état de pseudo-spore lui permet de résister aux conditions environnementales difficiles. De plus, cette forme est responsable de la dissémination de la bactérie (2).

Réservoir animal et transmission zoonotique

De nombreuses espèces animales sont réservoirs de cette bactérie (mammifères, oiseaux, reptiles) et les arthropodes peuvent être des vecteurs. Cependant les ruminants domestiques (caprins, ovins, bovins) représentent le réservoir et la source principale des infections humaines (3).

L'infection chez la plupart des animaux est asymptomatique avec pour conséquence un diagnostic difficile. Elle peut également occasionner des troubles de la reproduction, des avortements (expulsion avant terme d'un fœtus, mort ou vivant ou une mise-bas à terme, d'un nouveau-né qui meurt dans les 48 heures suivant la naissance, à l'exclusion des avortements d'origine manifestement accidentelle). La bactérie est essentiellement excrétée dans les produits d'avortements et de mise-bas, les sécrétions génitales et les déjections. La contamination environnementale peut être particulièrement importante pendant les périodes de mise-bas des caprins et des ovins (4).

La contamination humaine se fait par inhalation d'aérosols ou de poussières contaminés. Elle peut également se faire par voie directe lors d'un contact avec des animaux infectés. Les voies digestives et cutanées restent exceptionnelles et la contamination interhumaine est rare (3).

Fièvre Q chez les humains

L'expression clinique chez les humains est polymorphe. L'infection est suivie d'une séroconversion pouvant être asymptomatique ou entraîner une maladie très invalidante. On observe deux formes cliniques de la maladie, la fièvre Q aiguë et la fièvre Q chronique. La fièvre Q aiguë est essentiellement asymptomatique. Cependant elle peut se manifester par un syndrome grippal, une hépatite ou une pneumonie. La fièvre Q chronique (également appelée infection focalisée persistante) est définie comme une infection d'au moins six mois dont la forme la plus courante est l'endocardite (5).

La fièvre Q est une zoonose importante pouvant avoir de graves conséquences sur la santé humaine et l'économie d'un pays. Entre 2007 et 2010, plus de 4000 cas humains ont été comptabilisés lors de la flambée épidémique aux Pays Bas (6).

En France, la fièvre Q n'est pas une maladie humaine à déclaration obligatoire. Par conséquent, il est difficile de connaître sa prévalence. Essentiellement sporadiques chez les professionnels à risques (éleveurs, vétérinaires, personnels d'abattoir, etc.), elle peut également être observée en zone urbaine sous forme de petites épidémies ou de cas groupés.

La contamination humaine étant d'origine animale, il serait utile de disposer d'une méthode de prélèvement fiable, rapide et facile d'utilisation permettant de mieux connaître l'état sanitaire des élevages susceptibles de représenter une source d'exposition humaine. Les prélèvements de poussières en bâtiment d'élevage, réalisés à l'aide d'une chiffonnette, peuvent être utilisés pour mettre en évidence la présence de *C. burnetii* (7) (8) (9) mais peu d'études y ont encore recours.

Contexte du projet : émergence de cas groupés dans la région de Niort

Début juin 2017, une augmentation inhabituelle du nombre de cas de fièvre Q dans la région de Niort a été signalée à Santé Publique France. Des investigations ont été mises en place pour identifier la source et proposer des mesures de prévention et de contrôle (10). Aucune source commune (activité professionnelle et de loisirs) n'a pu être identifiée mais la circulation de la bactérie a été mise en évidence dans plusieurs élevages de la zone par une enquête vétérinaire (10).

Ce contexte de cas humains groupés a souligné la nécessité de mieux connaître l'épidémiologie la fièvre Q dans la région de Niort. C'est ainsi qu'est né le projet de recherche EXPAIRCOX « Amélioration des connaissances sur l'exposition aérienne des professionnels agricoles et de la population générale à *Coxiella burnetii* : études épidémiologiques et sociologiques dans une région régulièrement confrontée à la fièvre Q » piloté par l'UMR EPIA et dans le cadre duquel s'inscrit ce stage.

Les objectifs de ce stage sont de :

- Décrire la fréquence de détection de la bactérie *C. burnetii* dans les poussières des bâtiments d'élevage et permettre d'identifier des facteurs associées à cette charge
- Contribuer à la mise au point d'une nouvelle méthode de génotypage haut débit

2. Matériels et méthodes

Dans cette étude descriptive, les données sont issues d'une enquête épidémiologique transversale répétée. Dans un premier temps, une analyse quantitative des charges bactériennes détectées dans les poussières prélevées en élevage a été effectuée. Dans une seconde partie, les étapes de mise au point d'une méthode de géotypage haut débit sur une partie des échantillons de poussières seront présentées.

2.1. Étude transversale répétée sur poussières de bâtiments d'élevage

2.1.1. Collecte des données

Population d'étude

L'unité épidémiologique considérée dans cette étude est un atelier de ruminant (caprin, ovin, bovin) dont le bâtiment a fait l'objet d'un prélèvement de poussière. La zone d'étude s'étend sur une surface d'environ 60km sur 38km et inclut la zone d'exposition des cas humains groupés confirmés en 2017 (Cf. Figure. 1). Cette zone inclut 164 ateliers caprins, 284 ateliers ovins et 871 ateliers bovins.

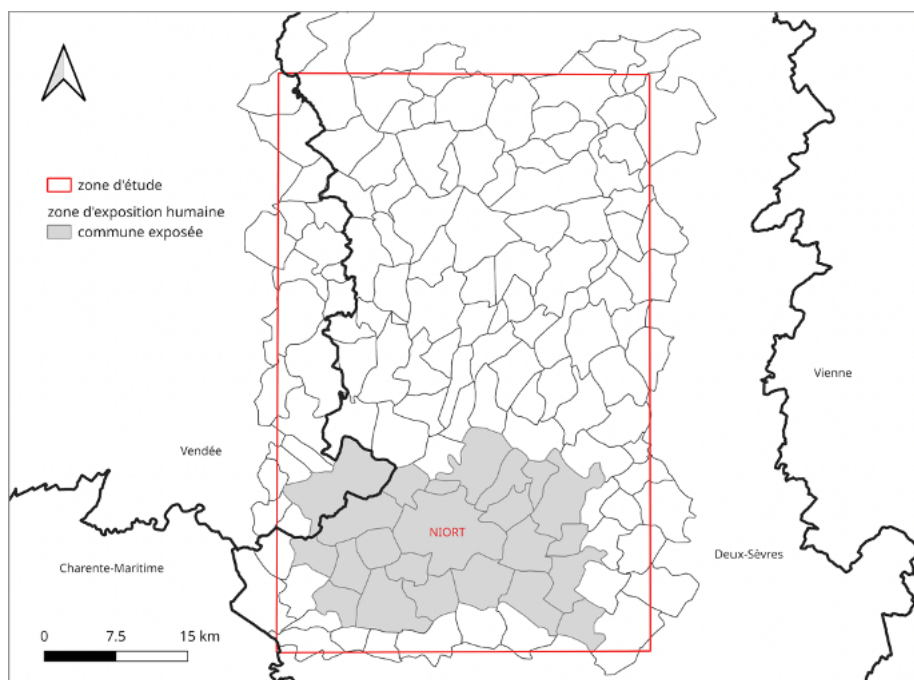


Figure 1 : Représentation de la zone d'étude

Critères d'inclusion de l'étude

Seuls les ateliers où des mise-bas ont lieu et qui disposent d'un bâtiment ont été sélectionnés pour le tirage au sort. De plus, la taille minimale des ateliers considérés a été fixée

respectivement à 50 et 25 animaux de plus de 6 mois pour les ateliers caprins et ovins et à plus de 40 animaux de plus de 24 mois pour les ateliers bovins.

Un tirage aléatoire des ateliers de ruminants respectant ces critères d'inclusions présents dans la zone d'étude a été réalisé avec pour objectif d'en inclure 300, sachant que la zone d'étude incluait fin 2017 164 ateliers caprins, 284 ateliers ovins et 871 ateliers bovins. Le tirage au sort a été réalisé par espèce après attribution aléatoire d'un rang pour chaque atelier de la zone d'étude. Les 100 premiers ateliers de chaque espèce ont été sélectionnés pour participer à l'étude. En cas de refus par un éleveur ou d'impossibilité répétée de le contacter, l'atelier suivant sur la liste a été contacté. Les prélèvements ont été réalisés en 2018 et en 2019 pour les ateliers tirés au sort et ont été effectués sur une période de 5 mois d'avril à août.

En 2019, des ateliers non inclus dans le tirage au sort aléatoire ont également été prélevés :

- Dans la zone d'exposition des cas humains de 2017, afin d'obtenir des données sur les élevages de cette zone qui n'avaient pas été tirés au sort en 2018 ;
- Par ailleurs, lors de la présence dans l'élevage d'une seconde espèce de ruminant dont le bâtiment est localisé sur le même site que l'atelier cible (distance < 1 km), un prélèvement de poussières a été effectué également dans le bâtiment hébergeant cette seconde espèce. Ces ateliers sont nommés « ateliers satellites ».

Prélèvements de poussières en élevage

Les prélèvements de poussières ont été réalisés par les Groupement de Défense Sanitaire (GDS) des départements 79 et 85 ainsi que par l'Anses Niort à l'aide d'une chiffonnette (SodiBox, France) selon un protocole précédemment publié (Cf. Annexe. 1) (9).

Consentement éclairé et questionnaire

À la suite du tirage au sort, les éleveurs ont été contactés par téléphone par le GDS de leur département début 2018 pour savoir s'ils acceptaient de participer à l'étude. Une seconde prise de contact a été effectuée au printemps 2018 pour fixer un rendez-vous pour la réalisation du prélèvement. A cette occasion, un document explicatif du projet et un formulaire de consentement éclairé a été remis aux éleveurs qui devaient le compléter et le signer. Les ateliers prélevés en 2018 et dont le consentement n'a pas pu être recueilli (éleveur injoignable ou refus tardif de participation) ont été exclus de l'étude. De plus, les éleveurs disponibles lors de la campagne de prélèvement de 2019 ont répondu oralement à un questionnaire papier rempli par le préleveur. Ainsi des informations sur la gestion des effluents, la gestion des litières, la vaccination, l'introduction d'animaux et sur les antécédents de maladies ont été collectées (Cf. Annexe. 2). Chaque préleveur a participé à une réunion d'information afin de

limiter les biais de mesure lors des prélèvements et les biais d'information lors du déroulement des entretiens servant à compléter le questionnaire

Confidentialité des données

Les résultats exposés dans ce rapport sont confidentiels dans l'attente de leur publication avec accord des partenaires du projet et des financeurs (Conseil Départemental 79 et Conseil Régional Nouvelle Aquitaine). En effet, la publication des résultats pourrait représenter un enjeu économique notamment pour la filière caprine.

2.1.2. Détection et quantification de l'ADN de *C. burnetii*

Deux méthodes ont été utilisées pour la détection et la quantification de *Coxiella burnetii* dans les prélèvements de poussières ; la PCR quantitative en temps réel (qPCR) et la PCR digitale en gouttelette (ddPCR). Les résultats obtenus sont exprimés en nombre de copies de génomes bactériens ou génomes équivalents (GE) par mL ou par chiffonnette après transformation à l'aide de la fonction logarithme.

Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN à partir des échantillons a été réalisée à l'aide du kit QIAmp DNA minikit (QIAGEN, France) selon une technique d'extraction sur colonne.

Tout d'abord, les poussières prélevées ont été remise en suspension dans 40mL de PBS et l'extraction a été réalisée à partir de 200uL de cette suspension. Enfin, les ADN extrait ont été dilués au dixième pour de limiter les risques d'inhibition en qPCR.

Méthode PCR

Tous les échantillons ont été analysé en qPCR multiplexe en suivant la méthode développée par le LNR fièvre Q à l'Anses de Sophia Antipolis. La PCR multiplexe utilise plusieurs paires d'amorces s'hybridant à différentes séquences cibles. Ainsi, un gène cible a été utilisé pour la détection de *C. burnetii* et un deuxième gène comme contrôle positif interne. Deux fluorochromes dont les spectres sont bien distincts ont servi à marquer ces deux cibles (fluorochromes FAM et fluorochrome HEX). L'amplification a été réalisée avec le système de détection PCR en temps réel CFX96TM (Bio-Rad).

Des techniques PCR plus récentes, dites de 3^{ème} génération, existent dont la ddPCR QX200TM (Bio-Rad). Lors de la ddPCR, l'échantillon est divisé en 20 000 microgouttelettes par émulsion eau-huile. Les matrices d'ADN cible présentes dans chacune de ces gouttelettes sont amplifiées par PCR. Le nombre de copies par microlitres est calculé en s'appuyant sur la loi

statistique de Poisson. Cette méthode très sensible permet une quantification absolue de l'ADN : contrairement à la qPCR, la mesure effectuée en ddPCR est directe et ne nécessite pas l'utilisation d'une courbe standard effectuée à partir d'une gamme étalon. De plus, elle permet de s'affranchir des problèmes d'inhibition puisque chaque réaction PCR est effectuée dans une gouttelette de faible volume et donc contenant peu d'inhibiteurs de PCR. La charge bactérienne de chaque prélèvement a également été estimée par le logiciel associé à l'appareil de ddPCR. L'ensemble des échantillons ont été analysés à la plateforme génome-transcriptome de Bordeaux.

Cibles PCR

En qPCR, chaque échantillon a été analysé en ciblant d'une part le gène multi-copie Insertion Sequence 1111 (IS1111) et d'autre part le gène mono-copie Isocitrate dehydrogenase (ICD). Ce sont des gènes spécifiques des bactéries du genre *Coxiella*. L'utilisation du gène IS1111, permet d'avoir une sensibilité de détection plus élevée que le gène mono-copie ICD. En revanche, la quantification basée sur ICD permet une estimation plus juste de la charge bactérienne. De plus, le ratio de IS/ICD permet d'estimer le nombre de copie du gène IS1111 par génome (11).

Les 3 gènes cibles utilisés sont les suivant :

- IS1111 est la cible la plus couramment utilisée pour le diagnostic de la fièvre Q chez les ruminants domestiques. Cette séquence d'insertion est un élément répétitif de 7 à 110 copies par isolat de *C. burnetii* (12). Par convention, en se basant sur le nombre de copies d'IS de la souche de référence Nine Mile (RSA493), la charge bactérienne a été estimée en considérant que les échantillons testés ont 20 copies d'IS1111 par génome.
- ICD est un gène conservé et présent en copie unique sur le génome de *C. burnetii* (11). Il est parfois utilisé comme cible pour la détection de cette bactérie (11) (13).
- GAPDH est un gène qui code pour une enzyme (glycolyse) présente naturellement chez l'ensemble des ruminants. Étant présent en quantité variable dans les poussières des bâtiments, des cellules de ruminants (cellules SFT pour Sheep Fetal Thymus) fournies par le LNR ont été ajoutées lors des extractions en quantité connue. Ainsi la GAPDH a été quantifiée et utilisée comme contrôle interne afin de valider l'efficacité de l'amplification en qPCR.

Dans cette étude, le gène IS1111 a été ciblé sur les échantillons prélevés en 2018 et 2019. Pour ICD, seuls les échantillons dont la charge détectée en IS était supérieure à 2,5log GE/mL

ont été analysés en 2019 avec ce gène. En effet, des analyses préliminaires ont montré qu'en dessous de ce seuil, la présence de *C. burnetii* dans les prélèvements n'était pas détectée.

2.1.3. Constitution d'une base de données

Les résultats qPCR et ddPCR obtenus sur les échantillons prélevés en 2018 et 2019 ont été rentrés dans une base de données Excel.

- Le nombre de copies du gène IS1111 réellement présent dans les échantillons testés a été estimé à partir des résultats ddPCR ciblant respectivement le gène IS1111 et le gène ICD.
- Le « changement de statut » d'un atelier a été défini pour illustrer la différence de résultats entre années pour un même atelier tiré au sort. Tous les ateliers devenus négatifs ou positifs et ceux dont la charge estimée a augmenté ou diminué de plus de 2log entre 2018 et 2019 ont été considérés comme ayant changés de statut. Cet écart de 2 log permet *a priori* de prendre en compte la marge d'erreur sur les charges estimées par qPCR et ddPCR.

Par ailleurs, des informations relatives à plusieurs facteurs pouvant influencer le résultat PCR des prélèvements de poussières dans les bâtiments d'élevage ont été collectées, synthétisées et incluses dans cette base de données. Après plusieurs vérifications et ajouts de nouvelles informations, la base de données a pu être constituée. Les facteurs considérés sont les suivants :

- Espèce : c'est le facteur principal exploré suite à l'association montrée dans l'étude de Carrié *et al.* (7).
- Présence de plusieurs espèces sur le site : en lien avec l'effet espèce qui vient d'être mentionné, nous supposons que la présence d'une seconde espèce de ruminant sur le site, notamment la présence de caprins, peut avoir une influence sur la détection ou la charge quantifiée chez les autres espèces de ruminants (ovins, bovins).
- Effectif de l'atelier : nous supposons qu'il y a une corrélation entre le nombre d'animaux dans l'atelier et la charge quantifiée en PCR. En effet l'hypothèse est que plus le nombre d'individus dans l'atelier est élevé et plus le nombre d'excréteurs potentiels l'est également. Les effectifs de ruminants par atelier ont été fournis par les GDS des départements 79 et 85. Elles sont issues de la base de données de la Chambre d'Agriculture pour les ruminants du département 85 et les caprins et ovins du département 79, et du système d'information de la Direction Générale de l'Alimentation (SIGAL) pour les bovins du département 79.

