

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences, Technologies
ÉQUIPE : Cellule de recherche appliquée – Vaccin Diagnostic
INRA – IASP, Nouzilly

THÈSE présentée par : **Khalil YOUSEF MOHAMAD**

soutenue le : **12 octobre 2009**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**
Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Diversité génétique des souches de ***Chlamydomonas reinhardtii*** **Recherche et identification des marqueurs** **épidémiologiques**

THÈSE dirigée par :

Mme. RODOLAKIS Annie

Directeur de Recherche, INRA, Nouzilly

RAPPORTEURS :

M. DENAMUR Erick

Professeur, Université Paris 7, Paris

M. POSPISCHIL Andreas

Professeur, Université Zurich, Zurich, Suisse

JURY :

M. DENAMUR Erick

Professeur, Université Paris 7, Paris

M. GARIN-BASTUJI Bruno

Directeur de Recherche, AFSSA, Maison Alfort

M. POSPISCHIL Andreas

Professeur, Université Zurich, Zurich, Suisse

M. RASSCHAERT Denis

Professeur, Université François-Rabelais, Tours

Mme. RODOLAKIS Annie

Directeur de Recherche, INRA, Nouzilly

Remerciements

Ce travail a été réalisé sous la direction de Dr. Annie Rodolakis, directrice de recherche, et responsable de l'équipe Cellule de recherche appliquée- vaccin, diagnostic dans l'unité de recherche Infectiologie animale et santé publique du centre INRA, Nouzilly, France et soutenu par une bourse financée par l'université d'Al-Furat, Syrie.

Je remercie tout d'abord Annie Rodolakis, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pendant ces 4 années de thèse. Elle a toujours été disponible pour moi, malgré un emploi du temps assez chargé. Merci Annie pour ton soutien, ta patience et surtout la rigueur scientifique que tu m'as enseigné.

Je voudrais ensuite remercier les rapporteurs M. Denamur et M. Pospichil et les examinateurs M. Bruno et M. Rasschaert constituant mon jury de thèse pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail et également aux membres de mon comité de thèse M. Cloeckaert, M. De Ryke, M. Berri, M. Guatteo et Mme. Laroucau pour avoir suivi ce travail.

Je remercie Abdessalem Rekiki, pour son engagement dans une bonne partie de ce travail. Merci Abdessalem pour toutes les discussions scientifiques et non scientifiques pendant les deux premières années de la thèse.

Je tiens à remercier Denis Cochonneau, c'était un plaisir de partager le même bureau avec toi et de discuter de nos sujets respectifs. Merci pour ta bonne humeur et aussi pour les corrections en français.

Je tiens aussi à remercier Mustafa Berri pour sa disponibilité et sa sympathie et pour toutes discussions scientifiques très intéressantes.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux membres de l'unité IASP-311 pour leurs conseils.

A l'issue de cette thèse, j'aimerais remercier tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, ont participé à sa réalisation.

Merci AbdulRahman, pour les bons moments passés durant les 6 années en France.

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille en Syrie et en France en particulier ma femme Jawhara pour m'avoir encouragé pendant ces années très longues.

Résumé

Chlamydophila pecorum est une espèce bactérienne intracellulaire obligatoire de la famille *Chlamydiaceae*. Le criblage d'une banque génomique de *C. pecorum* en utilisant un sérum ovin spécifique a permis d'identifier la protéine de la membrane d'inclusion (IncA) comme un candidat potentiel pour le sérodiagnostic de *C. pecorum* et de mettre en évidence une séquence répétée codante (CTR) riche en alanine et proline dans le gène *incA* de *C. pecorum*. Cette CTR présente des motifs d'acides aminés différents suivant la pathogénicité des souches de *C. pecorum*.

La variabilité génétique de 19 souches de *C. pecorum* isolées de ruminant a été étudiée par MVLST (multi-virulence locus sequence typing). Les gènes *ompA* qui code pour la protéine majeure de la membrane externe, *incA* et l'ORF663 (cadre ouvert de lecture) permettent de différencier les souches pathogènes de *C. pecorum* des souches non-pathogènes. Cette hypothèse a été confirmée sur 32 autres souches comprenant 11 souches isolées de porcs.

Les souches de *C. pecorum* isolées de lésions sont génétiquement différentes des souches isolées d'animaux asymptomatiques. Les 3 gènes *ompA*, *incA* et l'ORF663 sont des marqueurs moléculaire épidémiologiques potentiels qui pourraient être liés à la virulence de *C. pecorum*.

Mot-clés : *Chlamydophila pecorum*, diagnostic, marqueur moléculaire, pathogénicité, MVLST, *incA*, *ompA*, ORF663, séquence répétée codante

Abstract

Chlamydophila pecorum, an obligate intracellular bacterium belonged to *Chlamydiaceae* family. Screening of a genomic DNA library of *C. pecorum* by using a specific ovine serum, allowed to identify inclusion membrane protein (IncA) as a potential candidate for *C. pecorum* serodiagnosis and to highlight a coding tandem repeat (CTR) rich in alanine and proline in the *C. pecorum incA* gene. The CTR presents several amino acids motifs according to the pathogenesis of *C. pecorum* strains.

The genetic variability of 19 *C. pecorum* strains isolated from ruminants was studied using MVLST (multi-virulence locus sequence typing) system. The genes *ompA* that code for the major outer membrane protein, *incA* and ORF663 (open reading frame) allowed to distinguish the pathogenic *C. pecorum* strains from non-pathogenic strains. This hypothesis was confirmed on additional 32 strains including 11 strains isolated from swine.

The *C. pecorum* strains isolated from clinical cases are genetically different from strains isolated from healthy animals. *ompA*, *incA* and ORF663 genes are epidemiological molecular markers which could be related to the virulence of *C. pecorum*.

Keywords: *Chlamydophila pecorum*, diagnosis, molecular marker, pathogenesis, MVLST, *incA*, *ompA*, ORF663, coding tandem repeats

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des figures	8
Liste des tableaux	9
Introduction	13
Revue bibliographique	14
Chapitre 1 : Historique et taxonomie de <i>Chlamydiae</i>	15
1. L'historique de <i>Chlamydiae</i>	15
2. La taxonomie de <i>Chlamydiae</i>	16
3. Identification des marqueurs épidémiologiques.....	21
3.1. Sérotypage	22
3.2. Génotypage.....	22
3.2.1. Hybridation ADN/ADN	22
3.2.2. RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA).....	23
3.2.3. PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis)	23
3.2.4. AFLP (amplified fragment length polymorphism)	24
3.2.5. Profil de restriction de l'ADN génomique total (RFLP).....	24
3.2.6. PCR- RFLP	25
3.2.7. MLST (Multi- Locus Sequences Typing)	25
3.2.8. VNTR (Variable number tandem repeats)	26
3.2.9. Les puces à ADN (Microarray)	28
Chapitre 2 : Biologie des <i>Chlamydiae</i>	30
1. Les différentes formes de <i>Chlamydiae</i>	30
1.1. Les corps élémentaires (CE)	30
1.2. Les corps réticulés (CR)	30
2. Le cycle de développement des <i>Chlamydiae</i>	31
2.1. L'attachement de la bactérie à la cellule hôte	33
2.2. L'ingestion des CE dans la cellule hôte	34
2.3. La transformation des CE en CR.....	35
2.4. La multiplication des CR et les activités métaboliques.....	35

2.5. La différenciation des CR en CE.....	38
2.6. La libération des CE dans le milieu extracellulaire.....	38
2.7. Inhibition de l'apoptose de la cellule hôte	39
2.8. La persistance	39
Chapitre 3 : Les antigènes des <i>Chlamydiae</i>	43
1. Les antigènes non protéiques	43
1.2. Le lipopolysaccharide (LPS)	43
1.3. Le glycolipide.....	44
1.4. Le peptidoglycane (PG)	44
2. Les antigènes protéiques	45
2.1. La protéine majeure de la membrane externe (MOMP).....	45
2.2. Les protéines riches en cystéines (Omp3 et Omp2)	46
2.3. Les protéines polymorphiques de la membrane externe POMP (polymorphic membrane proteins Pmp)	48
2.5. La Porine (PorB)	49
2.6. La Mip (macrophage infectivity potentiator)	49
2.4. Les protéines de choc thermique	50
2.5. Les protéines de la membrane d'inclusion.....	52
3. Le système de sécrétion de type III (T3S) et les projections de surface	55
Chapitre 4 : Les infections à <i>Chlamydiae</i>	58
1. Les manifestations cliniques	58
1.1. <i>Chlamydia trachomatis</i>	58
1.2. <i>Chlamydia muridarum</i>	58
1.3. <i>Chlamydia suis</i>	59
1.4. <i>Chlamydophila psittaci</i>	59
1.5. <i>Chlamydophila abortus</i>	60
1.6. <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	60
1.7. <i>Chlamydophila caviae</i>	61
1.8. <i>Chlamydophila felis</i>	61
1.9. <i>Chlamydophila pecorum</i>	62
2. Le diagnostic de <i>Chlamydiae</i>	65
2.1. Le diagnostic direct	65
2.2. Le diagnostic indirect	69
Résultats	72