- Densité d'animaux par commune : la même hypothèse est formulée pour la densité d'animaux par commune que pour l'effectif de l'atelier. Ce facteur est découpé en 4 : densité de caprins dans la commune, densité d'ovins, densité de bovins et densité de ruminants (caprins, ovins, bovins) dans la commune. Les effectifs d'animaux par commune ont également été fournis par les GSD des départements 79 et 85 (sources Chambre d'Agriculture et SIGAL). Les densités ont été calculées à partir des données de surfaces fournies par l'Institut national de l'information géographique et forestière (IGN).
- Préleveur : ce facteur est exploré dans le but de vérifier qu'il n'y a pas eu de biais du fait que les prélèvements ont été effectués par 5 préleveurs différents. Les résultats des ateliers tirés au sort et satellites ont été analysés simultanément afin d'augmenter les effectifs par modalités.
- Date de prélèvement : initialement la période de prélèvement devait correspondre à la période d'apparition des cas humains groupés de 2017 (avril/mai/juin). Cependant, les prélèvements ont eu lieu jusqu'en août. Afin de vérifier que l'allongement de la période de prélèvement n'a pas eu d'influence sur les résultats, la variable « date de prélèvement » a été explorée. Ce facteur a été mise en classe ; 5 modalités ont été défini (avril/mai, première quinzaine de juin, deuxième quinzaine de juin, juillet et août) définies de façon à équilibrer le nombre de prélèvements par période. De même que précédemment, les résultats des ateliers satellites ont été inclus dans l'analyse afin d'augmenter les effectifs des modalités.
- Données du questionnaire : diverses informations sur les ateliers ont été collectées par questionnaire (Cf. Annexe. 2).

2.1.4. Analyses descriptives et statistiques des résultats

Cartographie

Des cartes ont été réalisées afin de décrire la distribution des ateliers tirés au sort. Les contours des communes et des départements sont issus des unités administratives nationales de l'IGN. Les données GPS des localisations des exploitations (système WGS84 ou projection UTM30) ont été projetées en Lambert 1993 avec le logiciel Proj4 (version 8.0.1). Les traitements des données géométriques ont été réalisés sous R (version 4.0.2) avec les bibliothèques « rgdal » et « RPostgreSQL ».

Les données importées depuis Excel ont été vérifiées pour être conformes à la norme SQL puis exportées vers une base de données « PostgreSQL » (la base de données 'PostgreSQL 12.7' utilise le module SIG 'PostGIS').

Enfin, les cartes ont été tracées à l'aide du logiciel QGIS (version 3.10').

Analyses univariées

Une analyse univariée a été réalisée pour chacune des variables explicatives en les confrontant à la variable d'intérêt. Cette variable Y de type quantitatif a également été exploré après transformation en variable de type qualitatif (Cf. Tableau.1).

Tableau 1 : Synthèse des analyses univariées réalisées en fonction de la nature des variables X et Y

| Type de variable | Test réalisé |
|--|---|
| <i>Variable d'intérêt quantitative</i> | |
| Variables Xn quantitatives | Test de corrélation de Pearson (paramétrique) ou de Spearman (non-paramétrique) |
| Variables Xn qualitatives | Test ANOVA suivi d'un test post-hoc de Student |
| <i>Variable d'intérêt qualitative</i> | |
| Variables Xn quantitatives | Test ANOVA suivi d'un test post-hoc de Student ou mise en classe de la variable |
| Variables Xn qualitatives | Test d'indépendance du Chi2 ou de Fisher |

La variable « effectif de l'atelier » a été standardisée en Z-score afin d'avoir une variance comparable avec celle de notre variable d'intérêt.

L'ensemble des analyses statistiques et des graphiques ont été réalisés avec les logiciels Rstudio (version 1.4) et Excel (version 16.49).

2.2. Mise au point d'une méthode de génotypage haut débit applicable aux poussières de bâtiment d'élevage

Afin de décrire la diversité des souches présentes dans les élevages en lien avec les espèces et leur distribution géographique, la méthode Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats (MLVA) a été envisagée. C'est une méthode très discriminante pour laquelle on dispose de données connues en France sur les ruminants. Cependant notre matrice poussières, qui est poly-contaminées, rend cette approche inadaptée (résultats inexploitable car présence de bandes aspécifiques lors de la révélation sur gel).

Pour obtenir des données de génotypages exploitables et comparables à la méthode MLVA, une nouvelle méthode basée sur l'amplification PCR de ces marqueurs et sur leur séquençage a été mise au point. De plus, les marqueurs de la méthode Multispacer Sequence Typing (MST) sont également utilisés afin d'augmenter le pouvoir discriminant de la méthode. L'inclusion des marqueurs issues d'approches de génotypage différentes permettra de croiser nos résultats avec un plus grand nombre d'études précédemment publiées.

2.2.1. Choix des marqueurs

La méthode MLVA repose sur l'amplification de courtes séquences répétées en un nombre variable selon les souches. Dans cette étude, nous nous sommes basés sur 16 des 17 marqueurs issus de la publication Arricau-Bouvery et al (14). Le marqueur ms36 n'a pas été sélectionné car il couvre la même région que ms20 (15).

La méthode MST est basée sur l'amplification de régions inter-géniques, non codantes comportant des mutations ponctuelles discriminantes appelées « single nucleotide polymorphism » (SNP). Ces régions, qui semblent moins soumises aux pressions de sélection que les régions de gènes codants, sont par conséquent plus variables d'une souche à une autre (16). Les 10 marqueurs MST utilisés par le Centre National de Référence des *Coxiella* en santé humaine qui ont été sélectionnés (17).

Les 26 marqueurs sélectionnés ont été retravaillés pour plusieurs raisons : (i) obtenir des tailles d'amplicons supérieures à 300pb (taille minimum des fragments d'ADN pour l'utilisation du séquenceur iSeq100 - Illumina) ; (ii) avoir des températures de fusion (TM) homogènes pour réaliser des PCR multiplexes ; (iii) intégrer de nouveaux sites SNP en élargissant les zones d'amplification afin d'être plus discriminants. Le design des amorces a été réalisé à l'aide du logiciel Geneious prime (version 2021.1)

2.2.2. Mise au point des amorces

Les amorces ont été retravaillées puis testées en laboratoire.

Design des amorces

Le design des amorces a été effectué en s'appuyant sur un alignement des génomes complets de *C. burnetii*. Il s'agit d'une part de 9 génomes disponibles la base de données NCBI (MSU GOAT, CbuK, CbuG, Dugway, Strain 3262, Z3055, RSA331, RSA493 et RSA439 (18) ;

et d'autre part des séquences de génomes complets mis à disposition du projet par le LNR fièvre Q (Cb-B1, Cb-B18, Cb-BK10, Cb_Cbb3, Cb_Cbc1, Cb_Cbc9, Cb_Cbc5, Cb_1642a, Cb_5460, Cb_6520, Cb_9126, Cb_Cb01, Cb_EV282, Cb_EV455, Cb_EV286, Cb_EV477).

Pour chaque marqueur, deux couples d'amorces ont été créés de façon à réaliser une amplification successive selon le principe de la PCR nichée : la deuxième paire d'amorces permet d'amplifier la séquence d'ADN cible présente dans le produit PCR issu de l'amplification avec la première paire. Cette approche par PCR nichée a pour but d'augmenter les chances d'obtenir des amplicons à partir des échantillons les plus faiblement chargés et donc de pouvoir les génotyper.

Plusieurs critères ont été pris en compte dans le design des amorces : (i) longueur comprise entre 19 et 23 pb ; (ii) un T_m égal à 60°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) pour pouvoir réaliser des multiplexages ; (iii) des T_m correspondant à la formation de dimères inférieures à 40°C , des tailles d'amplicon comprises entre 300 et 2200pb. Les amorces ont été retravaillées sur des zones conservées de l'alignement de séquences génomiques afin d'éviter l'utilisation de bases dégénérées.

Test des amorces

Plusieurs tests PCR ont été réalisés dans le but de : (i) définir les conditions optimales de PCR ; (ii) vérifier en utilisant la souche de référence que les amorces amplifient les marqueurs et que les amplicons ont les tailles attendues ; (iii) vérifier en utilisant des prélèvements de poussières que l'amplification réussit sur notre matrice d'intérêt pour différentes concentrations. Pour cela, nous avons utilisé cinq chiffonnettes prélevées en élevages caprins de charge en *C. burnetii* variables. Les tests avec la souche de référence Nine Mile ont été effectués pour les marqueurs MLVA et MST et ceux sur poussières pour les marqueurs MLVA.

2.2.3. Préparation des échantillons

Tous les échantillons de 2018 et de 2019 dont le résultats ddPCR était supérieur à 3log de concentration en GE/ml (soit $4 \cdot 10^4$ GE par chiffonnette) ont été sélectionnés pour le génotypage. Pour les échantillons de l'année 2019, il a également été tenu compte des résultats de quantification sur la base du gène ICD. Ainsi les échantillons avec une charge bactérienne inférieure à 10^4 copies par mL (soit $4 \cdot 10^4$ GE par chiffonnette) sur la base des résultats ICD19 ont été exclus.

Les échantillons ont été ré-extraits selon le même principe que lors des analyses PCR (Cf. 2.1.2) et ont été passés sur colonne anti-inhibiteur (OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit).

3. Résultats

3.1. Données disponibles

Au total, 240 prélèvements ont été effectués dans les bâtiments des ateliers tirés au sort en 2018 et 2019. De plus, en 2019, 61 ateliers supplémentaires ont été échantillonnés (57 ateliers satellites et 4 ateliers présent dans la zone d'exposition des cas humains groupés de 2017). Pour finir, le taux de participation au questionnaire soumis aux éleveurs est de 64% (Cf. Tableau. 2).

Tableau 2 : Nombre d'atelier considérés dans l'étude et taux de représentativité dans zone d'étude

| | Présent dans la zone d'étude | Éleveurs contactés | Refus de participer à l'étude | Inclus en 2018 et 2019 | Satellites prélevés en 2019 | Prélevé en 2019 dans la zone d'exposition des cas groupés | Taux de représentativité dans la zone d'étude | | Réponse au questionnaire |
|--------------|------------------------------|--------------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------------|---|---|------------|--------------------------|
| | | | | | | | 2018 | 2019 | |
| Caprin | 164 | 124 | 39 | 85 | 2 | 2 | 52% | 54% | 66 |
| Ovin | 284 | 123 | 52 | *71 | 4 | 2 | 25% | 27% | 45 |
| Bovin | 871 | 126 | 34 | **84 | 51 | 0 | 9% | 15% | 42 |
| TOTAL | 1319 | 373 | 125 | 240 | 57 | 4 | 29% | 32% | 153 |

*un atelier ovin exclus du jeu de donnée en 2018 car le prélèvement n'a pas été effectué dans le bon bâtiment

**un atelier bovin manquant en 2019 car le prélèvement n'a pas été effectué

3.2. Comparaison des méthodes qPCR et ddPCR

La cohérence des deux méthodes a été évaluée, en considérant simultanément les résultats de 2018 et 2019, afin de choisir les données les plus pertinentes à exploiter pour l'analyse descriptive.

Avec la méthode qPCR, 45/543 (8%) des résultats sont ininterprétables en raison de problèmes d'inhibition de la réaction PCR. En revanche, aucune inhibition n'est observée pour la ddPCR. La méthode ddPCR étant plus sensible, le nombre d'échantillons détectés positifs est variable selon la méthode utilisé (Test d'indépendance du Chi2, $p=4,72e-27$; Cf. Figure. 2A et 2B).

Les charges estimées en qPCR et ddPCR ciblant le gène IS1111 sont très corrélées (test de corrélation de Pearson, $cor=0,89$, $IC^{95\%} [0,859 ; 0,915]$), $p < 2.2e-16$; Cf. Figure. 2C). Seules ont été utilisées les charges estimées par qPCR supérieures à la limite de quantification de cette méthode (préalablement estimée par Carrié *et al.* (7). Par ailleurs, 3 échantillons fortement chargés dont le résultats atteignait le seuil de saturation de la ddPCR ont été exclus (ces 3 échantillons n'ont pas pu être ré-analysés après dilution par manque d'ADN).

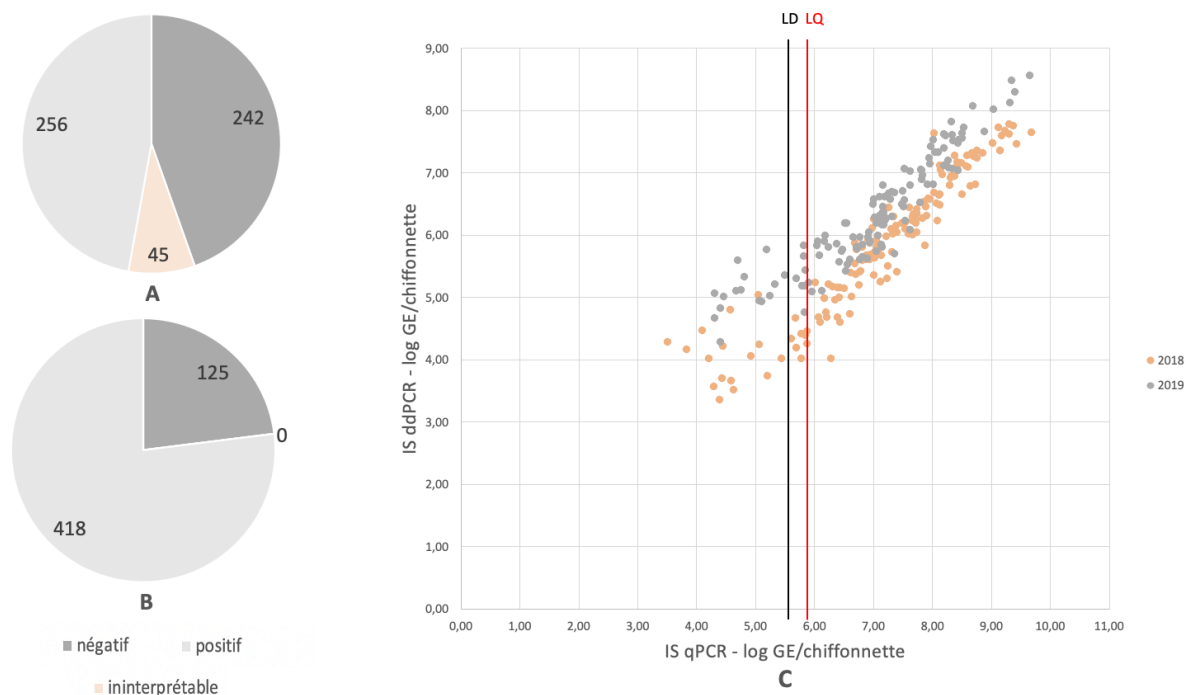


Figure 2 : Comparaison des résultats qPCR et ddPCR pour les années 2018 et 2019

La comparaison des charges estimées en ddPCR pour les prélèvements classés « ininterprétables » et « positifs » en qPCR montre que celle des « ininterprétables » est significativement plus faible que pour les « positifs » (test de student, $p=1,14e-05$; Cf. Figure. 3A). De plus, les charges estimées en qPCR pour les échantillons ré-analysés après dilution en raison de la mise en évidence d'une inhibition grâce au contrôle positif interne sont cohérentes avec les charges estimées des échantillons non dilués (Cf. Figure. 3B).

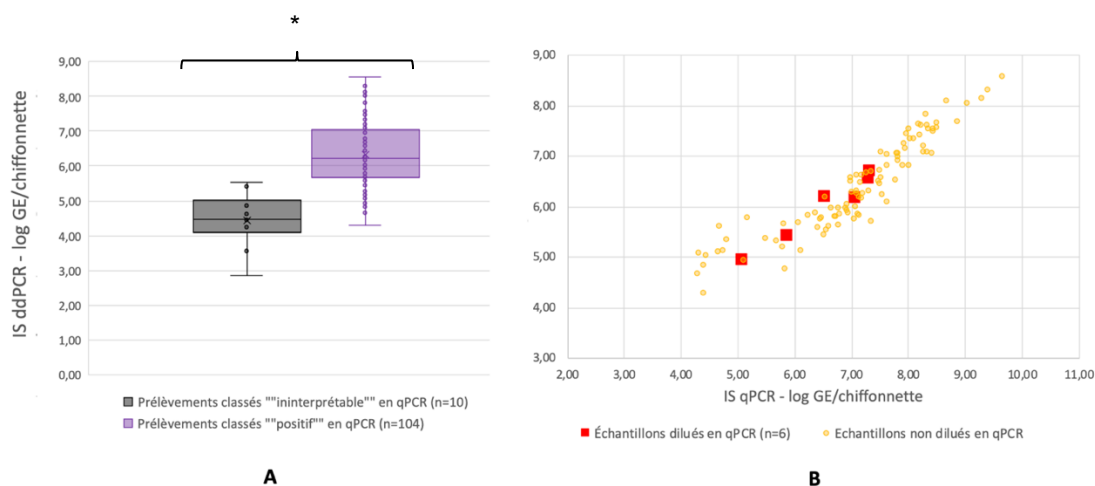


Figure 3 : Comparaison des résultats qPCR et ddPCR (pour les échantillons classés « ininterprétables » ou « positifs » en qPCR (A) et pour les échantillons dilués en raison d'une inhibition pour les analyses qPCR (B))

Aux vues de la cohérence entre les deux méthodes, seuls les résultats obtenus en ddPCR ont été explorés lors des analyses univariées.

3.3. Description des charges estimées en qPCR

Seuls les résultats obtenus en ddPCR ont été utilisés pour les analyses univariées. L'abréviation IS18 (respectivement IS19) est utilisée pour faire référence aux résultats obtenus par ddPCR en 2018 (respectivement 2019) en ciblant le gène IS1111. ICD19 est utilisé pour les résultats ddPCR ciblant le gène ICD en 2019.

Comparaison des charges par espèce

La probabilité d'obtenir une chiffonnette positive est significativement dépendante de l'espèce prélevée (test d'indépendance du Chi², $p = 2,77e-11$; Cf. Figure. 4A). De plus, les charges estimées pour les ateliers bovins sont plus faibles que pour les ateliers caprins (test de student, $p = 3,88e-15$) et pour les ateliers ovins (test de student, $p = 1,38e-09$) (Cf. Figure 4B et 4C).

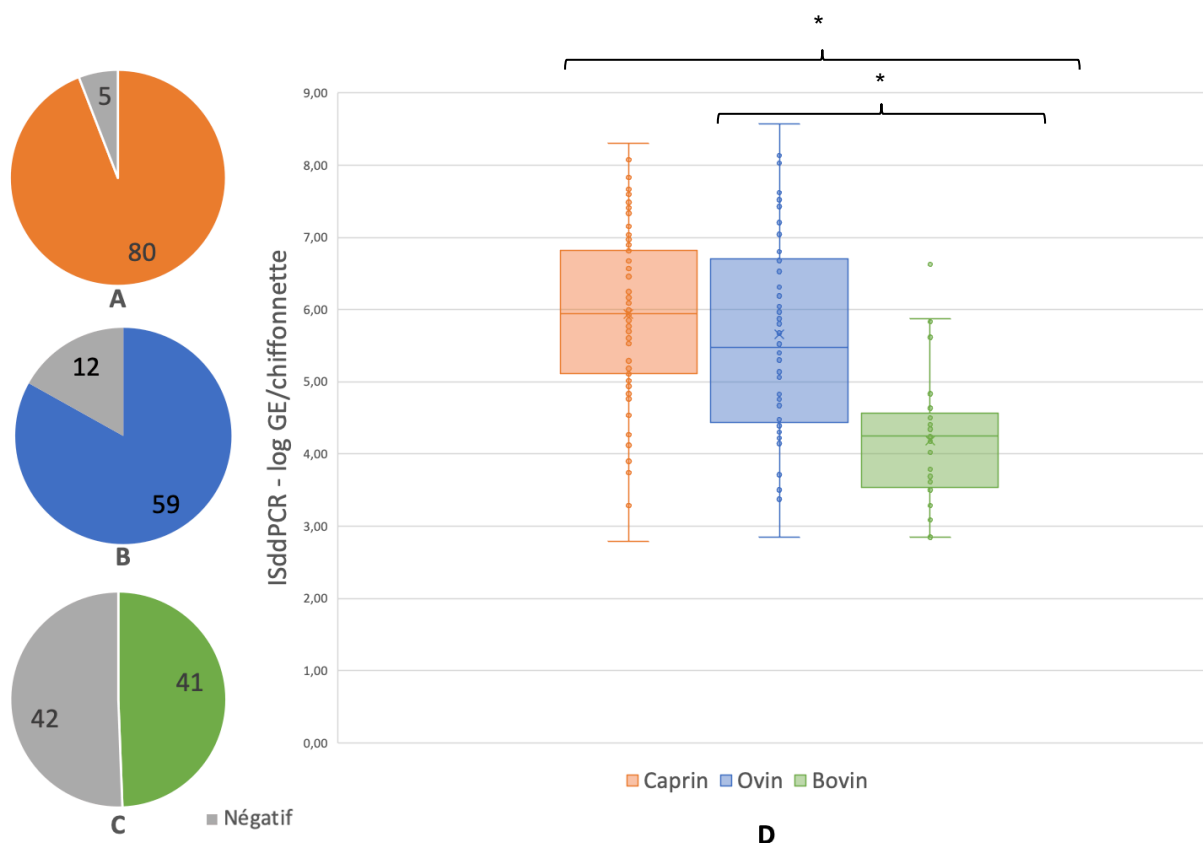


Figure 4 : Comparaison des résultats IS18 et IS19 : diagramme circulaire montrant la répartition des positifs et négatifs pour les caprins (A, n=85), les ovins (B, n=71) et les bovins (C, n=83). Distribution de la charge estimées pour les résultats positifs par espèces (caprins n=80, ovins n=59 et bovins n=41) (D)

Comparaison des résultats entre 2018 et 2019 par espèce

Aucune influence de l'année sur la probabilité d'obtenir une chiffonnette positive n'a été observée chez les caprins (test d'indépendance de Fisher, $p = 1$; Cf. Figure. 5A), et les ovins (test d'indépendance du Chi2, $p=0,13$; Cf. Figure. 5B). En revanche pour les bovins, il y a une différence entre les deux années (test du Chi2, $p=4,23e-11$; Cf. Figure. 5C). Concernant les charges estimées en 2018 et 2019, elles ne diffèrent pas significativement quelle que soit l'espèce observée (test de student, ; caprins, $p=0,74$; ovins, $p= 0,40$; bovins, $p= 0,07$; Cf. Figure 5D, 5E et 5F).

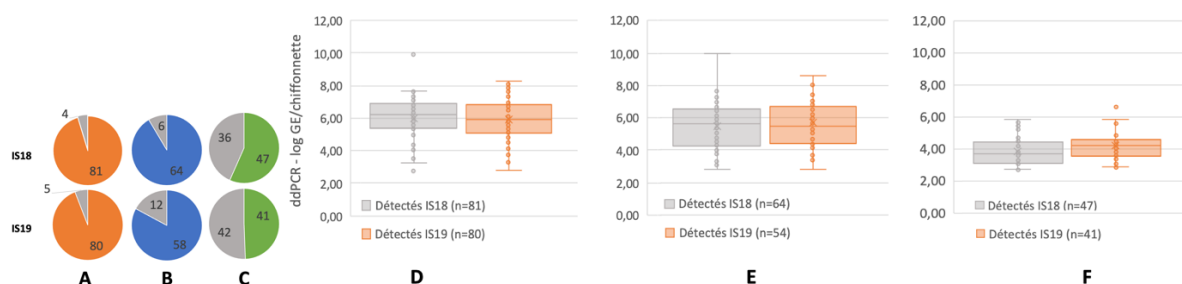


Figure 5 : Comparaison des résultats IS18 et IS19 ; diagrammes circulaires montrant la répartition des résultats ISddPCR selon l'année ; caprin n=85 (A) ; ovin, n =70 (B) ; bovin, n=83 (C) ; distribution des charges estimées par ateliers caprins (D), ovins (E) et bovins (F) en fonction de l'année

Sur la base des résultats IS18 et IS19, 90% des ateliers caprins et 81% des ateliers ovins sont positifs à la fois en 2018 et en 2019, avec une charge augmentée, diminuée ou inchangée (Cf. Tableau. 3). A l'inverse, une minorité des ateliers bovins (20%) sont positifs les deux années.

Tableau 3 : Changement de statut défini comme étant une différence de plus ou moins deux logs entre 2018 et 2019 par espèce

| Changement de statut entre 2018 et 2019 | Caprin | Ovin | Bovin |
|---|------------------|------------------|------------------|
| augmentation de la charge | 4,7% (4) | 7,1% (5) | 2,4% (2) |
| devenu positif | 3,5% (3) | 1,4% (1) | 16,9% (14) |
| inchangé (positif) | 81,2% (69) | 74,3% (52) | 15,7% (13) |
| diminution de la charge | 4,7% (4) | 0% (0) | 2,4% (2) |
| inchangé (négatif) | 1,2% (1) | 7,1% (5) | 38,5% (32) |
| devenu négatif | 4,7% (4) | 10% (7) | 24,1% (20) |
| TOTAL | 100% (85) | 100% (70) | 100% (83) |

Distribution dans l'espace et par espèce

On observe que la majorité des ateliers de ruminants sont localisés dans la partie nord-est de la zone d'étude. Le tirage au sort des ateliers caprins et bovins est plutôt bien réparti sur l'ensemble de la zone alors que les ateliers ovins sont essentiellement concentrés dans la partie nord-est (Cf. Figure. 6). Des animaux positifs sont détectés sur l'ensemble de la zone d'étude quelles que soient l'espèce et la charge considérées.

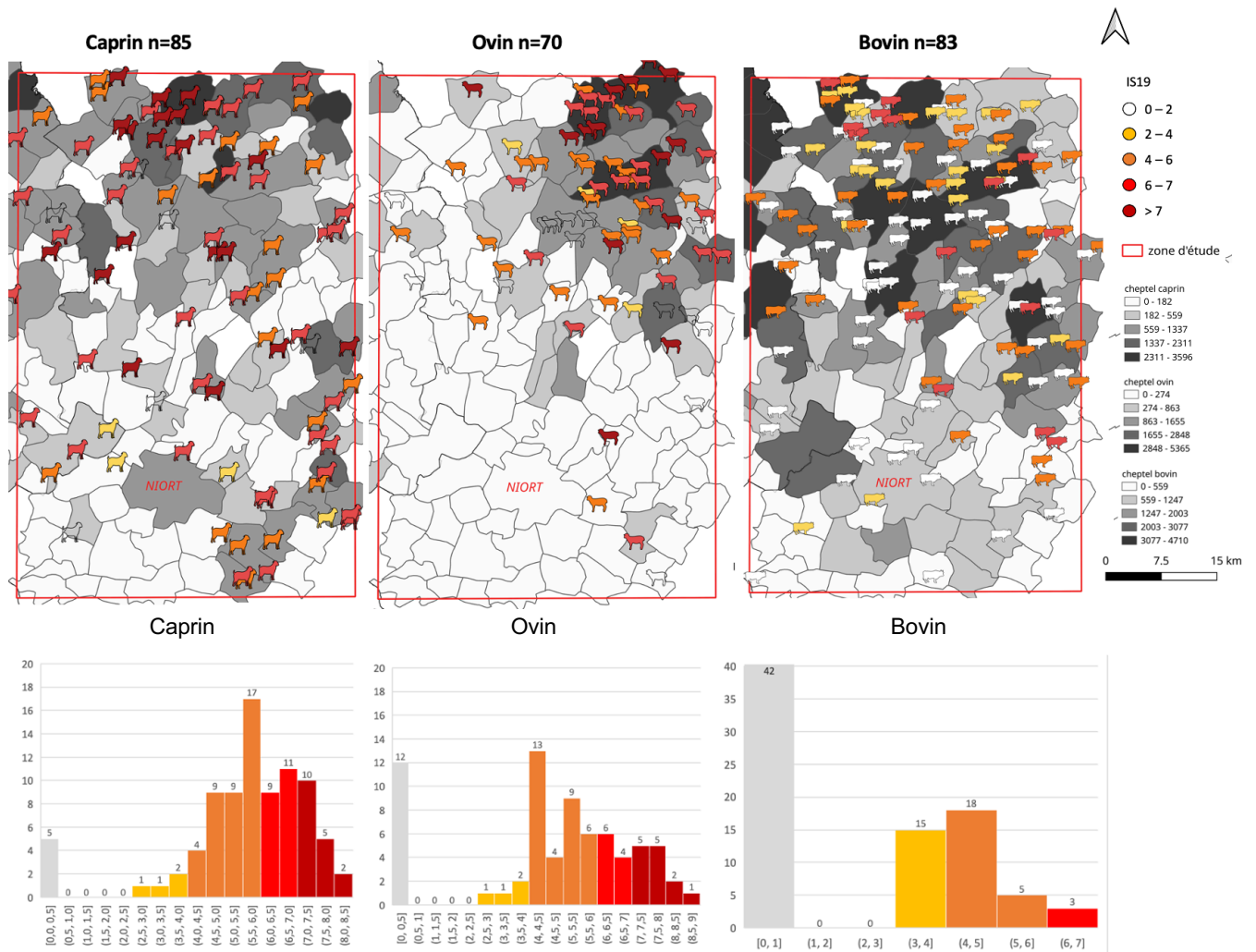
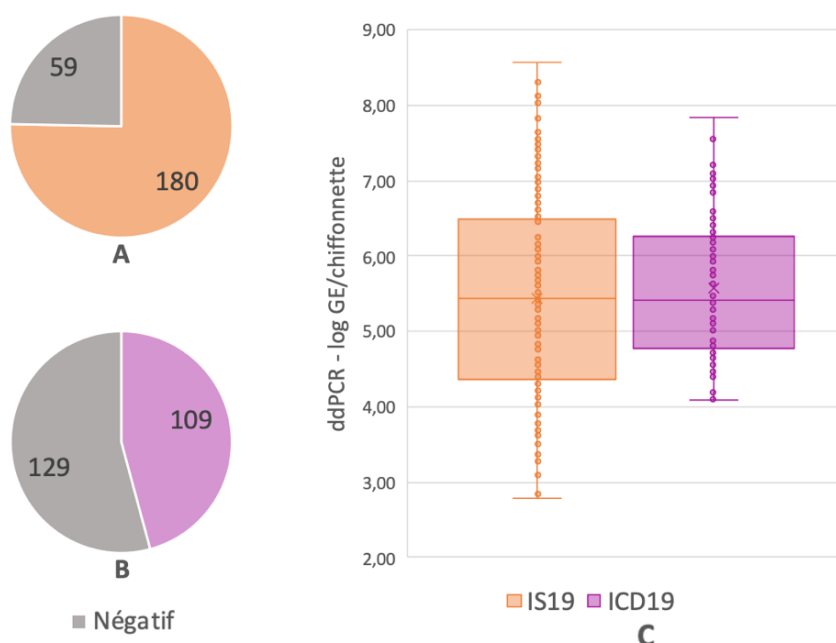


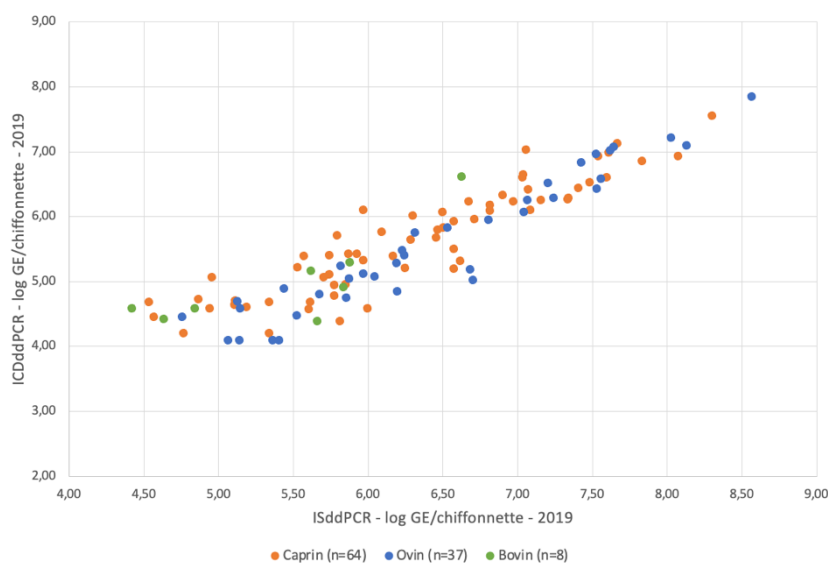
Figure 6 : charges estimées en 2019 en ciblant le gène IS1111 : distribution dans l'espace pour les ateliers tirés au sort en lien avec les effectifs des ruminants par commune (en haut) ; histogramme de fréquence des charges estimées par espèce (en bas)

Comparaison des résultats ddPCR IS19 et ICD19

La probabilité d'obtenir une chiffonnette positive avec une ddPCR ciblant le gène IS est plus élevée que si le gène ICD est la cible (Test d'indépendance du Chi2, $p=2,38e-11$; Cf. Figure 7A et 7B). Par contre, les charges bactériennes estimées avec les cibles IS1111 et ICD ne diffèrent en moyenne pas significativement lorsque les résultats des trois espèces de ruminants sont analysées conjointement (test de student, $p=1$; Cf. Figure 7C).



On observe une forte corrélation entre les charges estimées avec les cibles IS et ICD pour les ateliers caprins (test de corrélation de Pearson, $cor = 0,91$, $IC^{95\%} [0,861 ; 0,947]$, $p < 2,2e-16$) et ovins (test de corrélation de Pearson, $cor = 0,96$, $IC^{95\%} [0,919 ; 0,978]$, $p < 2,2e-16$) (Cf. Figure. 8). Le test n'a pas été réalisé pour les bovins par manque d'effectif testés pour la cible ICD ($n=8$).



Les charges estimées ne diffèrent pas significativement selon la cible utilisée pour les ovins (test de student, $p=0,21$). En revanche, si la PCR est basée sur la détection du gène IS1111 (dont le nombre de copies par génome est considéré égal à 20), la charge tend à être surestimée pour les caprins (test de student, $p=0,02$) et sous-estimée chez les bovins (test de student, $p=1,7e-5$) en comparaison avec celle quantifiée en utilisant le gène ICD (CF. Figure. 9). Le nombre de copies du gène IS1111 varie entre 14 et 514 chez les caprins, 54 et 973 chez les ovins et 14 et 434 chez les bovins.