Article 1. La protéine de la membrane d'inclusion IncA peut être considérée comme un antigène candidat pour le sérodiagnostic de <i>Chlamydomophila pecorum</i>	73
Article 2. Identification et caractérisation d'une séquence répétée codante variable du gène <i>incA</i> de <i>Chlamydomophila pecorum</i>	87
Article 3. Identification phylogénétique préliminaire des souches virulentes de <i>Chlamydomophila pecorum</i>	98
Article 4. Les gènes <i>ompA</i> , <i>incA</i> et ORF663 sont des marqueurs moléculaires épidémiologiques potentiels de <i>Chlamydomophila pecorum</i>	107
Discussion générale	128
Conclusion et perspectives	133
Références bibliographiques	134
Annexes	171
Communications scientifiques	207

Liste des figures

Figure 1 : Nouvelle (1a) et ancienne (1b) taxonomie des <i>Chlamydiaceae</i> (Bush and Everett, 2001).....	20
Figure 2 : Cycle de développement de <i>Chlamydia</i> (Mpiga and Ravaoarinoro, 2006).....	32
Figure 3 : Les activités métaboliques des CR	37
Figure 4 : Persistance <i>in vivo</i> des <i>Chlamydiae</i>	42
Figure 5 : Modèle schématique de l'enveloppe des CE de <i>C. psittaci</i> 6BC (Everett and Hatch, 1995).....	47
Figure 6 : La protéine IncA de <i>Chlamydiae</i>	54
Figure 7 : La domaine hydrophobe de la protéine IncA.....	54
Figure 8 : Structure putative de la « machinerie » de T3S de <i>Chlamydiae</i> dérivée de T3S de <i>Yersinia</i> et de <i>Salmonella</i> (Peters et al., 2007).....	57
Figure 9 : Les inclusions des <i>Chlamydiae</i> colorées par l'acridine orange	67
Figure 10 : Les inclusions des <i>Chlamydiae</i> colorées par l'immunofluorescence	67

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales étapes de la taxonomie de <i>Chlamydiae</i> et méthodes utilisées pour ces classifications.	19
Tableau 2 : Caractéristiques des corps élémentaires et des corps réticulés.	31
Tableau 3 : Modes de persistance <i>in vitro</i> des différentes espèces de <i>Chlamydiae</i> (Hogan et al., 2004).....	41
Tableau 4 : Signes cliniques induits par <i>C. pecorum</i> chez ddifférentes espèces animales	62

Liste des abréviations

ADN:	Acide Désoxyribonucléique
ADP:	Adénosine Di- Phosphate
AFLP:	Amplified Fragment Length Polymorphism
AGA:	Alanine- Glycine- Alanine
APA:	Alanine- Proline- Alanine
APAPE:	Alanine- Proline- Alanine- Proline- Glutamate
APE:	Alanine- Proline- Glutamate
APEVPA:	Alanine- Proline- Glutamate- Valine- Proline- Alanine
ARN:	Acide Ribonucléique
ARNm:	Acide ribonucléique messager
AroC:	Chorismate synthase
ATP:	Adénosine Tri- Phosphate
CCA:	Chlamydial Cytadhesin
CE:	Corps élémentaire
CFT:	Complement fixation test
CopN:	Chlamydial outer protein
CPAF:	Chlamydial Proteasome-like Activity Factor
CR:	Corps réticulé
CTR:	Coding tandem repeats
DP:	Aspartate-Proline
DV:	Domaines variables
Efp:	Translation elongation factor P
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EP:	Glutamate-Proline
FAT:	Fluorescente Antibody Test
Fts:	Filamentation Thermo- Sensible
FXXN:	Phenylalanine-X-X-Asparagine
GAG:	Glycosaminoglycane
Gap:	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GBS:	Group B <i>streptococcus</i>
GGAI	Glycine-Glycine-Alanine-Isoleucine
GLXA:	Glycolipid exoantigen
HemD:	Uroporphyrinogen-III synthase
Hsp (10, 60, 70):	Heat shock protein
HtrA:	Heat shock- induced serine protease
IAPs:	Inhibitors of Apoptosis Proteins
IF:	Immuno-fluorescence
Inc (A, B, C ...):	Inclusion membrane protein
LGV:	Lymphogranulomatose vénérienne
LPS:	Lipopolysaccharide
KDO:	Acide 3-deoxy-D-manno-octulosonic
KELPS:	Lysine-Glutamate-Leucine-Proline-Serine
KESSP:	Lysine-Glutamate-Serine-Serine-Proline
KEPLP:	Lysine-Glutamate-Proline-Leucine-Proline
KESSS:	Lysine-Glutamate-Serine-Serine-Serine
KEPSS:	Lysine-Glutamate-Proline-Serine-Serine
KKPSP:	Lysine-Lysine-Proline-Serine-Proline
MIF:	Micro-immuno-fluorescence

Mip:	Macrophage Infectivity Potentiator
MLST:	Multi-locus sequence typing
MVLST:	Multi-virulence locus sequence typing
MOMP:	Major outer membrane protein
OEA:	Ovine Enzootic Abortion
Omp (A, 2, 3):	Outer membrane protein
ORF:	Open Reading Frame
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PE:	Proline-Glutamate
PG:	Peptidoglycane
Pg3:	Chlamydial plasmid protein 3
PFGE:	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PLT:	Psittacosis, Lymphogranuloma venereum Trachoma
POMP:	Polymorphic outer membrane protein
PorB:	Porine protein B
Pmp:	Polymorphic membrane protein
RAPD:	Random amplified polymorphic DNA
RecA:	Bacterial DNA recombination
RFLP:	Restriction fragment length polymorphism
RT:	Reverse Transcriptase
ST:	Sequence Type
T3S:	Système de sécrétion de type III
Tarp:	Translocated actin recruiting phosphoprotein
VNTR:	Variable number tandem repeat

Introduction

Introduction

Chlamydophila pecorum est une espèce bactérienne de la famille des *Chlamydiaceae*. Ce sont des bactéries à Gram négatif, de petite taille, intracellulaires obligatoires avec un cycle de développement bi-phasiques. Des souches de *C. pecorum* sont présentes dans le tractus digestif et génital des ruminants, le plus souvent sans signe clinique, mais elles provoquent aussi des infections locales variées comme ; des polyarthrites, des conjonctivites, des pneumonies, des encéphalomyélites, des épидidymites, des entérites chez les ruminants et les porcs. Chez le koala, cette bactérie est responsable d'infections oculaires et urogénitales. Récemment, des infections des animaux sauvages ont également été décrites par *C. pecorum* comme la conjonctivite chez le bandicoot barré occidental et l'avortement chez le buffle. Les souches de *C. pecorum* sont non invasives dans un modèle murin c'est-à-dire qu'elles ne colonisent pas la rate après inoculation sous cutanée plantaire. Elles présentent de nombreuses variations génomiques et antigéniques.

Chez les ruminants, des souches de *C. pecorum* ont été isolées à partir d'avortement caprin au Maroc et ovin en Tunisie. Toutefois, l'incidence des souches de *C. pecorum* dans les avortements reste très faible puisque les avortements sont essentiellement dus à *C. abortus*, une espèce très homogène du point de vue antigénique et génomique. Notre laboratoire à l'INRA- Tours a développé en collaboration avec la société Pourquier- Montpellier, un antigène recombinant spécifique de *C. abortus* qui correspond à une partie des POMP (protéines polymorphiques de la membrane externe). Cependant dans quelques cas des sérums ayant un titre élevé vis-à-vis de *C. pecorum*, réagissent faiblement sur le kit ELISA recombinant perturbant le diagnostic sérologique de la chlamydiose abortive chez les petits ruminants.