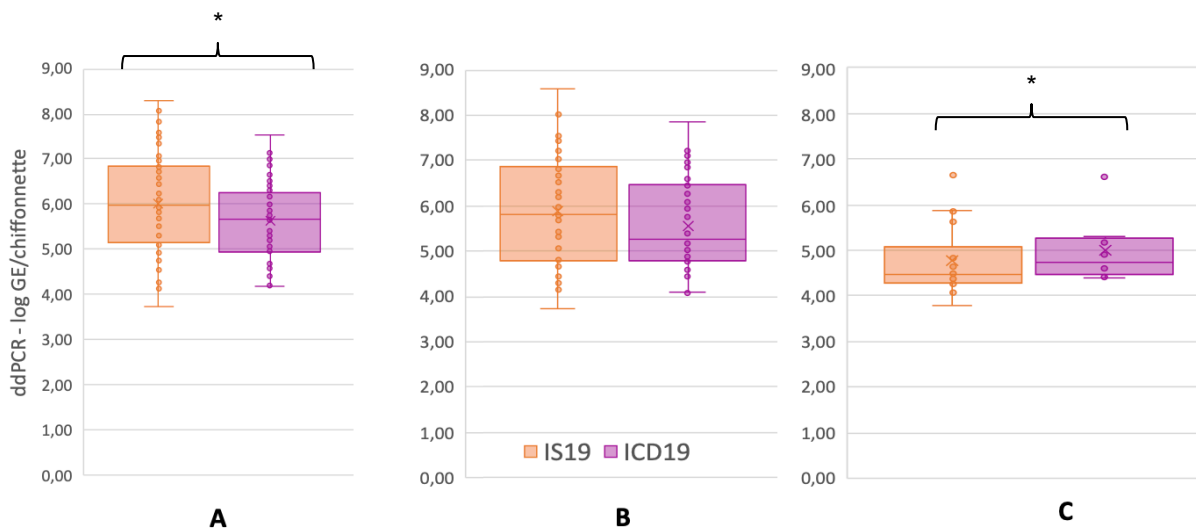


Figure 9 : Distribution des charges estimées par espèce en fonction de la cible PCR ; caprin, IS19 n=78, ICD19 n = 65 (A) ; ovin, IS19 n=54, ICD19 n =38 (B) ; bovin, IS19 n=22, ICD19 n=8 (C)

3.4. Facteurs associés aux charges estimées

L'espèce est le principal facteur pouvant influencer la charge estimée des ateliers. Plusieurs autres facteurs ont été explorés dont la présence d'une seconde espèce sur le site, l'effectif de l'atelier, la densité de ruminants de la commune. L'absence de biais associé aux facteurs préleveurs et date de prélèvement a également été vérifiée.

3.4.1. Présence d'une autre espèce de ruminant sur le site de l'atelier tiré au sort

En considérant à la fois les ateliers tirés au sort et les ateliers satellites présents sur le même site qu'un atelier tiré au sort, 78 élevages présentaient deux espèces différentes de ruminants (42 caprins-bovins, 7 caprins-ovins, 29 ovins-bovins).

Aucune influence de la présence d'une seconde espèce sur la détection de *C. burnetii* n'a été observée pour les ateliers caprins (test d'indépendance de Fisher, $p = 0,30$), les ateliers ovins (test d'indépendance de Fisher, $p = 0,91$), et les ateliers bovins en présence d'ovins (test

d'indépendance de Fisher, $p = 0,25$). En revanche, la présence de caprins est statistiquement associée à une détection plus fréquente de *C. burnetii* dans les poussières des ateliers bovins présents sur le même site (test d'indépendance du Chi2, $p = 1,99e-04$; Cf. Figure. 10). En cohérence avec ces résultats, la présence d'une seconde espèce sur le site d'élevage n'est pas associée à pas la charge quantifiée pour les ateliers caprins (ANOVA à 1 facteur, $p= 0,08$) et les ateliers ovins ($p= 0,24$) alors que la présence de caprins est statistiquement associée à une charge plus élevée dans les poussières des ateliers bovins (test de student, $p= 1,9e-04$; Cf. Figure. 10)

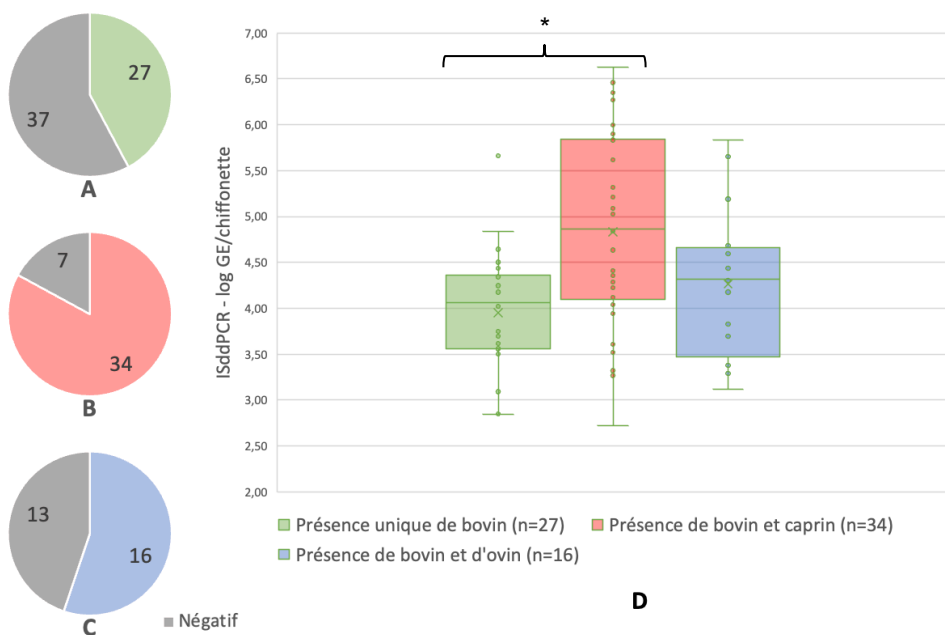


Figure 10 : résultats IS19 des ateliers bovins en fonction de la présence ou non d'une seconde espèce de ruminant sur le site : diagramme circulaire montrant la proportion de résultats positifs et négatifs sans présence d'une seconde espèce (A, n=64), en présence de caprins (B, n=41), en présence d'ovins (C, n=29) ; distribution des charges estimées pour les prélèvements des ateliers bovins (D)

3.4.2. Effectif de l'atelier

Aucune influence de l'effectif de l'atelier sur la probabilité d'obtenir une chiffonnette positive n'est observée pour les résultats IS18 pour les ateliers caprins (test d'indépendance de Fisher, $p = 0,07$), ovins (test d'indépendance de Fisher, $p = 0,36$) et bovins (test d'indépendance du Chi2, $p = 0,06$). Les résultats sont cohérents en 2019 pour les ateliers caprins (test d'indépendance de Fisher, $p=1$) et bovins (test d'indépendance du Chi2, $p=0,42$). En revanche, la détection de poussières positives chez les ovins en 2019 est statistiquement associée à l'effectif des animaux (test d'indépendance de Fisher, $p = 0,007$).

Une légère corrélation a été observée entre la charge quantifiée dans les poussières et l'effectif des ateliers caprins (test de corrélation de Pearson, $cor=0,26$, $IC^{95\%}$ [0,02 ; 0,46], $p = 0,02$; test de corrélation de Spearman, $\rho = -0,07$, $p=0,45$) et ovins (test de corrélation de Pearson, $cor=0,33$, $IC^{95\%}$ [0,08 ; 0,53], $p=0,01$; test de corrélation de Spearman, $\rho = 0,321$, $p=0,01$). Par contre, la corrélation n'est pas significative chez les ateliers bovins (test de corrélation de Pearson, $cor=0,13$, $IC^{95\%}$ [-0,19 ; 0,42], $p = 0,42$, test de Spearman, $\rho = 0,15$, $p=0,35$) (Cf. Figure. 11).

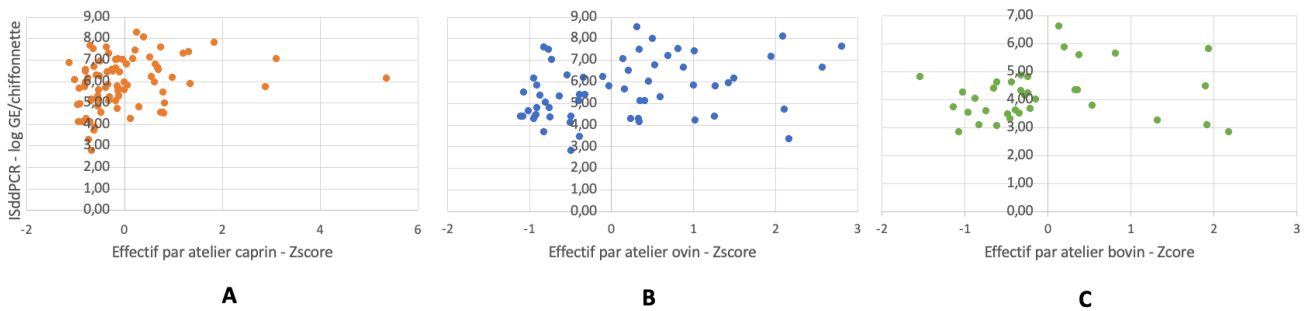


Figure 11 : Nuages de point montrant la distribution des charges estimées en fonction des effectifs des ateliers caprins, $n=80$ (A) ; ovins, $n=59$ (B) ; bovins, $n=41$ (C)

3.4.3. Densité par commune de ruminants domestiques et d'ateliers

Pour chaque atelier tiré au sort, la densité d'animaux (caprins, ovins, bovins et ruminants totaux) dans la commune a été calculée en soustrayant les effectifs correspondant à l'atelier considéré.

Aucune corrélation n'est observée entre la densité de ruminants dans la commune et la charge estimée dans les chiffonnettes sur la cible IS en 2019 pour les ovins (test de Spearman, $\rho = 0,19$, $p=0,14$) et les bovins (test de Pearson, $cor = -0,02$, $IC^{95\%}$ [-0,323 ; 0,292], $p=0,91$). En revanche, une corrélation est observée pour l'espèce caprine (test de Spearman, $\rho = 0,29$, $p=0,008$). (Cf. Figure. 12).

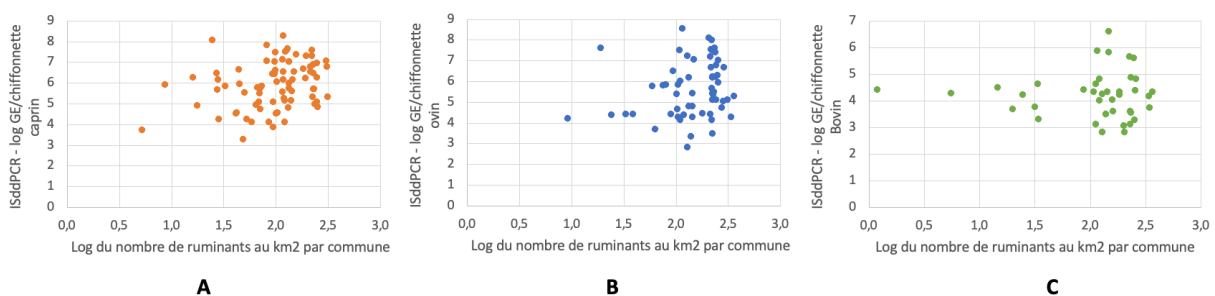


Figure 12 : Distribution des charges estimées par espèce en fonction de la densité de ruminants : caprin $n=80$ (A) ; ovine $n=59$, (B) ; bovine $n=41$ (C)

Les mêmes résultats sont obtenus en considérant uniquement les ruminants de l'espèce correspondant à la chiffonnette prélevée, sans corrélation observée pour les ovins (test de corrélation de Pearson, $cor = 0,25$, $IC^{95\%}[-0,009 ; 0,47]$, $p=0,06$) et bovins ($cor = -0,04$, $IC^{95\%}[-0,345 ; 0,269]$, $p=0,79$) mais une corrélation pour les caprins ($cor = 0,26$, $IC^{95\%}[0,047 ; 0,457]$, $p=0,018$) (CF. Figure. 13).

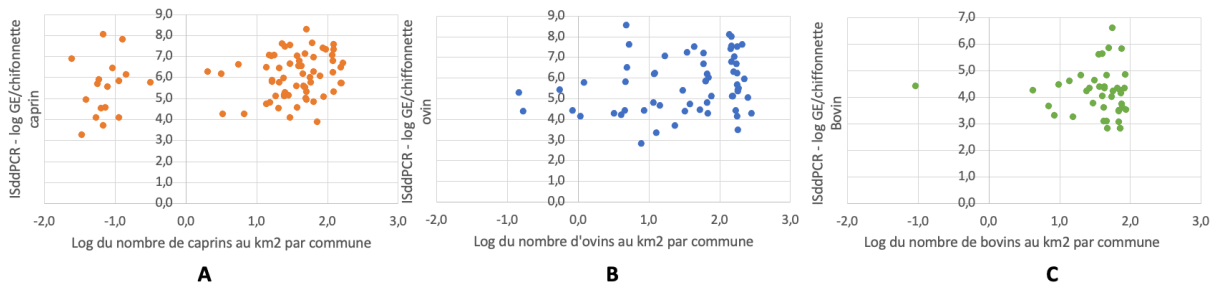


Figure 13 : Distribution des charges estimées en fonction de la densité de ruminants de l'espèce échantillonnée : caprin $n= 80$ (A), ovin $n= 59$ (B), bovin $n=41$ (C)

Enfin, puisque la présence de caprins sur le même site que les bovins est associée à une augmentation de la charge dans les chiffonnettes, la corrélation entre la densité de caprins dans la commune et la charge estimée pour les ateliers bovins a été explorée ; aucune corrélation n'a été observée (test de Pearson, $cor =-0,11$, $p=0,48$; CF. Figure. 14).

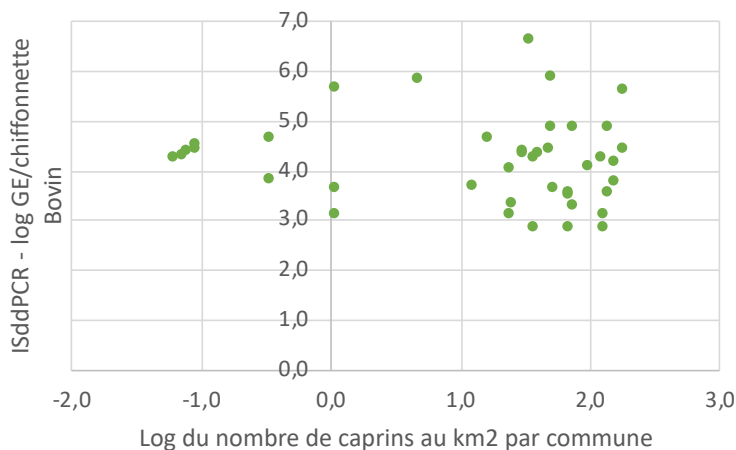


Figure 14 : Distribution des charges estimées pour les bovins en fonction de la densité de caprins ($n=41$)

3.4.4. Préleveur

Une association statistique a été mise en évidence entre l'obtention d'une chiffonnette positive pour IS19 et l'identité du préleveur (test d'indépendance du Fisher, $p=1,26e-06$). En revanche, aucune différence de quantification de charge entre les préleveurs n'a été observée (Kruskall-Wallis, $p\text{-value} = 0,42$; Cf. Figure. 15).

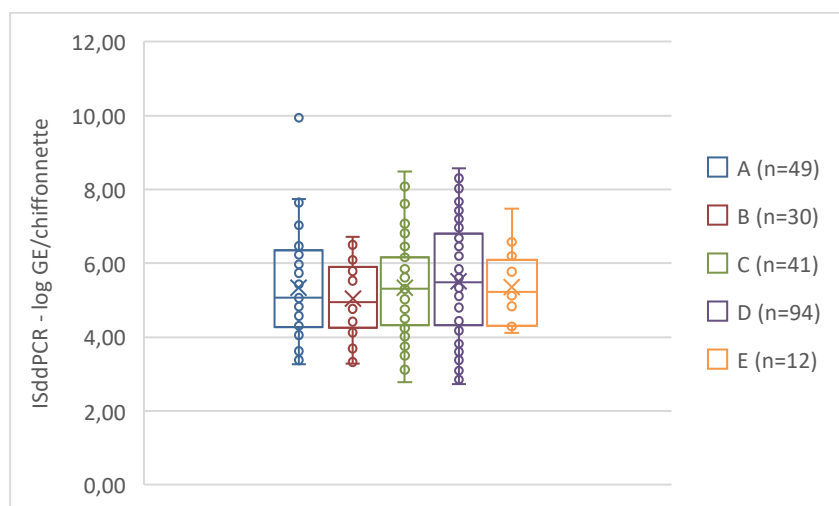


Figure 15 : Distribution des résultats positifs IS19 en fonction du préleveur

3.4.5. Date de prélèvement

La probabilité d'obtenir une chiffonnette positive semble différente selon les périodes de prélèvement (test d'indépendance de Fisher, $p = 1,27e-06$).

Pour les charges estimées, aucune différence n'est observée entre les différentes périodes (Kruskall-Wallis, $p = 0,32$; Cf. Figure. 16).

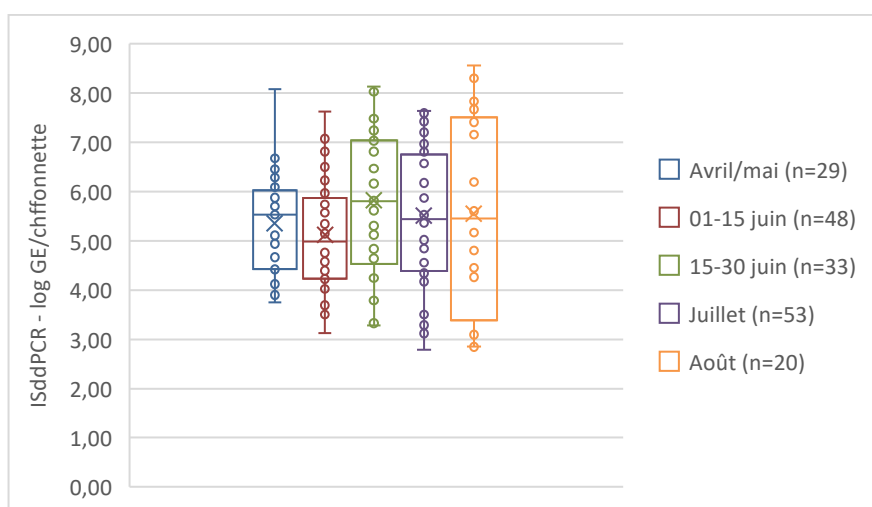


Figure 16 : Distribution des résultats positifs IS19 en fonction de la période de prélèvement

3.4.6. Données collectées par questionnaire

Parmi les informations collectées, seules celles relatives à la vaccination et l'introduction d'animaux ont pu être explorées. Pour les informations concernant la désinfection et le nettoyage des bâtiments, la gestion des litières et des effluents, le nombre de réponses obtenues est insuffisant pour être exploité.

Vaccination

Au total, 53 éleveurs caprins, 26 éleveurs ovins et 23 éleveurs bovins ont répondu à la question concernant le statut vaccinal de leur atelier, ce qui correspond à 51% des ateliers inclus dans l'étude. Aucune différence entre le statut vaccinal et la positivité des chiffonnettes des ateliers caprins, ovins et des bovins sur la base des analyses IS19 n'a été observée (test d'indépendance de Fisher, p-value = 1). Aucune différence entre les charges quantifiées pour les ateliers caprins vaccinés et les non vaccinés n'a été observée (test de student, p = 0,16). Le test n'a pas été réalisé pour les ateliers ovins et bovins du fait du nombre insuffisant de données pour les ateliers vaccinés. (Cf. Figure. 17).

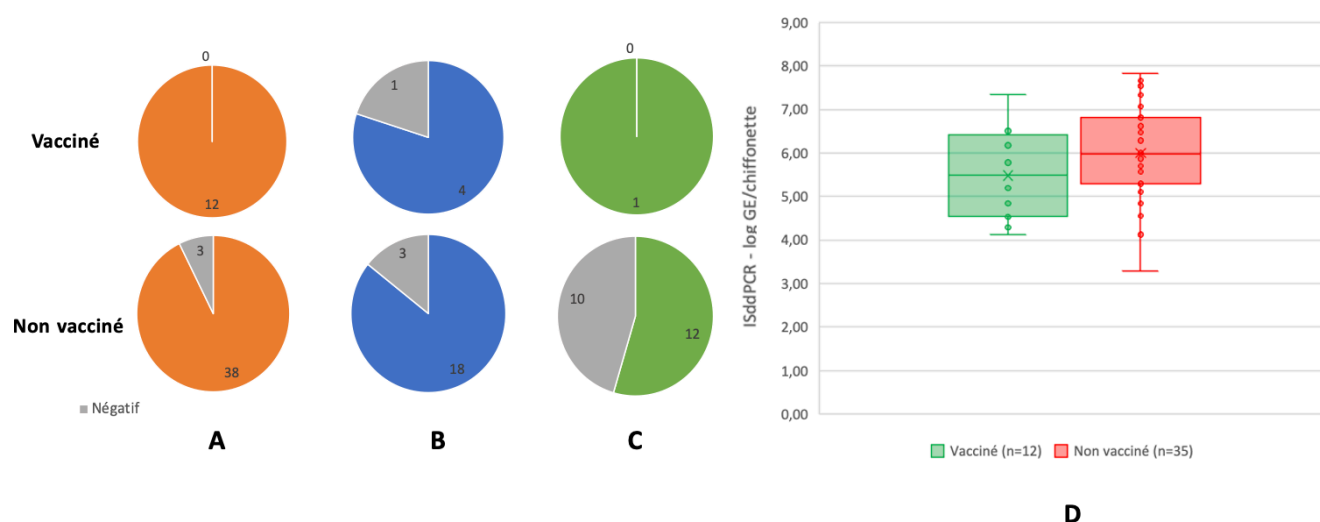


Figure 17 : Résultats IS19 en fonction de l'espèce et du statut vaccinal ; caprin n=53 (A) ; ovin, n=26 (B) ; bovin, n=23 (C) ; Boîtes à moustache des résultats IS19 en fonction du statut vaccinal pour les ateliers caprins (D)

Introduction d'animaux

Au total, 55 éleveurs caprins, 34 éleveurs ovins et 36 éleveurs bovins ont répondu à la question concernant l'introduction d'animaux dans leur atelier, ce qui correspond à 62% ateliers inclus dans l'étude (CF. Tableau. 6).

Tableau 4 : Synthèse des données relatives à l'introduction d'animaux

| | Introduction d'animaux avant 2018 | | Pas d'introduction d'animaux avant 2018 | |
|--------------|-----------------------------------|----------|---|-----------|
| | Positif | Négatif | Positif | Négatif |
| Caprin | 22 | 1 | 30 | 2 |
| Ovin | 9 | 1 | 21 | 3 |
| Bovin | 10 | 4 | 13 | 9 |
| TOTAL | 41 | 6 | 64 | 14 |

Aucune association entre l'introduction de nouveaux animaux dans les cheptels et l'obtention d'une chiffonnette positive n'est observée pour les ateliers caprins (test de Fisher, $p=1$), ovins (test de Fisher, $p=1$) et bovins (test du Chi2, $p=0,75$) (Cf. Figure. 18).

De même, aucune association entre l'introduction de nouveaux animaux et la charge estimée dans les chiffonnettes positives n'est observée pour les caprins (test de student, $p=0,6$) et les bovins (test de student, $p=0,47$). En revanche, pour les ateliers ovins, l'introduction d'animaux est statistiquement associée à une diminution de la charge estimée dans les chiffonnettes (test de student, $p=0,003$) (Cf. Figure. 19).

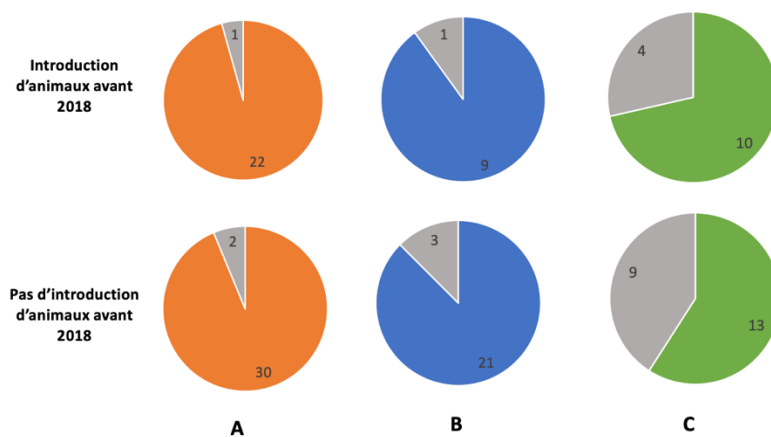


Figure 18 : Distribution des résultats IS19 entre les cheptels pour lesquels il y a eu une introduction d'animaux ou non chez les caprins (A) ; chez les ovins (B) ; chez les bovins (C)

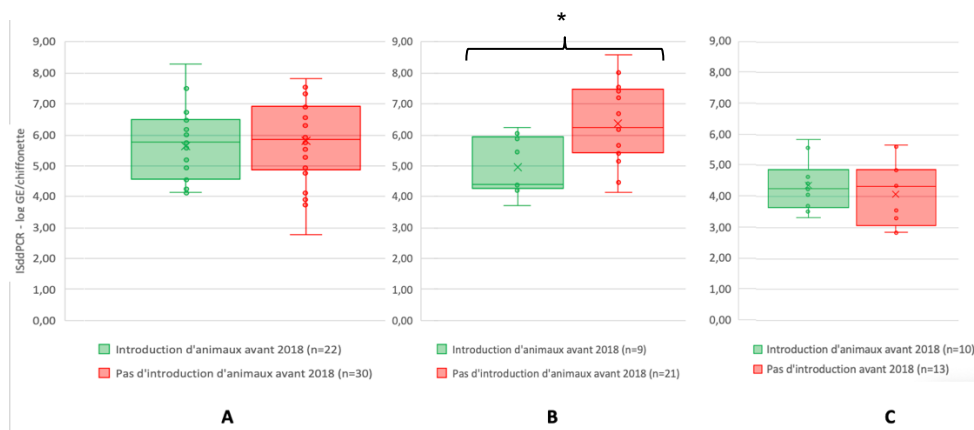


Figure 19 : Distribution des charges estimées entre les cheptels pour lesquels il y a eu une introduction d'animaux ou non (caprins (A) ; chez les ovins (B) ; chez les bovins (C)

3.5. Résultats des essais des amorces PCR pour génotypage

Marqueurs MLVA

Le dépôt sur gel produits PCR amplifiés à partir de la souche de référence Nine Mile à la concentration 10^5 GE/mL montre que 14 des 16 marqueurs testés ont été amplifiés en PCR simple (Cf. Figure. 20A), aucune bande n'étant observée pour les marqueurs ms01 et ms26.

Pour ces derniers, une fine bande est visible uniquement en PCR nichée (Cf. Figure. 20B). De plus, pour tous les marqueurs, on observe de nombreuses bandes aspécifiques en PCR nichée.

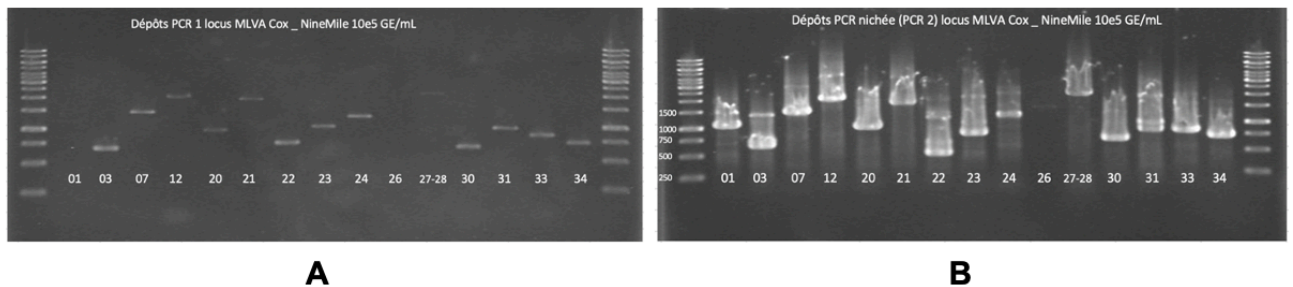


Figure 20 : Dépôt sur gel des amplicons obtenus après PCR à partir de la souche Nine Mile pour les marqueurs MLVA : (A) PCR simple ; (B) PCR nichée (présence de bandes aspécifiques)

Les essais des amorces sur cinq échantillons de poussière confirment les résultats obtenus avec la souche de référence Nine Mile. L'ensemble des marqueurs ont été amplifiés au moins une fois à partir d'un échantillon, sauf ms01 et ms26. La concentration de la chiffonnette sur la base du résultat PCR IS1111 n'est pas prédictive du succès d'amplification des marqueurs (Cf. Tableau. 5).

Tableau 5 : Résultats des essais de PCR simple pour les marqueurs MLVA sur 5 prélèvements de poussières de concentration en *Coxiella burnetii* différentes

| Locus | Taille amplicon en paire de base | Charge de la chiffonnette en GE/mL - espèce caprine | | | | |
|---------|----------------------------------|---|----------|----------|----------|----------|
| | | 4,89E+03 | 6,12E+04 | 1,99E+05 | 1,21E+06 | 5,65E+07 |
| ms01 | 1196 | - | - | - | 1 | - |
| ms03 | 674 | - | 1 | - | 1 | - |
| ms07 | 1469 | - | 1 | - | 1 | - |
| ms12 | 2084 | - | 1 | - | 1 | - |
| ms20 | 975 | 1 | 1+ | - | 1 | 1 |
| ms21 | 1896 | - | 1 | - | 1 | - |
| ms22 | 724 | - | 1 | 1 | 1 | - |
| ms23 | 1017 | - | 1 | - | 1 | - |
| ms24 | 1267 | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ |
| ms26 | 1501 | - | - | - | - | - |
| ms27-28 | 2194 | 1 | 1 | - | 1 | - |
| ms30 | 660 | - | 1 | - | 1 | - |
| ms31 | 981 | - | 1 | - | 1 | - |
| ms33 | 857 | - | 1 | - | 1 | - |
| ms34 | 723 | - | 1 | - | 1 | - |

- : pas de bande visible ou à la taille attendue

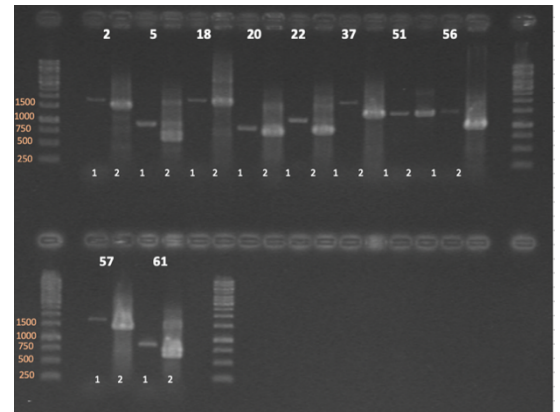
1 : bande visible sur gel à la taille attendue

1+ : bande visible sur gel à la taille attendue et présence de bande aspécifique

Marqueurs MST

Toutes les amorces ont permis d'obtenir des amplicons aux tailles attendues et sans bandes aspécifiques en PCR simple à partir de la souche de référence Nine Mile (Cf. Figure. 21). De ce fait, aucun test en PCR nichée n'a été réalisé.

Figure 21 : Dépôt sur gel des amplicons obtenus en PCR simple pour les marqueurs MST



Ces essais sur souche de référence et échantillons de poussière nous ont permis de sélectionner les marqueurs à utiliser pour le génotypage des poussières collectées dans les ateliers de ruminants. Au total, 127 échantillons en 2018 et 118 échantillons en 2019 ont fait l'objet d'une ré-extraction d'ADN en vue du génotypage.

4. Discussion

Cette étude transversale répétée sur poussière est la première à décrire la situation épidémiologique de 3 espèces de ruminants dans la région de Niort. Effectuée suite à la survenue de cas groupés en 2017, elle montre que *C. burnetii* circule chez l'ensemble des ruminants de la zone d'étude.

L'originalité de cette étude réside dans l'utilisation, d'une part, des poussières de bâtiments d'élevage comme un indicateur de circulation de la bactérie *C. burnetii* et, d'autre part, de la méthode ddPCR pour la détection et la quantification. Cette méthode s'est avérée la mieux adaptée à l'analyse d'une matrice environnementale polycontaminée.

Bien que l'objectif d'échantillonner 100 ateliers par espèce n'ait pas été atteint, cette étude porte sur un nombre d'ateliers représentatif de la zone d'étude (54% des caprins, 27% des ovins et 15% des bovins). En 2019, deux ateliers supplémentaires présents dans la zone d'exposition des cas humains groupés ont été prélevés car le tirage au sort aléatoire n'a pas permis de représenter la situation épidémiologique des ateliers présents dans cette zone. Néanmoins, l'échantillonnage est représentatif de la répartition des ateliers qui se concentrent majoritairement dans la partie nord-est de la zone d'étude.

4.1. Intérêt d'une approche par ddPCR ciblant les gènes IS1111 et ICD

Les échantillons de poussières ont été analysés par deux méthodes PCR, la qPCR habituellement utilisée pour la détection de *C. burnetii* et la ddPCR de nouvelle génération.

Avantage de la ddPCR pour l'analyse de notre matrice

Les prélèvements de poussières sont des matrices complexes. De nombreux organismes pathogènes (autres que *C. burnetii*) et des inhibiteurs de PCR peuvent être présents. La méthode ddPCR s'est avérée capable d'amplifier des échantillons inhibés en qPCR, en accord avec d'autres études qui montrent la tolérance de la méthode ddPCR face à la présence d'inhibiteurs (19) (20). De plus, elle semble avoir une limite de détection plus basse que la qPCR. L'estimation de la limite de détection et de la limite de quantification permettra de caractériser les performances de cette méthode.

Complémentarité des cibles IS1111 et ICD

Nous avons constaté que la probabilité de détecter un prélèvement positif est liée à la cible PCR utilisée. L'utilisation du gène IS1111 comme cible PCR rend la méthode plus sensible qu'avec le gène ICD. Une bonne corrélation entre les charges estimées en ciblant ces deux gènes a été observée.

Toutefois, la quantification des charges basée sur IS1111 est surestimée dans les poussières prélevées en bâtiments caprins et sous-estimée en bâtiments bovins en comparaison avec la quantification basée sur ICD. Une hypothèse pour expliquer ces différences serait que le nombre de copies du gène IS1111 diffère entre les échantillons des caprins et des bovins. En effet, parmi nos échantillons analysés pour les deux gènes, on observe que le nombre de copies d'IS1111 varie entre 14 et 973 copies par génome. Dans le panel de souches considérées dans l'étude de Klee *et al.*, le nombre de copies d'IS1111 varie entre 14 et 110 copies entre les souches. La surestimation du nombre maximal de copies dans notre étude par rapport à celle de Klee *et al.* (11) pourrait s'expliquer par le fait que ce nombre a été calculé sans exclure les résultats ICD les plus faibles. En effet, les échantillons avec des estimations du nombre de copies d'IS1111 supérieures à 400, et pour lesquels seules 5 à 22 gouttelettes sur les 20 000 analysées contenaient la cible ICD, ont été considérés dans les calculs. L'estimation de la limite de détection et de la limite de quantification de cette méthode aidera pour l'interprétation de ces cas particuliers. Par ailleurs, les résultats de génotypage permettront de vérifier si le nombre de copie d'IS1111 varie selon les génotypes.

Enfin, la présence de ces cibles PCR chez les *Coxiella*-like chez certains arthropodes (21) (22) questionnent sur la spécificité de la détection de *C. burnetii* dans les poussières des bâtiments d'élevage. Néanmoins, la mise en évidence d'un lien entre des épisodes d'avortements et la détection de *C. burnetii* dans les prélèvements de poussières tend à réfuter cette hypothèse (8).

4.2. Facteurs associés aux charges estimées

Les facteurs associés aux charges estimées ont été recherchés dans le but d'orienter les investigations épidémiologiques conduites lors de la survenue de cas humains groupés.