L'objectif de ce travail a été de mieux appréhender le rôle de *C. pecorum* sur la santé des animaux. Pour cela il fallait I) rechercher un antigène recombinant spécifique de *C. pecorum* pouvant être utilisé dans un test ELISA permettant d'identifier les animaux infectés par *C. pecorum* et éventuellement de détecter les faux positifs du kit ELISA recombinant de l'Institut Pourquier et ainsi améliorer le diagnostic de la chlamydiose abortive des ruminants II) caractériser génétiquement les différentes souches de *C. pecorum* en cherchant des marqueurs moléculaires qui pourraient être utilisés dans les études épidémiologiques.

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Historique et taxonomie de *Chlamydiae*

1. L'historique de *Chlamydiae*

La première description des infections à *Chlamydiae* remonte à l'antiquité (1500 ans avant Jésus-Christ). Elles ont été relatées dans des écrits chinois anciens et dans des papyrus hébreux. Chez l'homme, elles correspondent à un épaissement de la conjonctive et 60 ans après Jésus-Christ, elles ont été désignées sous le nom de trachome (Thygeson, 1962). A la fin du 18^{ème} siècle, la lymphogranulomatose vénérienne (LGV) a été décrite, elle atteint l'appareil génital puis les ganglions lymphatiques inguinaux. Au début du 19^{ème} siècle, un lien est suspecté entre une infection atteignant des oiseaux exotiques de la famille des psittacidés et certaines formes de pneumonies humaines. Morange en 1895 propose pour ce type d'infection le nom de "psittacose", du mot latin psittacus qui veut dire perroquet (Morange, 1895).

Halberstädter et Von Prowasek mettent en évidence en 1907, des inclusions basophiles intracytoplasmiques chez des patients atteints de trachome. Pensant qu'ils étaient en présence de protozoaires, ils les appelèrent «Chlamydozoon » du grec Chlamus qui signifie «manteau », indiquant la manière dont le micro-organisme est présent dans une cellule (Halberstadter and von Prowazek, 1907).

En 1929-30, suite à l'importation de perruches d'Argentine, une épidémie de pneumonies atypiques a surgi aux Etats Unis, en Europe et en Afrique. Par la suite, le germe responsable a pu être isolé et cultivé (Bedson et al., 1930). En 1934, Thygeson, un ophtalmologiste a établi un lien entre la morphologie des inclusions observées dans le trachome chez l'homme et celles de la psittacose chez les oiseaux (Thygeson, 1962). Un rapprochement a été établi entre les agents du trachome, de la psittacose et de la LGV (Rake et al., 1942). A partir de 1950, un agent similaire a été identifié pour la première fois comme cause d'avortement chez les petits ruminants, par l'équipe de Stamp (Stamp et al., 1950).

En 1957, Tang et ses collaborateurs réussissent l'isolement de la bactérie sur l'embryon de poulet (Tang et al., 1957), puis Gordan et Quan décrivent en 1965 une technique d'isolement, de l'agent du trachome, sur une lignée cellulaire continue adhérente en monocouche, les cellules McCoy (Gordon and Quan, 1965a).

Les Chlamydiae ont été d'abord considérées comme des virus à cause de leur petite taille et leur multiplication uniquement à l'intérieur de cellules hôtes (Rhodes and Van Rooyen, 1962), puis comme un intermédiaire entre bactérie et virus. En 1966, Moulder a finalement prouvé qu'il s'agissait d'une bactérie. Elles possèdent plusieurs caractéristiques communes aux autres

bactéries (Moulder, 1966). Elles contiennent de l'ADN et de l'ARN, se divisent par fission binaire, sont sensibles aux antibiotiques et leur enveloppe cellulaire ressemble à celle des autres bactéries à Gram négatif malgré l'absence de peptidoglycane. *Chlamydiae* utilise la cellule hôte pour obtenir l'énergie.

2. La taxonomie de *Chlamydiae*

Tout d'abord, les souches de *Chlamydiae* ont été nommées les agents du groupe de PLT (Psittacosis, Lymphogranuloma venereum Trachoma). Puis, elles ont été classées dans l'ordre des *Rickettsiales* et la famille des *Chlamydozoceae* qui se composait de trois genres ; *Chlamydozoon*, *Myagawanella* et *Colesiota*. *Chlamydia trachomatis* et *Chlamydia psittaci* étaient les deux premières espèces qui ont été assignées au genre *Chlamydia* regroupant des bactéries intracellulaire obligatoire avec un cycle de développement unique. La distinction des deux espèces se basait sur les différences de morphologie de l'inclusions, le contenu en glycogène de cette inclusion, la sensibilité aux sulfamides et l'hôte naturel (Gordon and Quan, 1965b; Page, 1966).

Chlamydia trachomatis qui est sensible aux sulfamides, accumule le glycogène dans l'inclusion colorée à l'aide de solution d'iode et ses inclusions sont compactes. *C. trachomatis* se compose de toutes les souches des *Chlamydiae* isolées de l'homme et de l'agent responsable de la pneumonie chez les souris. Par contre, toutes les souches de *Chlamydiae* qui sont isolées de l'animal (les oiseaux ou mammifères), sont résistantes aux sulfamides, n'accumulent pas de glycogène, elles sont négatives à la coloration à l'iode, et leurs inclusions sont pléomorphes et denses. Elles sont assignées à l'espèce *Chlamydia psittaci* (Moulder, 1982; Storz et al., 1971).

En 1987, une nouvelle souche de *Chlamydiae* (TWAR) a été isolée de l'homme. Elle a des caractères phénotypiques plus proches de *C. psittaci* que *C. trachomatis*, mais se transmettent d'homme à homme sans hôte animal intermédiaire (Campbell et al., 1987). Ces souches sont classées dans une nouvelles espèce de *Chlamydiae* nommée *Chlamydia pneumoniae* en se basant sur la morphologie du CE, l'homologie ADN/ADN et les réactions sérologiques (Grayston et al., 1989).

Cependant, l'espèce *C. psittaci* regroupe des souches très différentes ; les souches aviaires très homogènes entre elles, les souches des ruminantes très hétérogènes mais également des souches isolées de porc, de cobaye de chat et de chien. Différentes études ont été réalisées pour classer ces souches d'après leur hôte, leurs propriétés morphologiques, leurs différences antigéniques ou de virulence et enfin leurs différences génomiques. Spears et Storz (1979),

ont classé les souches de *C. psittaci* en 8 biotypes en utilisant la morphologie de l'inclusion. Les souches isolées des ruminants ont été classées en 3 biotypes y compris les souches qui provoquent l'avortement (biotype1), les souches isolées des conjonctivite et des arthrites (biotype 2) et les souches intestinales (biotype 3) (Spears and Storz, 1979). Schachter et ses collaborateurs ont divisé les souches de *C. psittaci* isolées de ruminants en deux sérotypes en utilisant un test de neutralisation pour réduire le nombre de plaque de lyse; le sérotype 1 contient les souches qui entraînent l'avortement et des entérites et le sérotype 2 contient les souches qui entraînent des polyarthrites et des conjonctivites (Schachter et al., 1974; Schachter et al., 1975). En utilisant la MIF (microimmunofluorescence), les souches isolées des ruminants sont divisées en deux sérotypes; le sérotype 1 qui contient principalement les souches isolées d'avortements et le sérotype 2 contient principalement les souches intestinales (Eb and Orfila, 1982; Souriau et al., 1993). Un modèle de virulence sur souris a été développé par Rodolakis en 1986 pour étudier les propriétés invasives et abortives des différentes souches de *C. psittaci* isolées de ruminant (Rodolakis, 1986). L'inoculation sous-cutanée plantaire dans la patte des souris a permis de classer les souches de *C. psittaci* en trois groupes; 1) des souches fortement invasives qui provoquent une splénomégalie importante et une infection splénique massive. 2) des souches invasives qui induisent une augmentation modérée de la rate avec un niveau bas de l'infection splénique. 3) des souches non invasives qui n'induisent ni augmentation du poids de la rate ni infection splénique (Anderson, 1986; Rodolakis et al., 1989). Ces différences entre les souches isolées de ruminants ont été également confirmées par les profils de restriction de l'ADN génomique totale (RFLP) (Rodolakis and Souriau, 1992). Une quatrième espèce de la famille des *Chlamydiaceae* a été proposée et désignée par *Chlamydia pecorum*. Les souches de *C. pecorum* présentent plus de 88% d'homologie d'ADN/ADN entre elles et moins de 10% d'homologie avec les autres souches de *C. psittaci*, *C. pneumoniae* et *C. trachomatis* (Fukushi and Hirai, 1992; Fukushi and Hirai, 1993).

L'utilisation des séquences nucléotidiques des ARN ribosomiaux (16S et 23S) a changé la taxonomie de *Chlamydiae* comme pour les autres bactéries. Ces gènes sont soumis à une pression de sélection peu dépendante des variations du milieu extérieur et leurs présences universelles et conservées permettent de comparer des espèces bactériennes très éloignées.