Une charge bactérienne élevée chez les petits ruminants

L'espèce est le facteur principal associé à la charge estimée. Celle-ci est significativement plus élevée chez les petits ruminants que chez les bovins. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment (7). En effet, on observe plus d'animaux excréteurs et des charges excrétées dans les lochies (produits de mise-bas), le mucus vaginal et dans les fécès sur le long terme plus élevées chez les petits ruminants (23) (24) (25).

Les effectifs des ateliers présentent une légère corrélation avec les charges estimées chez les caprins et les ovins mais aucune corrélation n'a pu être mise en évidence chez les bovins par les analyses univariées. De précédentes études suggèrent que plus les effectifs sont grands et plus les charges quantifiées dans les prélèvements de poussières sont élevées (7) et plus

la séroprévalence intra-troupeau est élevée (26) (27) et plus le risque de séropositivité est élevé pour les ateliers caprins (28). En effet, notre hypothèse est qu'un grand nombre d'animaux représente un grand nombre d'excréteurs. Dans notre étude, seuls les ateliers dont les effectifs sont supérieurs à 50 pour les caprins, 25 pour les ovins et 40 pour les bovins ont été inclus. Les ateliers de petites tailles ayant été exclus et ceux de très grandes tailles étant rares, nous ne sommes peut-être pas en mesure d'observer cet effet sur les analyses univariées. Ce facteur sera inclus dans le modèle multivarié. Enfin, en lien avec ce facteur, les données de surface des bâtiments n'ont pas été considérées dans cette étude. En effet, les surfaces de bâtiments sont corrélées aux effectifs des ateliers (7).

Une détection moins fréquente chez les bovins

Nous avons considéré dans cette étude qu'un atelier changeait de statut entre 2018 et 2019 si une augmentation ou une diminution de la charge estimée de plus de 2 log a été observée. Cette définition permet *a priori* de prendre en compte la marge d'erreur de la méthode dans l'attente d'une estimation précise de celle-ci. L'observation d'environ 1log de différence entre les résultats IS18 et SI19 suggère l'existence d'une variabilité de mesure d'au minimum 1log expliquée par des durées de congélations et des conditions de transport différentes

Avec cette définition de nombreux changements de statut ont été observés chez les bovins. Ainsi, 25% des ateliers bovins sont devenus négatifs et 18% sont devenus positifs entre 2018 et 2019. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les charges des poussières de bâtiment bovin sont faibles. Si ces charges sont proches de la limite de détection de notre méthode, alors leur détection est aléatoire. Nous pouvons également supposer que la présence de faible charge dans l'environnement est causée par une excrétion intermittente de la bactérie par les bovins. Par ailleurs, dans leur étude de séroprévalence sur lait de tank, Pandit et al suggèrent que l'infection par *C.burnetii* ne se maintient pas dans les troupeaux bovins quand la contamination se fait par voie aérienne par opposition à une introduction de la maladie dans le troupeau par l'achat d'un animal atteint de fièvre Q (29). Une perspective pourrait être d'étudier l'effet du vent sur le changement de statut des troupeaux bovins.

Un effet de la présence des caprins sur la positivité et la charge des ateliers bovins

La présence de caprins à proximité des ateliers bovins est statistiquement associée à une charge estimées plus élevées dans les poussières des bâtiments d'élevage de ces ateliers bovins. Ce résultat est cohérent avec l'étude de Pandit *et al.* qui montre que la transmission par les aérosols est la voie d'introduction de la bactérie la plus fréquente en troupeaux bovins (29). La contamination des bâtiments bovins par les poussières des bâtiments caprins est une

hypothèse envisageable. De plus, on peut se demander si les poussières dans lesquelles la bactérie a été détectée sont directement issues des ateliers caprins ou bien si les bovins ont été contaminés avec la souche caprine et sont eux mêmes à l'origine de la contamination des poussières de leur bâtiment. Les ateliers caprins de la région étant majoritairement en hors-sol, nous pouvons supposer que la dissémination de la bactérie est dues aux pratiques de stockage et d'épandage du fumier ou à l'utilisation de matériel agricole commun.

La confrontation des résultats de génotypage entre les prélèvements de poussières et les produits d'avortement bovins imputés à la fièvre Q dans la zone d'étude permettrons de vérifier si les bovins sont infectés par un génotype caprin. La même question pourrait se poser pour les génotypes ovins même si la présence d'ovins à proximité des ateliers bovins n'a pas été associée à des charges plus élevées dans les poussières des bâtiments de ces bovins. En effet, un manque de puissance statistique peut être à l'origine de ce résultat.

Des effets possibles d'autres facteurs

Effet densité d'animaux par commune :

Dans notre étude basée sur des analyses univariées, nous observons que la densité de ruminants et la densité de caprins par commune sont corrélées avec les charges estimées dans les poussières des bâtiments caprins. En cohérence avec ce résultat, une étude réalisée après l'épidémie majeure de fièvre Q aux Pays-bas a montré que les personnes vivant à moins de 2 km d'une ferme de chèvres ayant eu des avortements provoqués par une infection à *C. burnetii* sont 30 fois plus à risque que celles vivant à plus de 5 km (30). On peut donc supposer que la distance à un atelier caprin, et donc la densité d'ateliers caprins, est associée à un risque plus élevé de détecter *C. burnetii* dans l'environnement..

Aucune corrélation n'a été observée pour la densité d'ovins et de bovins mais ces variables seront incluses dans le modèle multivarié au cas où un effet puisse être détecté après prise en compte des autres variables par le modèle. En effet, une étude montre que le risque d'infection des ateliers de ruminants est plus élevé s'ils sont dans une zone à forte densité de bovins (>100 bovins par km² (28) (31). Toutefois, la densité de bovins dans notre zone d'étude n'excède pas les 100 animaux au km².

Statut vaccinal :

Les informations relatives au statut vaccinal des ateliers, recueillies par questionnaires, ne mettent pas en évidence d'association entre la vaccination et la positivité ou la charge en *C. burnetii* dans les poussières. Ce résultat est peut-être dû à un manque de puissance du fait des faibles effectifs considéré. Toutefois, cette relation est probablement complexe.

En effet, il existe probablement des effets de confusion avec d'autres facteurs. On peut par exemple supposer que les ateliers ovins vaccinés sont essentiellement ceux dont l'agnelage a lieu en bâtiment avec une forte contamination environnementale par les produits de mise-bas. En effet, une étude montre que l'agnelage en extérieur réduit significativement la séroprévalence des ovins par rapport à ceux dont l'agnelage s'effectue en intérieur et qui sont donc plus exposés aux aérosols (32).

Par ailleurs, la vaccination est souvent réalisée suite à une vague d'avortements imputés à la fièvre Q dans le but de diminuer les niveaux d'excrétion (33) (34) (35) (36) (37). Cette hypothèse est confortée par le fait que, d'après les réponses au questionnaire, la plupart des vaccinations n'ont pas été reconduites sur plusieurs années consécutives, et cela pour les trois espèces de ruminants. Néanmoins, la bactérie est capable de sporuler et de persister dans l'environnement (2). Bien qu'une diminution de l'excrétion puisse être observée, la contamination environnementale peut persister pendant plusieurs mois voire années (9).

L'utilisation de la vaccination comme une méthode préventive de l'infection par *C. burnetii* implique quant à elle une utilisation de préférence dans des troupeaux non infectés. Elle doit être envisagée comme un moyen de contrôle efficace sur le long terme, en ciblant préférentiellement le pré-troupeau.

Introduction d'animaux :

L'étude de Pandit *et al.* (29) suggère que l'introduction de bovins atteints de fièvre Q représente un risque élevé de contamination pour l'ensemble du troupeau. Cependant les informations relatives à l'introduction d'animaux dans notre étude ne sont disponibles que pour une proportion faible d'ateliers. Elles ont été explorées mais ne pourront pas être exploitées dans le modèle multivarié du fait d'un trop grand nombre de données manquantes.

Animaux en pâturage :

Dans la zone d'étude considérée, la quasi-totalité des ateliers caprins sont hors-sol alors que les ovins et bovins ont accès à des pâturages. Or, le pâturage représente un risque de contamination pour les élevages indemnes de fièvre Q. En effet, la mise en contact avec un atelier infecté par voisinage ou co-pâturage peut être à l'origine de l'introduction de la maladie (31). Dans notre étude, cette proximité entre élevages de ruminants n'a pas été étudiée de façon directe mais elle est indirectement considérée par les données relatives à la densité de ruminants par commune. Par ailleurs, la faune sauvage et les tiques sont des sources potentielles de transmission *C. burnetii* (37) (38) (39). Ce facteur n'a toutefois pas été considéré dans notre étude du fait de la difficulté de collecter des informations sur le contact possible avec des animaux sauvages et l'exposition aux piqûres de tiques.

Effet préleveur et date de prélèvement :

Une association statistique a été mise en évidence entre la probabilité d'obtenir un échantillon positif avec le gène IS1111 en 2019 et l'identité du préleveur. Pour des raisons pratiques, chaque préleveur a échantillonné les ateliers inclus dans sa zone de travail. Or les ateliers d'une même zone de prélèvement sont susceptibles de présenter des particularités, par exemple géographiques ou zootechniques, potentiellement associées à la charge des chiffonnettes. De plus, nous savons que les prélèvements ont été réalisés d'avril à août et qu'un effet période de prélèvement a été observé. On peut donc supposer que l'effet préleveur est en réalité confondu avec un effet de l'espèce, de la zone géographique échantillonnée et de la période de prélèvement. Ces différents facteurs seront inclus dans l'analyse multivariée.

4.3. Une approche de géotypage prometteuse

Tous les marqueurs MLVA et MST considérés et testés ont été amplifiés en PCR nichée. L'intérêt du recours à des PCR nichées était de parvenir à séquencer des échantillons faiblement chargés en ADN de *C. burnetii*. Cependant, de nombreuses bandes aspécifiques sont visibles lors du dépôt des produits PCR sur gel d'agarose. Or, la présence de ces bandes aura pour conséquence une diminution de la couverture de séquençage, c'est-à-dire du nombre de bases nucléotidiques séquencées par rapport au nombre de bases ciblées. Une diminution de la couverture implique une diminution du nombre d'amplicons séquencés pour chacun des marqueurs et par conséquent des résultats de géotypage moins exploitables.

En PCR simple, tous les marqueurs ont été amplifiés aux tailles attendues, sauf les marqueurs ms01 et ms26, sans présence de bandes aspécifiques. Ces résultats sont cohérents avec les précédentes études (15) (40). (15). Ces deux marqueurs ne seront donc pas conservés pour le géotypage.

Le succès d'amplification des marqueurs s'est avéré variable selon les prélèvements sans qu'il soit possible d'anticiper les échecs d'amplification sur la base des charges estimées à partir du gène IS1111. Des paramètres dépendant de chaque prélèvement, tels que la présence d'inhibiteurs de PCR, influencent probablement ces résultats PCR.

En conclusion, après estimation des coûts PCR pour l'amplification des 24 marqueurs conservés, une nouvelle stratégie de PCR simple haut débit a été choisie. L'utilisation de tous les marqueurs permettra d'obtenir un pouvoir discriminant optimal pour compenser la variabilité du succès d'amplification par PCR selon les échantillons. Les données de séquençage obtenues permettront de décrire la diversité des géotypes en circulation dans les ateliers de ruminants. Elles permettront en particulier de vérifier si une association espèce-géotype existe, comme mis en évidence dans une précédente étude (40), et de déterminer

si la co-circulation de génotypes dans un même élevage, déjà mise en évidence dans un élevage ovin (9) est fréquente.

4.4. Le prélèvement des poussières des bâtiments d'élevage est-il un bon indicateur de la circulation de *C. burnetii* ?

Nous allons discuter ci-dessous des avantages et inconvénients de l'utilisation des poussières prélevées en bâtiment d'élevage par rapport aux indicateurs de la circulation de *C. burnetii* couramment utilisés.

Surveillance événementielle basée sur le diagnostic différentiel des avortements

La surveillance événementielle des avortements associée à la recherche de *C. burnetii* par PCR sur les produits d'avortement peut être utilisée comme indicateur du statut des élevages de ruminants vis-à-vis de la fièvre Q (41) (42). Cependant, cette approche présente des inconvénients. En effet, plusieurs études suggèrent que *C. burnetii* peut circuler au sein des élevages sans pour autant provoquer d'avortement (41), à la fois chez les petits ruminants (43) (44) et chez les bovins (45). Cette surveillance événementielle ne permet donc pas d'évaluer le risque zoonotique de la maladie pour les élevages ne présentant pas de signes cliniques. Par ailleurs, l'obtention de ces prélèvements est dépendant de la déclaration des épisodes d'avortements par les éleveurs. Or nous savons que cette déclaration n'est pas systématique (46). Par conséquent, le nombre d'échantillons prélevés et analysables est relativement faible.

Surveillance active basée sur le prélèvement d'écouvillons vaginaux

L'ADN de *C. burnetii* peut être recherché sur des écouvillons vaginaux prélevés par un vétérinaire sur des femelles ayant mis bas récemment (9) (47). Toutefois, les délais de réalisation de ces prélèvements sont courts, sinon la bactérie peut faussement ne pas être détectée, et ils ne sont donc pas non adaptés à la réalisation d'études transversales. De plus, le coût d'analyse PCR est multiplié par le nombre d'animaux à prélevés.

Surveillance active basée sur la recherche d'anticorps dans le sérum des animaux

La recherche d'anticorps présents dans le sérum des ruminants est une méthode utilisée pour mettre en évidence une infection passée ou en cours par *C. burnetii* (41) (47). Cette approche implique la réalisation de prises de sang par un vétérinaire. De plus, les méthodes sérologiques sont peu sensibles et ne sont pas totalement spécifiques (48) donc il est

nécessaire d'échantillonner plusieurs animaux pour estimer le statut d'un troupeau. Enfin, étant donné que seule la présence d'anticorps est recherchée dans le sang, ces prélèvements ne sont pas exploitables pour la réalisation de génotypage.

Le coût d'une analyse sérologique est faible, sa réalisation est facile.

Surveillance active basée sur la recherche d'anticorps dans le lait de tank

La recherche d'anticorps à partir de lait de tank est une approche peu coûteuse s'appuyant sur un prélèvement facile à réaliser sans nécessité de faire appel à un vétérinaire (49) (50). Un seul prélèvement est en général utilisé pour définir le statut d'un élevage. Cette approche n'est par définition utilisable que dans les troupeaux laitiers et ne permet pas la réalisation de génotypage.

Avantages et inconvénients des poussières comme indicateur

Les prélèvements de poussières sont faciles à réaliser et ne dépendent pas d'événement tel que les avortements. Ainsi leur utilisation est idéale pour les études transversales. De plus, un seul prélèvement est nécessaire pour estimer le statut d'un élevage. Par conséquent le coût de cette méthode est faible et fixe par élevage échantillonné. Pour finir, l'un des avantages majeurs de cet indicateur est la possibilité d'étudier la co-circulation des génotypes au sein des élevages via le génotypage des prélèvements.

La présence d'inhibiteurs de PCR dans les poussières constitue une limite pour l'utilisation de cet indicateur. Cependant, l'analyse des prélèvements par ddPCR permet d'optimiser les conditions d'amplification PCR malgré la présence d'inhibiteurs (19). Des recherches complémentaires sont encore nécessaires notamment pour comprendre les différences de positivité et de charge détectées chez les petits ruminants et les bovins. Il serait par ailleurs intéressant d'identifier un seuil et/ou des critères de contamination environnementale permettant de considérer si un bâtiment d'élevage constitue ou non une source d'exposition associée à un risque zoonotique.

En conclusion, les prélèvements de poussières en bâtiment constituent un indicateur intéressant pour estimer le statut épidémiologique d'un élevage pour *C. burnetii* comme déjà décrit par Carrié *et al* (7) (8). De plus, cet indicateur nous a permis d'inclure un nombre d'ateliers par espèce conséquent. Enfin, ces prélèvements sont exploitables en séquençage et permettront de décrire avec une même approche et sur un même pas de temps les génotypes de *C. burnetii* en circulation chez les trois espèces de ruminants dans la région de Niort.

5. Conclusion et perspectives

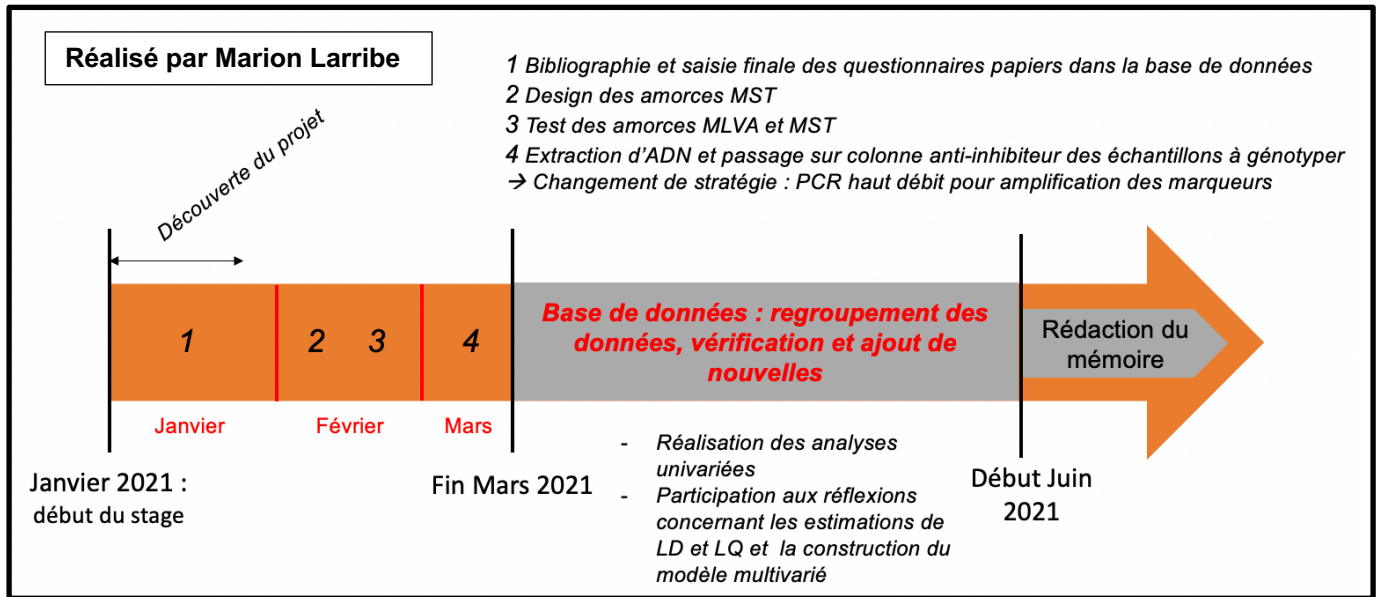
En conclusion, nous avons constaté que *C. burnetii* circule chez les trois espèces de ruminants étudiés. De plus, nous avons confirmé que l'espèce est un facteur fortement associé aux charges estimées et que l'ADN de la bactérie est détecté dans les poussières des bâtiments de la majorité des ateliers de petits ruminants.