L'analyse de l'espace inter- génique 16S-23S et du domaine I du gène codant pour l'ARNr 23S a abouti à deux groupes (le premier correspondant à *C. trachomatis* et le second aux trois autres espèces) avec 9 groupes génétiques distincts (Everett and Andersen, 1997). A partir de ces résultats, une nouvelle classification a été proposée (Everett et al., 1999a). Au sein de

l'ordre des *Chlamydiales*, quatre familles sont actuellement décrites : *Chlamydiaceae*, *Waddliaceae*, *Parachlamydiaceae* et *Simkaniaceae*, comprenant 6 genres et 13 espèces. La famille des *Chlamydiaceae* regrouperait deux genres, *Chlamydia* et *Chlamydophila*, et neuf espèces. Le genre *Chlamydia* comporterait 3 espèces: *Chlamydia trachomatis* responsables essentiellement d'infections oculaires et génitales chez l'homme, *Chlamydia suis* correspondrait aux souches de *C. trachomatis* d'origine porcine, *Chlamydia muridarum*, regrouperait les souches de *C. trachomatis* isolées de la souris et du hamster. Le genre *Chlamydophila* regrouperait 6 espèces: *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci* qui correspondrait aux souches d'origine aviaire, *Chlamydophila caviae* pour les anciennes souches de *C. psittaci* isolées des cobayes, *Chlamydophila felis* pour les anciennes souches de *C. psittaci* isolées des chats et *Chlamydophila abortus* correspondant aux anciennes souches de *C. psittaci* isolées d'avortements des ruminants. Les principales étapes de la taxonomie de *Chlamydiae* figurent dans le tableau 1.

Bien qu'une grande partie de la communauté scientifique semble adopter la nouvelle classification en particulier les chercheurs qui travaillent dans le domaine vétérinaire, certains scientifiques reprochent à la nouvelle classification la création de 2 genres et d'être basée essentiellement sur des différences de séquences nucléotidiques mineures pour une sélection inter- espèces de *Chlamydiae* (Schachter et al., 2001). Cette classification permet de clarifier la distinction entre les souches aviaires et les autres souches isolées des mammifères. Récemment, un seul genre (le genre *Chlamydia*) a été proposée à la place de deux genres pour regrouper les 9 espèces de la famille *Chlamydiaceae* (Stephens et al., 2009).

Sur le plan génomique, la distinction des deux genres ainsi que des différentes espèces de *Chlamydiaceae* a été également confirmée sur la base d'homologie d'autres gènes dont les séquences nucléotidiques sont moins conservées entre les différentes espèces comme; la protéine majeure de la membrane externe (MOMP), la protéine de choc thermique (GroEL), la KDO- transférase et les deux protéines riches en cystéine omp2 et omp3 (Figure 1) (Bush and Everett, 2001).

Tableau 1 : Principales étapes de la taxonomie de *Chlamydiae* et méthodes utilisées pour ces classifications.

Principales étapes	Taxonomie de <i>Chlamydiae</i>	Méthode utilisée	Référence
1	<i>Chlamydozoon</i> (Parasite)	la morphologie de l'inclusion dans la cellule infectée	(Halberstadter and von Prowazek, 1907)
2	L'ordre <i>Rickettsiales</i> les familles ; <i>Chlamydozoaceae</i> , <i>Rickettsiaceae</i> , <i>Bartonellaceae</i> les genres; <i>Chlamydozoon</i> , <i>Myagawanella</i> et <i>Colesiota</i> (Virus)	la multiplication obligatoire dans les cellules eucaryotes	(Moshkovsky, 1945)
3	l'ordre <i>Chlamydiales</i> la famille <i>Chlamydaceae</i> le genre <i>Chlamydiae</i> Les espèces: <i>C. trachomatis</i> et <i>C. psittaci</i> (Bactérie)	la morphologie d'inclusions, le contenu de glycogène, le sensibilité au sulfadiazine et l'hôte naturel	(Storz and Page, 1971)
4	L'ordre <i>Chlamydiales</i> la famille <i>Chlamydaceae</i> le genre <i>Chlamydiae</i> Les espèces: <i>C. trachomatis</i> , <i>C. psittaci</i> , <i>C. pneumoniae</i> et <i>C. pecorum</i>	l'homologie d'ADN/ADN et les réactions sérologiques	(Fukushi and Hirai, 1993; Grayston et al., 1989)
5	L'ordre <i>Chlamydiales</i> la famille <i>Chlamydaceae</i> , <i>Waddliaceae</i> , <i>Parachlamydiaceae</i> et <i>Simkaniaceae</i> le genre <i>Chlamydiae</i> et <i>Chlamydomphila</i> Les espèces: <i>C. trachomatis</i> , <i>C. muridarum</i> , <i>C. suis</i> <i>C. psittaci</i> , <i>C. pneumoniae</i> et <i>C. pecorum</i> , <i>C. abortus</i> , <i>C. caviae</i> , <i>C. felis</i>	L'analyse de l'espace inter- génique 16S-23S et du domaine I du gène codant l'ARNr 23S	(Everett et al., 1999a)

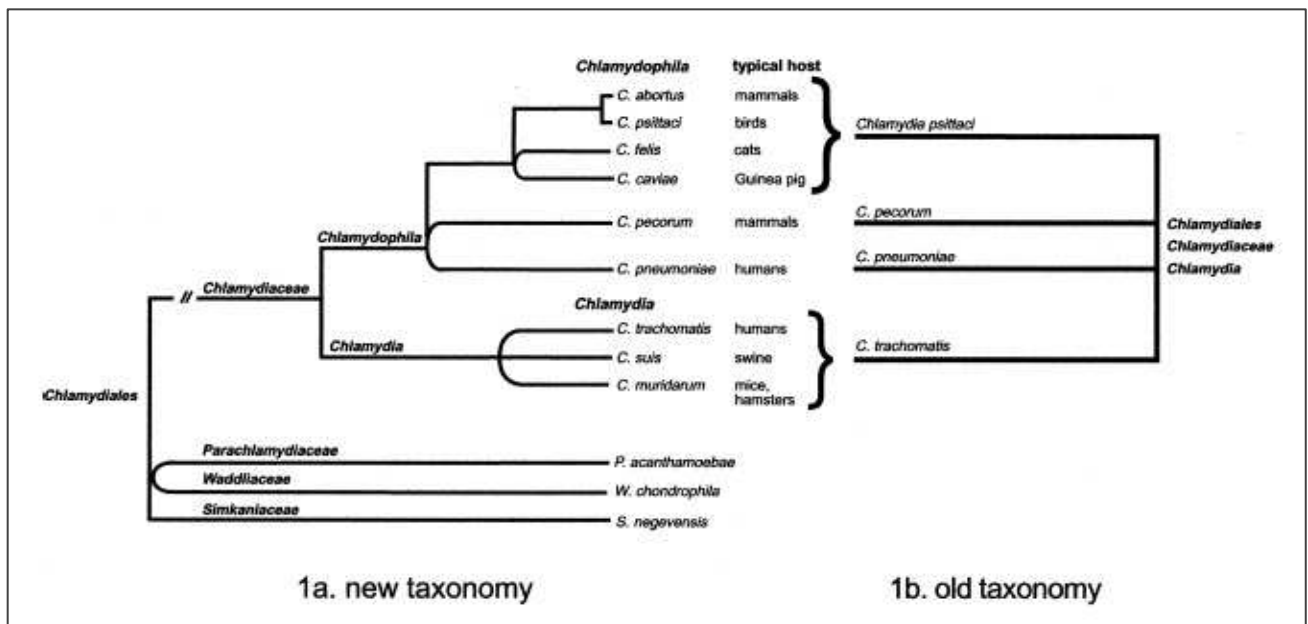


Figure 1 : Nouvelle (1a) et ancienne (1b) taxonomie des *Chlamydiaceae* (Bush and Everett, 2001)

3. Identification des marqueurs épidémiologiques

Les marqueurs épidémiologiques sont des indicateurs qui identifient les caractéristiques variables à l'intérieur d'une espèce bactérienne. Il y a 2 groupes de marqueurs épidémiologiques; les marqueurs phénotypiques et les marqueurs génotypiques ou moléculaires. L'utilisation des ces marqueurs nous permet ; I) de savoir si une épidémie est due à une souche unique ou à des souches multiples. II) de déterminer l'extension d'une épidémie. III) d'identifier les réservoirs et les sources de la transmission IV) d'évaluer l'efficacité des mesures de prévention. Les principaux critères appliqués pour choisir les bons marqueurs sont la reproductibilité, le pouvoir discriminant et la stabilité dans le temps. La reproductibilité est identifiée lors de la répétition du test (intra et extra- laboratoire). Le pouvoir discriminant est identifié par le Coefficient de Hunter et Gaston :

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j (n_j - 1)$$

N : Nombre total de souches dans l'étude, n_j : nombre de souches appartenant au type J, S : nombre de types différents (Hunter and Gaston, 1988).

La stabilité dans le temps est la capacité d'identifier la souche malgré la variation génétique qui peut se produire pendant la réplication et la diffusion de la bactérie.

Plusieurs marqueurs phénotypiques ont été utilisés comme les profils de réactions biochimiques, les caractères physiologiques et morphologiques et la caractérisation des antigènes reconnus par des anticorps monoclonaux (Biotype, Sérotype). Récemment, l'étude des marqueurs moléculaires a permis une discrimination précise des souches non différenciables par les méthodes phénotypiques (Génotype).

Les marqueurs moléculaires sont des indicateurs de la variabilité génétique qui permettent d'identifier le polymorphisme entre famille, genres, espèces, variétés, populations et même entre individus. Les marqueurs moléculaires sont des outils très efficaces pour la phylogénie moléculaire puisqu'ils peuvent établir des relations de parenté entre les individus. La majorité des stratégies de marquage moléculaire détecte des mutations ponctuelles de la séquence d'ADN comme les techniques AFLP, RFLP, MLST, VNTR..., ou bien le séquençage d'un gène de virulence est utilisé dans un but épidémiologique, pour distinguer les souches d'une même espèce. Il peut arriver que des souches paraissent identiques par un marqueur mais différents lorsque l'on utilise un autre marqueur. C'est pourquoi la combinaison de plusieurs marqueurs serait la bonne stratégie pour les études épidémiologiques.

Des marqueurs phénotypiques dans la taxonomie de *Chlamydiae*, étaient utilisés pour différencier les souches de *C. psittaci* des souches de *C. trachomatis* (Storz and Page, 1971). Puis le sérotypage par MIF en utilisant des anticorps monoclonaux, a été utilisé pour différencier les souches dans les différentes espèces de la famille *Chlamydiaceae*. A partir de l'année 90, plusieurs marqueurs moléculaires étaient proposés comme les gènes d'ARN (16S et 23S) ou les gènes qui codent pour les protéines de la membrane externe (Bush and Everett, 2001; Everett and Andersen, 1997; Everett and Andersen, 1999). L'utilisation des marqueurs moléculaires qui sont plus reproductibles, plus discriminants et plus faciles à réaliser que les marqueurs phénotypiques, facilite beaucoup les études épidémiologiques de *Chlamydiae*. Un des marqueurs le plus utilisé pour *Chlamydiae*, est le gène *ompA* qui code pour la protéine majeure de la membrane externe (MOMP) en utilisant la technique PCR- RFLP ou le séquençage. Récemment, le gène *ompA* a été également proposé pour les techniques PCR en temps réel ou Microarray pour le typage des souches de *C. psittaci* en utilisant des échantillons d'ADN obtenus directement du terrain (Mitchell et al., 2009b; Sachse et al., 2009a).

3.1. Sérotypage

Le sérotypage des souches de *Chlamydiae* est réalisé par la technique MIF (microimmunofluorescence) en utilisant des anticorps monoclonaux contre les différents épitopes de la MOMP qui sont exposés à la surface de *Chlamydiae*. Les souches de *C. trachomatis* sont divisées en trois groupes : le groupe B (B, Ba, D, D', E, L1, L2 et L2), le groupe C (A, C, H, I et J) et le groupe F (I, G, K, F et L3) (Stephens et al., 1982; Wang et al., 1985). Les souches de *C. psittaci* sont classées en 6 sérovars aviaires (A, B, C, D, E et F) et 2 sérovars non- aviaires (WC et M56) (Andersen, 1991b; Vanrompay et al., 1993). Tandis que les souches de *C. pecorum* sont trouvées très hétérogènes (16 profils différents pour 18 souches étudiées) (Salinas et al., 1996), un profil unique a été trouvé pour toutes les souches étudiées de *C. abortus* ou *C. pneumoniae* (Christiansen et al., 1997; Salinas et al., 1995).

3.2. Génotypage

3.2.1. Hybridation ADN/ADN

Cette méthode est basée sur la capacité de deux chaînes complémentaires et homologues d'ADN à former des hybrides dans des conditions données de température. Un chromosome total ou des fragments d'ADN peuvent être utilisés pour calculer le pourcentage d'homologie

et établir les relations entre les souches dans une même espèce ou entre espèces bactériennes différentes.

Cette technique est utilisée depuis les années 80 pour identifier et caractériser les nouvelles souches de *Chlamydiae*. De plus, par cette méthode, la présence du plasmide a été examinée pour chaque espèce de *Chlamydiae* en utilisant un plasmide total ou un fragment de plasmide de *C. trachomatis* ou *C. psittaci* (Campbell et al., 1987; Joseph et al., 1986). L'hybridation ADN/ADN a été l'une des principales méthodes utilisées pour distinguer les espèces de *C. pneumoniae* et de *C. pecorum* de la famille des *Chlamydiaceae* (Fukushi and Hirai, 1993; Grayston et al., 1989).

3.2.2. RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA)

La RAPD est une technique qui se base sur l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe en utilisant des amorces de courtes séquences nucléotidiques (10 à 15 pb). Cette technique ne nécessite pas une connaissance préalable du génome.

La RAPD a déjà été utilisée pour le typage de *C. trachomatis* (Scieux et al., 1993), de *C. psittaci* (Pudjiatmoko et al., 1997) et de *C. abortus* (Sidi-Boumedine, 1996). Cependant, les résultats sont peu reproductibles car les amorces choisies n'ont pas de séquences cibles. Pour cela, on peut avoir des bandes produites par une hybridation imparfaite des amorces (Meunier, 1993).

3.2.3. PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis)

Cette méthode utilise des enzymes de restriction coupant l'ADN génomique avec une fréquence peu élevée (ou rare), ce qui génère des fragments des grandes tailles qui ne peuvent être séparés que sous certaines conditions d'électrophorèse en champ pulsé.

La PFGE pour *Chlamydiae*, a tout d'abord été utilisée pour estimer la taille du chromosome total de *C. trachomatis* et *C. psittaci* (Frutos et al., 1989), puis une caractérisation physique et génétique du chromosome de *C. trachomatis* sérovar L2 a été faite en utilisant différentes enzymes de restriction (Birkelund and Stephens, 1992). Une seule étude, à ma connaissance, présente les résultats du typage des souches de *C. trachomatis* par PFGE. Dans cette étude, certains sérovars ont été trouvés polymorphes (D et Da or I et Ia) mais les autres étaient très homogènes (Rodriguez et al., 1994). La PFGE est une des méthodes qui nécessite le chromosome total bien purifié des bactéries et des quantités importantes d'ADN (plus de 1µg pour chaque réaction), ce qui n'est pas toujours facile à obtenir pour *Chlamydiae*, une bactérie intracellulaire obligatoire.

3.2.4. AFLP (amplified fragment length polymorphism)

L' AFLP, est une technique basée sur l'amplification enzymatique de l'ADN génomique par PCR. Avec cette technique qui a été développée pour le typage des bactéries par Janssen et ses collaborateurs, le polymorphisme génétique se traduit par la présence ou l'absence de fragments d'ADN issus de la restriction et de l'amplification du génome des bactéries (Janssen et al., 1996). Plusieurs étapes sont nécessaires pour réaliser l'AFLP : digestion de l'ADN par deux enzymes de restriction, ligature des adaptateurs, amplification avec des amorces sélectives et analyse des fragments par électrophorèse.

La première utilisation de l'AFLP comme méthode de typage de *Chlamydiae* a été réalisée dans notre équipe (Boumedine and Rodolakis, 1998). Des différences ont été trouvées entre les souches de *C. abortus* (une espèce très homogène), en particulier selon leur origine géographique. Par contre, l'AFLP n'a pas permis de différencier les souches de *C. pneumoniae* (Meijer et al., 1999). Un faible polymorphisme a été trouvé entre les souches de *C. trachomatis* sérovars D, E et F en utilisant l'AFLP (Morre et al., 2000). Bien que l'AFLP soit une méthode discriminante et reproductible pour différents pathogènes (Vos, 1998), elle n'est pas une bonne méthode de typage pour toutes les espèces de *Chlamydiae*. De plus, cette méthode comme PFGE, nécessite une bonne purification de l'ADN.