En perspective de ce travail, un modèle multivarié est en cours d'élaboration pour estimer conjointement les effets des facteurs explorés. Ce modèle sera composé d'une part d'un modèle logistique basé sur les résultats qualitatifs (positif/négatif pour le gène IS1111) et d'autre part d'un modèle de régression linéaire multiple basé sur les charges estimées avec le gène IS1111. Les résultats du génotypage seront intégrés dans un second modèle. Enfin, des tests de viabilités vont être réalisés sur un sous-panel d'échantillons par le LNR Sophia Antipolis.

Implication personnelle

Ce stage de M2 a été réalisé dans le cadre du projet EXPAIRCOX. Dans un premier temps, il était important de comprendre tous les enjeux du projet et le rôle de chacun des acteurs. Comme représenté sur la frise chronologique ci-dessous, je suis arrivée trois ans après le début de l'étude. Les analyses PCR avaient déjà été réalisées et l'objectif initial de mon stage était de contribuer à la mise au point d'une nouvelle méthode de génotypage haut débit et d'appliquer cette méthode aux échantillons du projet EXPAIRCOX. Cet objectif a été modifié fin mars/début avril en raison d'un changement de stratégie de la méthode d'amplification des 24 marqueurs sélectionnés. En effet, initialement seuls les marqueurs MLVA aurait dû être testés et utilisés. Or l'ajout des marqueurs MST et le succès d'amplification obtenu pour l'ensemble des marqueurs ont impliqué la réalisation d'un très grand nombre de PCR (5 880 échantillons à tester en PCR simple soit 65 plaques PCR). Il a donc été décidé de sous-traiter la réalisation de ces PCR à une plateforme disposant de matériel haut débit. De plus, en raison de la COVID19, le matériel de séquençage n'a pas été livré, empêchant l'avancée du stage. Par conséquent, le sujet du mémoire a dû être réorienté vers l'étude des facteurs associés à la charge estimée de *C. burnetii* dans les poussières des bâtiments d'élevage. L'ensemble des résultats PCR et les réponses aux questionnaires étaient déjà collectés. Néanmoins, un travail de regroupement des données, de vérification et d'ajout de nouvelles informations a dû être réalisé. Une fois la base de données finalisée, j'ai pu réaliser l'ensemble des analyses univariées présentées dans ce mémoire. La réalisation d'un modèle multivarié a été envisagée mais les délais étaient trop courts pour construire un modèle adapté aux données.

Frise chronologique du déroulement du projet EXPAIRCOX et insertion du stage de M2 :

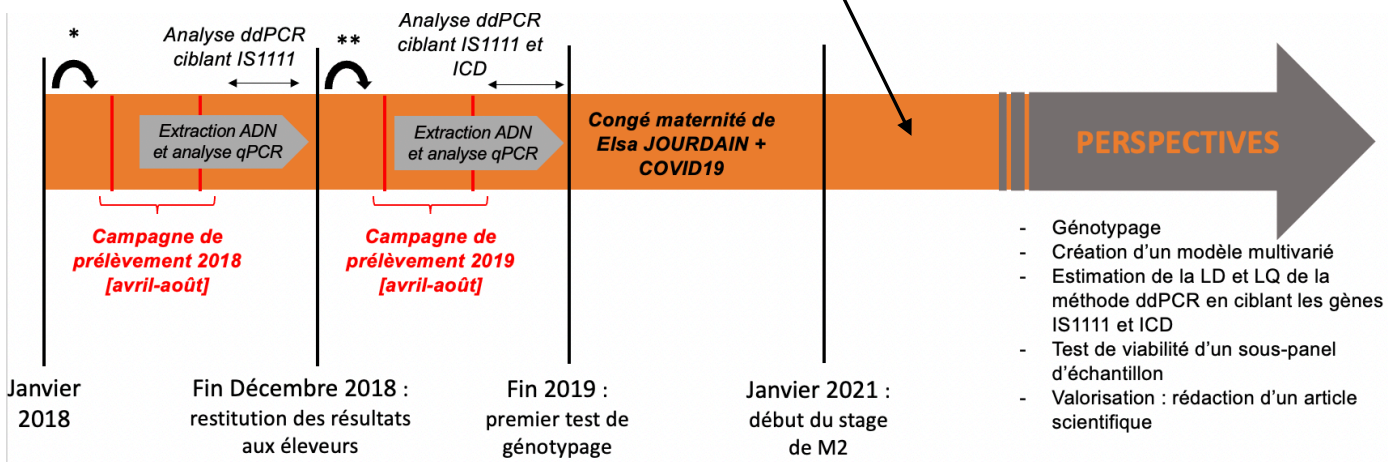


Réalisé par :

Aminah KELIET : alignement des séquences utilisés pour le design des amorces

Séverine BARRY : design des MLVA et réalisation des tests sur le site de la plateforme haut débit

David ABRIAL : réalisation des cartes de distribution par espèces et début de construction du modèle multivarié



- Rédaction du protocole d'étude
- Création du document de gestion des données personnelles (RGPD)
- Contact des éleveurs

- Reprise de contact avec les éleveurs
- Élaboration du questionnaire d'enquête
- Sélection des ateliers caprins et ovins présents dans la zone d'exposition des cas humains de 2017

Références bibliographiques

1. Derrick EH. " Q " Fever, a New Fever Entity : Clinical Features, Diagnosis and Laboratory Investigation. Med J Aust [Internet]. 1937 [cité 13 janv 2021];2(8). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.5694/j.1326-5377.1937.tb43743.x>
2. Rousset E, Russo P, Pépin M, Raoult D. Épidémiologie de la fièvre Q animale. Situation en France. Médecine et Maladies Infectieuses. Volume 31, Supplement 2, March 2001, Pages 233-246. :14.
3. Angelakis E, Raoult D. Q fever. Vet Microbiol. 27 janv 2010;140(3-4):297-309.
4. Maladies animales : la fièvre Q [Internet]. [cité 10 juin 2021]. Disponible sur: <https://agriculture.gouv.fr/maladies-animales-la-fievre-q>
5. Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, et al. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. Clin Microbiol Rev. janv 2017;30(1):115-90.
6. Brom RV den, Engelen E van, Roest HIJ, Hoek W van der, Vellema P. *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. Vet Microbiol. 14 déc 2015;181(1):119-29.
7. Carrié P. Fièvre Q en élevage de ruminants domestiques : intérêt des prélèvements environnementaux. Thèse d'exercice vétérinaire. Université Claude Bernard - LYON 1; 2016. : 138
8. Carrié P, Barry S, Rousset E, Crémoux R de, Sala C, Calavas D, et al. Swab cloths as a tool for revealing environmental contamination by Q fever in ruminant farms. Transbound Emerg Dis. 2019;66(3):1202-9.
9. Joulié A, Laroucau K, Bailly X, Prigent M, Gasqui P, Lepetitcolin E, et al. Circulation of *Coxiella burnetii* in a Naturally Infected Flock of Dairy Sheep: Shedding Dynamics, Environmental Contamination, and Genotype Diversity. Appl Environ Microbiol. oct 2015;81(20):7253-60.
10. Santé Publique France. Cas groupés de fièvre Q dans le pays niortais, avril-mai 2017. 2019 p. 30. Disponible sur : <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/nouvelle-aquitaine/documents/rapport-synthese/2019/cas-groupes-de-fievre-q-dans-le-pays-niortais-avril-mai-2017>
11. Klee R S, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii* [Internet]. Google Scholar. 2006 [cité 13 janv 2021]. Disponible sur: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2180-6-2>
12. Sahu R, Rawool DB, Vinod VK, Malik SVS, Barbuddhe SB. Current approaches for the detection of *Coxiella burnetii* infection in humans and animals. J Microbiol Methods. 1 déc 2020;179:106087.
13. de Bruin A, de Goot A, de Heer L, Bok J, Wielinga PR, Hamans M, et al. Detection of *Coxiella burnetii* in Complex Matrices by Using Multiplex Quantitative PCR during a Major Q Fever Outbreak in The Netherlands [Internet]. Applied and Environmental Microbiology. 2011 [cité 18 juin 2021]. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AEM.05097-11>
14. 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. 26 avr 2006;6:38.
15. Sidi-Boumedine K, Duquesne V, Prigent M, Yang E, Joulié A, Thiéry R, et al. Impact of IS1111 insertion on the MLVA genotyping of *Coxiella burnetii*. Microbes Infect. déc 2015;17(11-12):789-94.
16. Sidi-Boumedine K, Rousset E. Épidémiologie moléculaire de la fièvre Q: une revue des méthodes de génotypage de *Coxiella burnetii* et des principales réalisations. EuroReference. 2011;
17. Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, et al. *Coxiella burnetii* genotyping. Emerg Infect Dis. août 2005;11(8):1211-7.
18. Liste des génomes - Génome - NCBI [Internet]. [cité 18 juin 2021]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/prokaryotes/coxiella%20burnetii>
19. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. Nat Methods. oct 2013;10(10):1003-5.
20. Rački N, Dreo T, Gutierrez-Aguirre I, Blejec A, Ravnkar M. Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. Plant Methods [Internet]. 31 déc 2014 [cité 18 juin 2021];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4307183/>

21. Duron O. The IS1111 insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in Coxiella-like endosymbionts of ticks. FEMS Microbiol Lett [Internet]. 1 sept 2015 [cité 14 juin 2021];362(17). Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv132>
22. Jourdain E, Duron O, Barry S, González-Acuña D, Sidi-Boumedine K. Molecular methods routinely used to detect *Coxiella burnetii* in ticks cross-react with Coxiella-like bacteria. Infect Ecol Epidemiol [Internet]. 24 nov 2015 [cité 15 juin 2021];5. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4660934/>
23. Avis scientifique sur la fièvre Q - - 2010 - EFSA Journal - Wiley Online Library [Internet]. European Food Safety Authority. 2010 [cité 14 janv 2021]. Disponible sur: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2010.1595>
24. Álvarez-Alonso R, Basterretxea M, Barandika JF, Hurtado A, Idiazabal J, Jado I, et al. A Q Fever Outbreak with a High Rate of Abortions at a Dairy Goat Farm: *Coxiella burnetii* Shedding, Environmental Contamination, and Viability. Appl Environ Microbiol [Internet]. 1 oct 2018 [cité 20 janv 2021];84(20). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6182892/>
25. Rodolakis A, Berri M, Hécharde C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, et al. Comparison of *Coxiella burnetii* Shedding in Milk of Dairy Bovine, Caprine, and Ovine Herds. J Dairy Sci. 1 déc 2007;90(12):5352-60.
26. Rizzo F, Vitale N, Ballardini M, Borromeo V, Luzzago C, Chiavacci L, et al. Q fever seroprevalence and risk factors in sheep and goats in northwest Italy. Prev Vet Med. 1 août 2016;130:10-7.
27. Anastácio S, Tavares N, Carolino N, Sidi-Boumedine K, da Silva GJ. Serological evidence of exposure to *Coxiella burnetii* in sheep and goats in central Portugal. Vet Microbiol. 27 déc 2013;167(3):500-5.
28. Schimmer B, Lutikholt S, Hautvast JL, Graat EA, Vellema P, van Duynhoven YT. Seroprevalence and risk factors of Q fever in goats on commercial dairy goat farms in the Netherlands, 2009-2010. BMC Vet Res. 30 déc 2011;7:81.
29. Pandit P, Hoch T, Ezanno P, Beaudeau F, Vergu E. Spread of *Coxiella burnetii* between dairy cattle herds in an enzootic region: modelling contributions of airborne transmission and trade. Vet Res [Internet]. 2016 [cité 16 juin 2021];47. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4822316/>
30. Schimmer B, ter Schegget R, Wegdam M, Züchner L, de Bruin A, Schneeberger PM, et al. 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 Infect Dis. 16 mars 2010;10:69.
31. Nusinovici S, Hoch T, Widgren S, Joly A, Lindberg A, Beaudeau F. Relative contributions of neighbourhood and animal movements to *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle herds. Geospatial Health. 1 mai 2014;8(2):471-7.
32. De Lange, Schimmer B, Vellema P, Hautvast J, Schneeberger PM, Van Duijnhoven Y. *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk factors in sheep farmers and farm residents in The Netherlands. Epidemiol Infect. juin 2014;142(6):1231-44.
33. Hogerwerf L, van den Brom R, Roest HIJ, Bouma A, Vellema P, Pieterse M, et al. Reduction of *Coxiella burnetii* Prevalence by Vaccination of Goats and Sheep, the Netherlands. Emerg Infect Dis. mars 2011;17(3):379-86.
34. Arricau-Bouvery N, Souriau A, Bodier C, Dufour P, Rousset E, Rodolakis A. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. Vaccine. 15 août 2005;23(35):4392-402.
35. De Cremoux R, Rousset E, Touratier A, Audusseau G, Nicollet P, Ribaud D, et al. Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii*-inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. FEMS Immunol Med Microbiol. 1 févr 2012;64(1):104-6.
36. Tauril A-F, Guatteo R, Joly A, Beaudeau F. Effectiveness of vaccination and antibiotics to control *Coxiella burnetii* shedding around calving in dairy cows. Vet Microbiol. 12 oct 2012;159(3):432-7.
37. Astobiza I, Barandika JF, Ruiz-Fons F, Hurtado A, Povedano I, Juste RA, et al. 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. déc 2011;77(24):8799.

38. Psaroulaki A, Chochlakis D, Angelakis E, Ioannou I, Tselentis Y. *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 oct 2014;108(10):625-31.
39. Duron O, Sidi-Boumedine K, Rousset E, Moutailler S, Jourdain E. The Importance of Ticks in Q Fever Transmission: What Has (and Has Not) Been Demonstrated? *Trends Parasitol.* nov 2015;31(11):536-52.
40. Joulié 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. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* mars 2017;48:142-9.
41. Gache K, Rousset E, Perrin JB, Cremoux RD, Hosteing S, Jourdain E, et al. Estimation of the frequency of Q fever in sheep, goat and cattle herds in France: results of a 3-year study of the seroprevalence of Q fever and excretion level of *Coxiella burnetii* in abortive episodes. *Epidemiol Infect.* nov 2017;145(15):3131-42.
42. Winter F, Schoneberg C, Wolf A, Bauer BU, Prüfer TL, Fischer SF, et al. Concept of an Active Surveillance System for Q Fever in German Small Ruminants—Conflicts Between Best Practices and Feasibility. *Front Vet Sci* [Internet]. 2021 [cité 18 juin 2021];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.623786/full>
43. Berri M, Souriau A, Crosby M, Crochet D, Lechopier P, Rodolakis A. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Vet Rec.* 21 avr 2001;148(16):502-5.
44. de Cremoux R, Rousset E, Touratier A, Audusseau G, Nicollet 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.* févr 2012;64(1):120-2.
45. Muskens J, Wouda W, Bannisseht-Wijsmuller T von, Maanen C van. Prevalence of *Coxiella burnetii* infections in aborted fetuses and stillborn calves. *Vet Rec.* 2012;170(10):260-260.
46. Bronner A, Hénaux V, Vergne T, Vinard J-L, Morignat E, Hendrikx P, et al. Assessing the Mandatory Bovine Abortion Notification System in France Using Unilist Capture-Recapture Approach. *PLOS ONE.* 14 mai 2013;8(5):e63246.
47. Mori M, Roest H-J. Farming, Q fever and public health: agricultural practices and beyond. *Arch Public Health Arch Belg Sante Publique.* 2018;76:2.
48. Lurier T, Rousset E, Gasqui P, Sala C, Claustre C, Abrial D, et al. Evaluation using latent class models of the diagnostic performances of three ELISA tests commercialized for the serological diagnosis of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants. *Vet Res* [Internet]. 2021 [cité 16 juin 2021];52. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8048088/>
49. Cruz R, Esteves F, Vasconcelos-Nóbrega C, Santos C, Ferreira AS, Mega C, et al. Outbreaks of abortions by *Coxiella burnetii* in small ruminant flocks and a longitudinal serological approach on archived bulk tank milk suggest Q fever emergence in Central Portugal. *Transbound Emerg Dis.* août 2018;65(4):972-5.
50. Taurel A-F, Guatteo R, Joly A, Beaudeau F. Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of *Coxiella burnetii* in cows. *Epidemiol Infect.* sept 2012;140(9):1710-3.