3.2.5. Profil de restriction de l'ADN génomique total (RFLP)

Cette technique dépend des variations de profils de digestion enzymatique du génome entier des différentes souches. Cette technique a permis de distinguer les souches de *C. psittaci* des souches de *C. trachomatis* (Peterson and de la Maza, 1983) et de séparer les différentes souches de *C. psittaci* en fonction de l'espèce hôte (oiseau, koala, ruminant et chat) (McClenaghan et al., 1984; Timms et al., 1988). En utilisant cette technique, les souches de *C. pneumoniae* et *C. pecorum* ont été séparées dans de nouvelles espèces de la famille *Chlamydiaceae* (Fukushi and Hirai, 1993; Grayston et al., 1989). Puis cette technique a été utilisée pour le typage des souches des différentes espèces de *Chlamydiae*, ex ; *C. trachomatis* (Peterson and de la Maza, 1983), *C. psittaci* (Andersen, 1991a), *C. abortus* et *C. pecorum* (Rodolakis and Souriau, 1992). Avec le séquençage du génome de différentes espèces de *Chlamydiae*, ce genre de technique qui exige l'utilisation d'ADN total purifié, est abandonné pour être remplacé par d'autres techniques qui dépendent de la caractérisation d'un ou plusieurs gènes pour classer les souches comme la PCR- RFLP ou le séquençage.

3.2.6. PCR- RFLP

La technique de PCR-RFLP consiste en la digestion enzymatique d'un gène suivi de son amplification par PCR. Elle permet l'obtention de fragments dont le nombre et la taille varient en fonction de la souche étudiée et de l'enzyme de restriction utilisée. Pour le typage de *Chlamydiae* par PCR-RFLP, c'est le gène *ompA* qui est le plus utilisé. L'utilisation de l'enzyme *AluI* a permis de distinguer les souches de *C. abortus* des souches de *C. pecorum* (Denamur et al., 1991) ainsi que les souches de *C. pecorum* entre elles. De la même manière, les souches de *C. psittaci* ont été classées en 7 génotypes aviaires (A, B, C, D, E, F, E/B) et 2 génotypes non- aviaires (WC et M56) (Sayada et al., 1995; Vanrompay et al., 1997). Les souches de *C. abortus*, *C. caviae* et *C. felis* sont trouvées très homogènes avec cette technique contrairement aux souches de *C. pecorum* (Denamur et al., 1991; Di Francesco and Baldelli, 2002; Zhao et al., 1993). Avec la diminution du prix de séquençage, les chercheurs préfèrent maintenant séquencer le gène *ompA* directement pour caractériser des nouvelles souches de *Chlamydiae*.

3.2.7. MLST (Multi- Locus Sequences Typing)

La MLST est une technique de biologie moléculaire qui a été proposée pour la première fois en 1998 pour caractériser les souches de *Neisseria meningitidis* (Maiden et al., 1998). Le principe de la MLST est de comparer des séquences d'ADN de gènes de ménage (habituellement 7 gènes) de différents fragments. Approximativement 450-500 pb de chaque gène vont être séquencées (après avoir été amplifiées par PCR). Pour chaque gène, les séquences obtenues vont être comparées et des numéros d'allèles sont assignés à chaque séquence unique. Pour un gène donné, deux souches ayant la même séquence nucléotidique porte le même numéro d'allèle, et les séquences différant même d'un seul nucléotide sont considérées comme des allèles distinctes. Chaque souche est définie par la combinaison de numéros correspondant aux allèles des loci étudiés, ce qui définit un profil allélique ou « sequence type » (ST) (Maiden et al., 1998). Pour analyser les séquences, il y a trois étapes qui sont faites par des logiciels bioinformatiques disponibles pour la plupart sur Internet. Il faut tout d'abord, récupérer les séquences (ex. BioEdit) puis faire l'alignement (ex. ClustalW) et enfin construire l'arbre phylogénétique (ex. MEGA). Deux méthodes d'agrégation sont utilisées : la méthode « Neighbor- joining » dans laquelle aucune contrainte n'est imposée dans les taux d'évolution entre les différentes branches de l'arbre et la méthode « Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages » (UPGMA) qui implique la formulation d'hypothèses évolutives, c'est-à-dire des taux de mutations identiques sur toutes les branches

de l'arbre. La valeur de « Bootstrap » est répétée 500- 1000 fois, ce qui génère 500- 1000 arbres. La fréquence d'apparition de chaque embranchement parmi les arbres est la valeur de « bootstrap » ; plus cette valeur est élevée pour un embranchement donné, plus l'association est significative

Les études phylogéniques par MLST permettent de bien comprendre les relations génétiques entre des différentes souches dans une espèce bactérienne donnée et l'importance de l'évolution due à des mutations ou des événements latéraux de transfert (Guttman and Dykhuizen, 1994). Les données de MLST ont été également exploitées dans des investigations épidémiologiques et dans des études de biologie des populations et de la pathogénicité des bactéries (Maiden, 2006). Pour certaines espèces bactériennes les gènes de ménage ne sont pas assez polymorphes pour donner des informations nécessaires pour distinguer les souches entre elles. Pour cela l'utilisation des certains gènes de virulence seuls ou associés avec les gènes de ménages (MVLST) serait peut être une solution pour améliorer la puissance discriminante entre les souches étudiées (Tankouo-Sandjong et al., 2007).

La technique MLST n'a pas été beaucoup utilisée pour *Chlamydiae*. Brunelle et Sensabaugh ont récemment comparé le polymorphisme des séquences des gènes de ménage et celles de différents espaces inter-géniques avec la séquence du gène *ompA* pour les 16 sérovars de *C. trachomatis*. Ils ont trouvé que la séquence de *ompA* est la plus polymorphe et la plus utile pour les études d'évolution et d'épidémiologie de *C. trachomatis* (Brunelle and Sensabaugh, 2006). Une faible discrimination a été trouvée en utilisant l'analyse des séquences de 7 gènes de ménage de *C. trachomatis* ou de *C. pneumoniae* (Pannekoek et al., 2008). Par contre, Klint et ses collaborateurs ont utilisé 5 régions génomiques les plus variables qui étaient choisies en comparant les séquences de 5 souches de *C. trachomatis*. Ils ont conclu que la MLST est une bonne méthode pour les études épidémiologique de *C. trachomatis* et que la résolution phylogénétique de la MLST a été significativement plus élevée que le génotypage en utilisant uniquement la séquence du gène *ompA* (Klint et al., 2007).

Actuellement, la MLST est la technique de typage la plus utilisée pour les différentes espèces bactériennes grâce à la diminution des prix du séquençage et au développement rapide des technologies informatiques et en particulier l'Internet qui assure les échanges des informations et des résultats obtenus entre des différents laboratoires.

3.2.8. VNTR (Variable number tandem repeats)

Les séquences répétées en tandem qui sont peut être identiques ou partiellement dégénérées, sont en général classées en deux types : les microsatellites et les minisatellites. Les

microsatellites sont constitués de répétitions de motifs dont la taille peut varier de 1 à 5 nucléotides. Les minisatellites sont des séquences répétées en tandem de 6 à 100 pb.

La séquence répétée qui est localisée dans une région de promoteurs d'un gène peut fonctionner comme un « switch on/off » pour l'expression de gène au niveau de la transcription (van Ham et al., 1993; Weiser et al., 1989). Les séquences répétées qui se trouvent dans les gènes ou cadre de lecture ouverte (ORF) avec une répétition de multiples de trois nucléotides sont des séquences codantes. Des variations du nombre de répétitions peuvent modifier la production du gène lui-même (Wilton et al., 1998). Par contre, les séquences répétées en tandem dans les ORFs qui ne sont pas avec une répétition de multiple de trois, peuvent induire une fin prématurée de la traduction quand une mutation change le nombre de répétitions (Henderson et al., 1999).

En général, les génomes de *C. trachomatis* et *C. pneumoniae* n'ont pas beaucoup de séquences répétées (Bavoil et al., 2000). Deux séquences répétées conservées ont été trouvées pour *Chlamydiae*; une de 22 pb qui se répète 4 fois a été trouvée dans le plasmide de *Chlamydiae* et peut avoir un rôle dans l'origine de réplication du plasmide (Comanducci et al., 1988; Tam et al., 1992). L'autre séquence répétée codante de GGAI et FXXN a été trouvée en N-terminale de toutes les protéines Pmp (Polymorphic membrane protéine) des différentes espèces de *Chlamydiae* (Grimwood and Stephens, 1999). Une séquence répétée variable de 8 nucléotides (TGCTTTAG) a été trouvée dans l'espace inter- génique *rrn-nqrF* (le gène 5S rRNA et le gène de la sous-unité F de la Na⁺-translocating NADH-quinone reductase) de *C. pecorum*. Cette séquence répétée était spécifique et variable pour les souches étudiées de *C. pecorum* (le nombre de répétition de 11-44) (Liu et al., 2007).

Avec le développement de la bioinformatique, des logiciels ont été créés (ex. tandem repeat finder), qui sont accessibles sur l'Internet et permettent d'identifier toutes les séquences répétées dans le génome total de l'organisme. Puis le design des amorces spécifiques et l'amplification par PCR classique permettent de mettre en évidence des bandes de différentes tailles correspondant aux différents nombres de répétitions (il faut utiliser pour le gel de l'électrophorèse, une agarose spéciale ultra pure pour bien séparer les bandes).

Plusieurs études ont montré que les mini et les microsatellites peuvent être utilisés comme des marqueurs pour l'identification et la caractérisation des bactéries pathogènes y compris les espèces fortement monomorphes (Adair et al., 2000; Frothingham and Meeker-O'Connell, 1998; Keim et al., 2000). La première utilisation de VNTR comme technique de typage de *Chlamydiae* a été récemment réalisée (Laroucau et al., 2008). Vingt loci ont été identifiés de 6-180 pb avec 2-6 répétitions dont 8 ont été utilisés pour le typage de 150 souches de *C.*

psittaci. Vingt profils différents ont été trouvés et les auteurs ont conclu que la VNTR est une technique plus discriminante que le sérotypage et/ou le génotypage utilisant la séquence du gène *ompA*. Les mêmes auteurs ont utilisé aussi la VNTR pour le typage de *C. abortus* (Laroucau et al., 2009). Trente quatre loci ont été identifiés de 6-33 pb avec 2-5 répétitions dont 5 loci ont été utilisés pour classer 111 souches de *C. abortus* en 6 profils (**voir Annexe 3**). Contrairement à *C. psittaci* et *C. abortus*, l'analyse des VNTR sur des souches de *C. trachomatis* n'a pas été encourageante car seulement 9 loci ont été trouvés dans le génome de *C. trachomatis* (1-3 nucléotides) dont trois ont été trouvés variables entre les souches (nombre de répétition de 1-8) (Pedersen et al., 2008).

La VNTR n'est peut être pas une bonne méthode pour le typage de *C. trachomatis* mais elle semble être très utile pour *C. abortus*. De plus, la VNTR présente l'avantage de pouvoir être utilisé pour les études épidémiologiques même en utilisant de l'ADN directement purifié à partir des échantillons du terrain sans nécessiter d'isoler et cultiver les souches. Ce qui est un réel avantage pour des bactéries comme les *Chlamydiae*.

3.2.9. Les puces à ADN (Microarray)

Une microarray est une surface solide sur laquelle sont fixées des molécules. Ces molécules sont le plus souvent des acides nucléiques : ARN, ADN, ADNc.

L'analyse par microarray repose sur l'hybridation moléculaire entre la cible (la séquence recherchée) et la sonde marquée. Les sondes sont des fragments d'acide nucléique ARN ou ADN de petite taille fixés sur un support. Elles sont utilisées pour repérer de manière spécifique des séquences d'intérêt dans un milieu complexe contenant des milliers de séquences nucléiques différentes. Le marquage est généralement effectué à l'aide de fluorophores. La nature du support est le plus souvent du verre. Le format « lame de microscope » est très utilisé (Bogarda et al., 2008).

La plupart des systèmes actuellement disponibles de puces à ADN sont créés pour analyser l'expression du gène par transcription reverse. Récemment, des microarrays ont été proposées pour identifier et classer des bactéries pathogènes comme *Mycobacterium* (Troesch et al., 1999), *Staphylococcus* (Monecke et al., 2003), *Escherichia coli* (Call et al., 2001), *Listeria* (Call et al., 2003). Sachse et ses collaborateurs ont proposé une microarray pour détecter l'ADN de *Chlamydiae* en ciblant un fragment du gène de 23S ARN ribosomal, qui a déjà été utilisé pour l'identification des différentes espèces de *Chlamydia* et *Chlamydophila* (Sachse et al., 2005). Puis les mêmes auteurs ont proposé une microarray basée sur les séquences des

domaines variables (II et IV) de *ompA* pour le diagnostic et le génotypage de *C. psittaci* (Sachse et al., 2008).

Cependant la microarray comme technique de diagnostic et de typage est pour l'instant trop chère pour être utilisée dans le domaine vétérinaire.

Chapitre 2 : Biologie des *Chlamydiae*

1. Les différentes formes de *Chlamydiae*

1.1. Les corps élémentaires (CE)

Les CE représentent la seule forme infectieuse des *Chlamydiae* au cours du cycle de développement. Ils sont métaboliquement inactifs et assurent la survie des *Chlamydiae* en dehors de la cellule hôte. Ils se présentent sous la forme de corps sphériques et rigides de 0.25 à 0.35 μm de diamètre (**Tableau 2**). Ils sont caractérisés par un nucléole dense aux électrons, excentrés et constitués d'ADN. Dans le cytoplasme, on distingue des granulations de 150 Å² correspondant aux ribosomes (Popov et al., 1978), et parfois des granulations hétérogènes de nature polysaccharidique (Eb et al., 1984). La surface des CE est hydrophobe et chargée négativement à pH neutre. Ces corps sont limités par deux systèmes membranaires: une membrane interne qui correspond à la membrane cytoplasmique, et une membrane externe de 10 nm qui présente un réseau de sous-unités protéiques sur sa face interne (Chang and Moulder, 1978; Lepinay et al., 1971; Moulder, 1983). La rigidité du complexe membranaire est due principalement aux ponts disulfures créés entre les résidus de cystéine des protéines membranaires, notamment la MOMP.

A la surface des CE, des projections externes d'une longueur de 20 nm et de 10 nm diamètre (Matsumoto, 1982b; Matsumoto et al., 1976) ainsi que des canaux trans-membranaires ont été mis en évidence. Ces structures pourraient jouer un rôle dans l'attachement des CE aux cellules hôtes, dans l'acquisition de substances nutritives ou encore dans la communication avec la cellule parasitée (Système de sécrétion de type III (ST3)) (Bavoil and Hsia, 1998).

1.2. Les corps réticulés (CR)

Le corps réticulé (CR) est la forme responsable de la réplication intracellulaire de *Chlamydiae*. Typiquement, les CR ont un diamètre de 1 micron et ils ne sont pas infectieux. Ils sont métaboliquement actifs, leur cytoplasme est riche en ribosomes, qui sont exigés pour la synthèse de protéines (**Tableau 2**). Leur acide nucléique semble diffus et fibrillaire. Ils possèdent une membrane cytoplasmique et une membrane externe, dont la surface est couverte de projections et de rosettes semblables à celles vues sur les CE, mais avec une densité plus élevée (Matsumoto, 1982a). Pendant que les CR commencent à se différencier en CE, les emplacements de la re-condensation de l'acide nucléique apparaissent dans leurs

cytoplasmes et des corps intermédiaires avec un diamètre de 0.45 à 0.60 μm semblent être entourés par la membrane d'inclusion (Orfila, 1982).

Tableau 2 : Caractéristiques des corps élémentaires et des corps réticulés.

Caractéristique	Corps élémentaire	Corps réticulé
Taille	0.2-0.3 microns	1 micron
Forme	électron dense noyau ; rigide	Fragile, polymorphique
Infection	Infectieux	Non- Infectieux
RNA : DNA ratio	1 : 1 (noyau condensé d'ADN)	3 : 1 (ribosomes)
Activités métaboliques	Relativement inactif	Actif, forme de réplication
Trypsine	Résistant	Sensible
Projections et rosettes	moins	Plus

2. Le cycle de développement des *Chlamydiae*

Après l'attachement à la surface cellulaire, les CE pénètrent dans la cellule et forment une inclusion. Quand plusieurs CE pénètrent dans la cellule hôte, plusieurs inclusions sont formées et vont fusionnées plus tard dans le cycle de développement pour former une seule inclusion (souches fusionnées). Par contre, pour certaines souches de *Chlamydiae*, les inclusions ne fusionnent jusqu'à la libération des CE (souches non-fusionnées). Bien que les mécanismes ne soient pas connus, les *Chlamydiae* inhibent la fusion du phagosome avec les lysosomes. Le CE est la forme mature, infectieuse et stable des *Chlamydiae*. Dès que le CE est entré dans la cellule, il se réorganise en une forme réticulée le CR qui est plus grosse, moins dense et plus riche en ARN. Cette forme est métaboliquement active, synthétisant des protéines et d'autres macromolécules. Après environ 8 heures, les CR commencent à se diviser par fission binaire. Approximativement 18 à 24 heures après l'infection, les CR deviennent des CE par un processus de réorganisation et de condensation. Les CE sont alors libérés lors de la lyse cellulaire pour initier un autre cycle. Les chlamydiae sous forme de CR déformés peuvent rester dans un état persistant dans la cellule hôte qui est caractérisé par des changements structuraux et métaboliques (**Figure 2**).