Table des illustrations

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Représentation de la zone d'étude | 10 |
| Figure 2 : Comparaison des résultats qPCR et ddPCR pour les années 2018 et 2019 | 20 |
| Figure 3 : Comparaison des résultats qPCR et ddPCR (pour les échantillons classés « ininterprétables ou « positifs » en qPCR (A) et pour les échantillons dilués en raison d'une inhibition pour les analyses qPCR (B) | 20 |
| Figure 4 : Comparaison des résultats IS18 et IS19 : diagramme circulaire montrant la répartition des positifs et négatifs pour les caprins (A, n=85), les ovins (B, n=71) et les bovins (C, n=83). Distribution de la charge estimées pour les résultats positifs par espèces (caprins n=80, ovins n=59 et bovins n=41) (D)..... | 21 |
| Figure 5 : Comparaison des résultats IS18 et IS19 ; diagrammes circulaires montrant la répartition des résultats ISddPCR selon l'année ; caprin n=85 (A) ; ovin, n =70 (B) ; bovin, n=83 (C) ; distribution des charges estimées par ateliers caprins (D), ovins (E) et bovins (F) en fonction de l'année..... | 22 |
| Figure 6 : charges estimées en 2019 en ciblant le gène IS1111 : distribution dans l'espace pour les ateliers tirés au sort en lien avec les effectifs des ruminants par commune (en haut) ; histogramme de fréquence des charges estimées par espèce (en bas) | 23 |
| Figure 7 : Comparaison des résultats IS et ICD en ddPCR pour 2019..... | 24 |
| Figure 8 : Corrélation entre les résultats IS19 et ICD19 par espèce | 24 |
| Figure 9 : Distribution des charges estimées par espèce en fonction de la cible PCR ;..... | 25 |
| Figure 10 : résultats IS19 des ateliers bovins en fonction de la présence ou non d'une seconde espèce de ruminant sur le site : diagramme circulaire montrant la proportion de résultats positifs et négatifs sans présence d'une seconde espèce (A, n=64), en présence de caprins (B, n=41), en présence d'ovins (C, n=29) ; distribution des charges estimées pour les prélèvements des ateliers bovins (D)..... | 26 |
| Figure 11 : Nuages de point montrant l'absence de corrélation entre les effectifs des ateliers caprins, n=80 (A) ; ovins, n=59 (B) ; bovins, n=41 (C) et les charges estimées..... | 27 |
| Figure 12 : Distribution des charges estimées par espèce en fonction de la densité de ruminants : caprin n=80 (A) ; ovin n=59, (B) ; bovin n= 41 (C) | 27 |
| Figure 13 : Distribution des charges estimées en fonction de la densité de ruminants de l'espèce échantillonnée : caprin n= 80 (A), ovin n= 59 (B), bovin n=41(C)..... | 28 |

| | |
|--|----|
| Figure 14 : Distribution des charges estimées pour les bovins en fonction de la densité de caprins (n=41)..... | 28 |
| Figure 15 : Distribution des résultats positifs IS19 en fonction du préleveur | 29 |
| Figure 16 : Distribution des résultats positifs IS19 en fonction de la période de prélèvement | 29 |
| Figure 17 : Résultats IS19 en fonction de l'espèce et du statut vaccinal ;..... | 30 |
| Figure 18 : Distribution des résultats IS19 entre les cheptels pour lesquels il y a eu une introduction d'animaux ou non chez les caprins (A) ; chez les ovins (B) ; chez les bovins (C) | 31 |
| Figure 19 : Distribution des charges estimées entre les cheptels pour lesquels il y a eu une introduction d'animaux ou non (caprins (A) ; chez les ovins (B) ; chez les bovins (C) | 31 |
| Figure 20 : Dépôt sur gel des amplicons obtenus après PCR à partir de la souche Nine Mile pour les marqueurs MLVA : (A) PCR simple ; (B) PCR nichée (présence de bandes aspécifiques)..... | 32 |
| Figure 21 : Dépôt sur gel des amplicons obtenus en PCR simple pour les marqueurs MST. | 33 |

Table des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Synthèse des analyses univariées réalisées en fonction de la nature des variables X et Y | 16 |
| Tableau 2 : Nombre d'atelier considérés dans l'étude et taux de représentativité dans zone d'étude | 19 |
| Tableau 3 : Changement de statut défini comme étant une différence de plus ou moins deux logs entre 2018 et 2019 par espèce | 22 |
| Tableau 4 : Synthèse des données relatives à l'introduction d'animaux | 30 |

Annexes

Annexe 1 : Protocole de prélèvements de poussière en bâtiment d'élevage avec une chiffonnette Sodibox11

Annexe 2 : Questionnaire d'enquête 2019 auprès des éleveurs participant au projet EXPAIRCOX11

Annexe 1. Protocole de prélèvements de poussière en bâtiment d'élevage avec une chiffonnette Sodibox

1. Arracher la bande prédécoupée et ouvrir le sachet stérile



2. Retirer la chiffonnette stérile et procéder au prélèvement en suivant les indications suivantes :



- 2.1. Sans déplier la chiffonnette, la passer sur la **partie supérieure d'une surface étroite** (moins de 10 cm de large) **légèrement en hauteur** (40 cm du sol minimum) de type cornadis, barrière, rebord de fenêtre, poutre... sur une **longueur d'un mètre** en faisant **4 allers-retours** (=8 passages sur la même surface).



- 2.2. **Déplier puis replier la chiffonnette** pour faire apparaître une surface propre de même taille que la précédente et effectuer un prélèvement à un autre endroit du bâtiment de la même manière que précédemment (voir 4.1.).

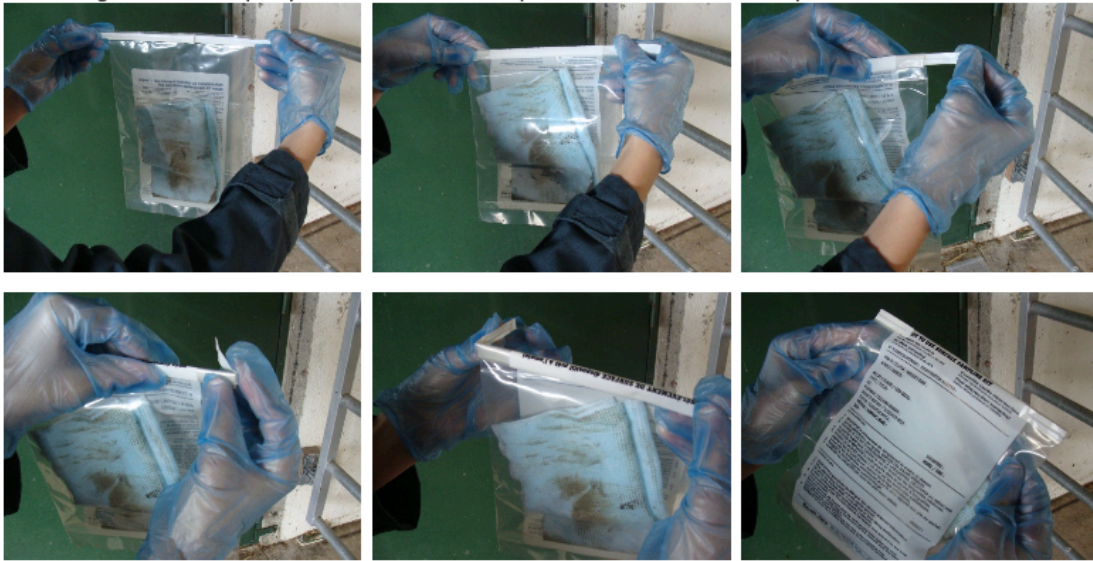


- 2.3. Renouveler l'opération de manière à obtenir un **total de 5 zones de prélèvement** à différents endroits dans le bâtiment sur la **même chiffonnette**.

3. Replacer la chiffonnette dans le sachet stérile.



4. Refermer hermétiquement le sachet en enroulant le haut du sachet sur lui-même et en repliant vers le centre les languettes métalliques présentes sur le côté en prenant soin de vider l'air au préalable.



5. Placer le sachet contenant la chiffonnette dans le sachet extérieur mis de côté (voir 2.) et fermer le sachet extérieur.

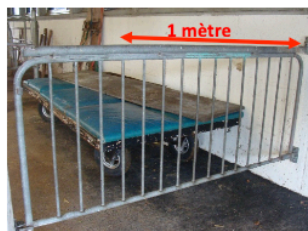


Indications pour le prélèvement de poussières

Quelles surfaces prélever ?



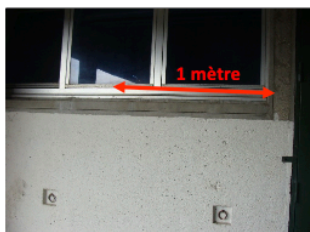
Cornadis



Barrières métalliques



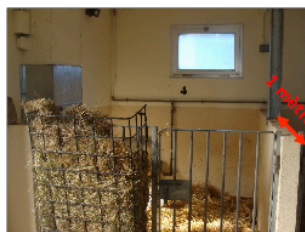
Barrières en bois



Rebords de fenêtre



Tuyauterie



Murets

... Et toutes autres surfaces étroites d'**au moins 1 mètre de longueur**, à une **hauteur de plus de 40 cm par rapport au sol**, à l'**intérieur du bâtiment d'élevage**. On pourra prendre la longueur du bras comme référence pour mesurer la longueur d'un mètre (prévoir de mesurer cette longueur sur soi avant de procéder au prélèvement).

Il faudra prélever **5 endroits différents au sein du même bâtiment** avec une même chiffonnette. Choisir les 5 lieux de prélèvement de manière à ce que l'**ensemble des zones du bâtiment où ont lieu les mises-bas soient représentées**.

Comment réaliser le prélèvement ?

6. Se laver les mains et enfiler les gants.



7. Prendre le sachet contenant la chiffonnette et conserver le sachet extérieur pour plus tard en veillant à ne pas le salir.



Comment identifier le prélèvement ?

Noter sur le sachet extérieur :

N° de département – Elevage (Ex : « GAEC des Pissenlits » ou « DUPOND Jacques ») – **Date** – **Nom du préleveur**

Conservation et transfert du prélèvement au laboratoire

Conserver le prélèvement au réfrigérateur puis le transmettre au laboratoire

Merci pour votre participation !

Annexe 2. Questionnaire d'enquête 2019 auprès des éleveurs participant au projet EXPAIRCOX

Questionnaire d'enquête 2019 : N° EXPAIRCOX

Atelier ciblé (sur lequel porte le questionnaire) : Bovin Ovin Caprin

Ateliers satellites prélevés en 2019 : Bovin Ovin Caprin

SAUF MENTION PARTICULIERE, LES QUESTIONS SE RAPPORTENT A LA PERIODE JUIN 2018/MAI-JUIN 2019

1. **Réalisation d'un nettoyage du bâtiment** : Non Oui
Si oui, quand ? :.....
Comment ? :.....
2. **Réalisation d'une désinfection du bâtiment** : Non Oui
Si oui Quand ? :
Comment ?
3. **Episodes d'avortements contagieux** (2 bovins en - de 30 jours / 3 pts rum. en - de 7 jours)
 - Depuis enquête Juin 2018 : Non Oui FQ confirmée : Non Oui Pas recherchée
 - Avant 2018 : Non Oui Préciser en quelle(s) année(s) :
FQ : Non Oui Pas recherchée Ne sait pas
4. **Elevage cible ovin, bovin ou caprin** : Quelle est la situation de votre exploitation vis-à-vis de la **Paratuberculose** :
Ne sait pas confirmée (par analyse de labo) suspectée mais non confirmée
5. **Atelier caprin seulement (cible ou satellite) : Episodes de mycoplasmoses ?** Non Oui
Si oui : Avec signes cliniques Sans signes cliniques Année(s)
6. **Vaccination fièvre Q (Coxevac® uniquement)**
 - **Mise en place suite aux résultats de l'enquête Expaircox 2018** Non Oui
 - Primipares Multipares
 - Tous les effectifs Une partie des effectifs (% approximatif :)
 - Protocole avec rappel annuel : Non Oui
 - **Aviez-vous déjà vacciné contre la fièvre Q avant l'enquête Expaircox (2018)**: Non Oui
 - Quand ? 2013 2014 2015 2016 2017
 - Qui ? : Primipares Multipares
 - Tous les effectifs Une partie des effectifs (% approximatif :)
7. **Mouvements d'animaux**
 - Y a-t-il eu des introductions en 2017-2018 (avant le prélèvement de 2018) ?
Non Ne sait plus Oui Si oui : Nullipares Reproducteurs mâle femelle
Vaccinés fièvre Q Non vaccinés fièvre Q
 - Y a-t-il eu des introductions depuis le prélèvement de 2018 ?
Non Ne sait plus Oui Si oui : Nullipares Reproducteurs
Vaccinés fièvre Q Non vaccinés fièvre Q
8. **Constatez-vous régulièrement des événements qui entraînent une remise en suspension des poussières dans le bâtiment (i.e nuées d'oiseaux, courants d'air ...)?**
Non Oui Si oui , de quelle nature ?

9. Type de litière et gestion du fumier

Type de litière utilisée : paille copeaux autre

Modalités de distribution de la litière : manuelle pailleuse

Modalités de traitement du fumier

- Epandage direct après curage
- Epandage après stockage extérieur
- Epandage après compostage
recours à une entreprise extérieure pour le compostage Non Oui
- Epandage après méthanisation

Remarques éventuelles sur le traitement des fumiers :

.....

Dans le bâtiment (lieu de collecte 2019) : Date du dernier curage

Date des dernières mises bas

- Nous autorisez-vous à avoir accès à vos résultats d'analyses réalisées sur avortements ou de recherche sérologique de fièvre Q depuis 2017 (Qualyse – Laboratoire de Vendée) : Oui Non
- Dans le cas d'un résultat positif Expaircox 2018 ou 2019 ou d'un résultat positif sur avortement, accepteriez-vous de participer à une étude sur la gestion des effluents :
Non Oui
Si oui, pour : Suivi d'un chantier de curage
Suivi d'un chantier d'épandage
Suivi d'un chantier de compostage
- Pour vous, la fièvre Q représente-t-elle des risques et si oui lesquels ?
.....
.....
- Est-ce qu'il y a d'autres agents pathogènes qui vous semblent plus menaçants et si oui lesquels ?
 - Pour les animaux
 - Pour l'Homme

Fait à le

Signature de l'éleveur

.....



Coxiella burnetii dans les poussières de bâtiments d'élevage de ruminants domestiques : étude transversale répétée dans la région de Niort et mise au point d'une méthode de génotypage

La fièvre Q est une maladie zoonotique de distribution mondiale causée par la bactérie *Coxiella burnetii*. Les ruminants domestiques sont les principaux réservoirs et la principale source des infections humaines, par voie aérienne. Début juin 2017, une augmentation inhabituelle des cas humains de fièvre Q en région niortaise a été observée. La présente étude a pour objectif d'évaluer la situation épidémiologique des élevages caprins, ovins et bovins de cette région en utilisant comme indicateurs des prélèvements de poussières effectués dans les bâtiments d'élevage.

Pour chaque espèce de ruminant, 100 ateliers ont été tirés au sort et ont fait l'objet en 2018 et 2019 d'un prélèvement de poussières avec une chiffonnette. Chaque échantillon a été analysé en PCR quantitative et digitale. Après constitution d'une base de données, des analyses univariées ont été réalisées pour identifier d'éventuels facteurs associés à la positivité et la charge bactérienne des chiffonnets. Enfin, une méthode de génotypage, basée sur le séquençage de 16 marqueurs MLVA et 10 marqueurs MST, a été développée pour caractériser les échantillons positifs. Les marqueurs et couples d'amorces publiés ont été retravaillés pour les adapter à la méthodologie utilisée et augmenter leur pouvoir discriminant. Ils ont ensuite été testés sur une souche de référence et sur des poussières.

Les résultats obtenus avec les deux méthodes de PCR étaient corrélés mais la PCR digitale s'est avérée mieux adaptée aux analyses sur poussières, en permettant de s'affranchir des problèmes d'inhibition PCR. Parmi les facteurs explorés, l'espèce du bâtiment prélevé et la présence de caprins sur le site des ateliers bovins étaient statistiquement associées à la positivité des chiffonnets et aux charges estimées. Enfin, toutes les amorces testées ont amplifié les marqueurs attendus.

En perspective de ce travail, un modèle multivarié incluant l'ensemble des facteurs explorés et les données de typages va être construit.

Mots-clés : *Coxiella burnetii*, fièvre Q, prélèvements environnementaux, MLVA, MST

Coxiella burnetii in dust sampled from domestic ruminant buildings: repeated cross-sectional study in the Niort region and development of a genotyping method

Q fever is a zoonotic disease of worldwide distribution caused by the bacterium *Coxiella burnetii*. Domestic ruminants are the main reservoirs of the disease and the main source of human infections, which are essentially airborne. In June 2017, an increase in the number human Q fever cases in the Niort region was observed. The objective of the present study is to assess the epidemiological situation of goat, sheep and cattle farms in this region using dust sampled from livestock buildings as an indicator.

For each ruminant species, 100 herds from the study area were randomly selected. Dust was sampled from the corresponding farm buildings using a swab-cloth in 2018 and 2019. Each dust sample was analyzed by quantitative and digital PCR. A database was built and univariate analyzes performed to identify factors potentially associated with swab-cloth positivity and bacterial load. Finally, a genotyping method, based on the sequencing of MLVA and MST markers, was developed to characterize the positive samples. The published markers and primer pairs were adapted to fit with the methodology used and gain in discriminatory power. They were then tested on a reference strain and on dust samples.

The results obtained with both PCR methods were satisfactorily correlated but digital PCR proved better suitable for use on dust samples because of the absence of PCR inhibition. Among the potential factors explored, the ruminant species present in the building sampled and, for ovine and cattle farms, the presence of goats on the farm, were statistically associated with swab-cloth positivity and estimated bacterial loads. Finally, all pairs of primers successfully amplified the targeted markers.

A perspective this work will consist in building a multivariate model including all the factors explored and the genotyping data.

Keywords : *Coxiella burnetii*, Q fever, environmental samples, MLVA, MST