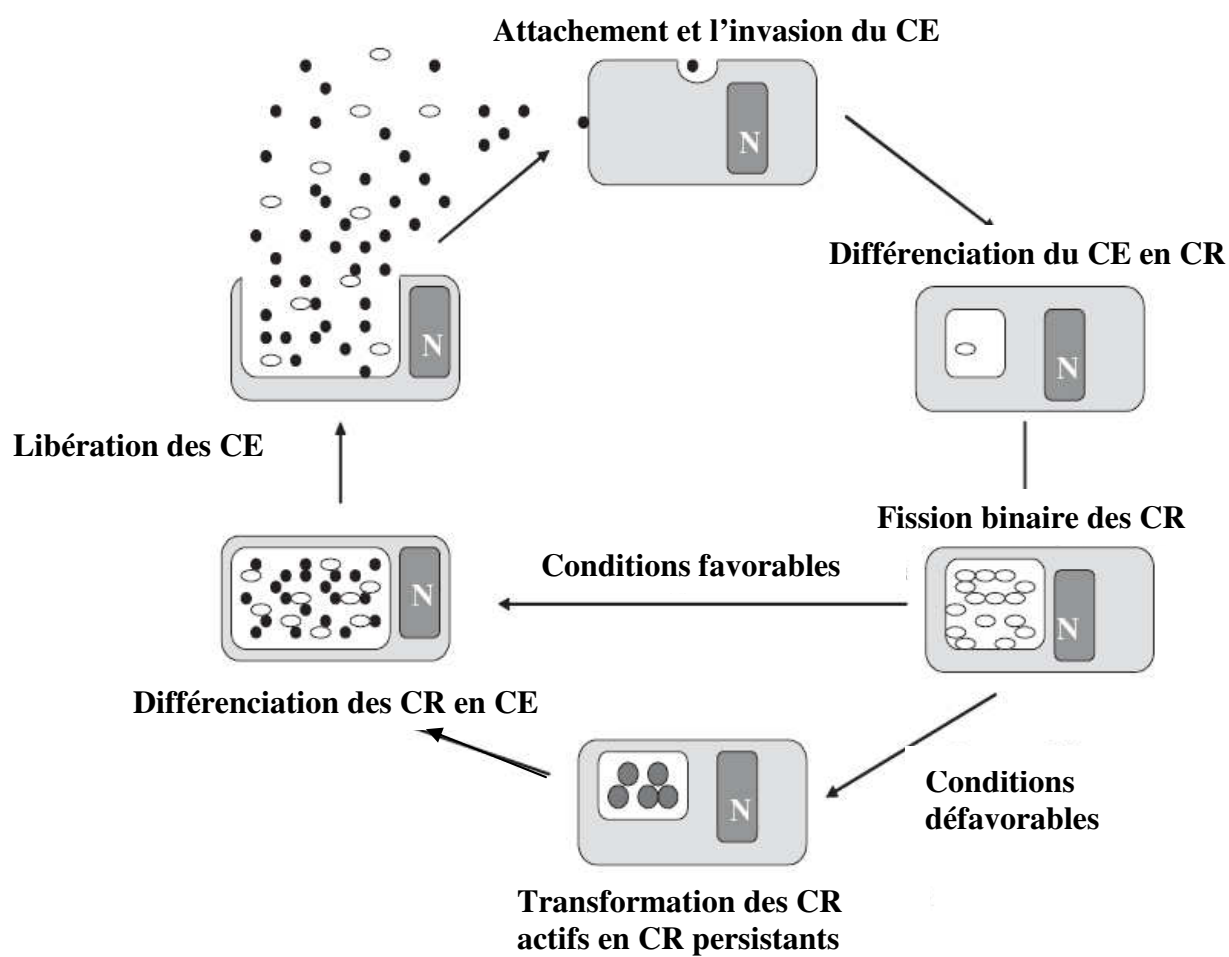


Figure 2 : Cycle de développement de *Chlamydia* (Mpiga and Ravaoarinoro, 2006)

2.1. L'attachement de la bactérie à la cellule hôte

L'interaction initiale de *Chlamydiae* avec la cellule hôte commence par l'attachement du CE à la surface de la cellule. Plusieurs facteurs interviennent dans ce phénomène comme des protéines et des polysaccharides ainsi que des interactions non spécifiques de type électrostatique et hydrophobe.

Byrne et Moulder ont démontré que les taux d'attachement de *Chlamydiae* à la cellule hôte sont déterminés par la multiplicité d'infection. Il sont plus élevés quand des faibles doses infectieuses sont utilisées (Byrne and Moulder, 1978). Hodinka et ses collègues ont observé que les bactéries préfèrent entrer dans les cellules hôtes à partir des régions de la surface cellulaire, les microvilli qui sont des domaines sur la surface permettant de transporter des matériaux extracellulaires dans les cellules (Hodinka et al., 1988). Cela pourrait être avantageux pour les *Chlamydiae* puisque l'attachement à ces endroits pourrait favoriser une entrée rapide et efficace. Comme les CE sont chargés négativement et exposés à l'interaction hydrophobe, les polycations et polyanions augmentent ou diminuent respectivement l'attachement de *Chlamydiae* à la surface de cellules. L'attachement est augmenté par les cations bivalents de calcium et magnésium qui peuvent diminuer la répulsion électrostatique (Hatch et al., 1981).

Les structures de glycosaminoglycane (GAG) comme l'héparine et le sulfate d'héparane à la surface des cellules de mammifères jouent un rôle important dans les interactions avec de nombreuses bactéries pathogènes et ils sont reconnus par les facteurs d'adhérence des virus, des bactéries ou des parasites (Rostand and Esko, 1997). L'attachement de *C. psittaci* a été bloqué par le prétraitement des cellules L avec la WGA (agglutinine du germe de blé), une lectine spécifique pour le GAG, suggérant un rôle du GAG dans l'attachement de *C. psittaci* (Levy and Moulder, 1982). Des GAG ont été identifiés dans l'attachement comme récepteur spécifique de la protéine membranaire Omp2 de *C. trachomatis* LGV (Stephens et al., 2000; Stephens et al., 2001), de *C. pneumoniae* et de *C. caviae* (Moelleken and Hegemann, 2008). Ce phénomène a été confirmé chez certains sérovars de *C. trachomatis* comme le sérovar L1 mais n'a pas été trouvé chez d'autres sérovars comme les sérovars D ou E (Stephens et al., 2006) (Fadel and Eley, 2007). La présence ou non d'un site de liaison au GAG dans la séquence du gène omp2 des différents sérovars de *C. trachomatis* pourrait expliquer ces différences (Moelleken and Hegemann, 2008).

Les protéines exposées à la surface des bactéries pourraient être impliquées dans l'attachement de *Chlamydiae* aux cellules hôtes. Su et ses collègues ont montré que la MOMP fonctionne

comme un adhésine de *Chlamydiae* à la cellule hôte (Su et al., 1996). De plus, des anticorps dirigés contre des épitopes conformationnels de la MOMP neutralisent l'infectivité de CE et l'attachement aux cellules hôtes (Fan and Stephens, 1997).

Une protéine de 38 kDa thermolabile et sensible au traitement à la trypsine, est trouvée à la surface des CE de *C. trachomatis* (Chlamydial Cytoadhesin CCA), elle a un rôle important dans l'attachement à la cellule hôte. Le traitement des cellules HeLa avec des extraits contenant la protéine CCA inhibe l'attachement des CE aux cellules (Joseph and Bose, 1991). Les mêmes auteurs, un an plus tard, ont démontré que le récepteur de CCA à la surface de la cellule hôte, est de nature protéique (Joseph and Bose, 1992). De plus, une protéine de 55 kDa PDI (disulfide isomerase qui est un composant du complexe du récepteur de l'œstrogène), pourrait être un potentiel récepteur de l'attachement de *C. trachomatis* sérovar E (Davis et al., 2002).

Le rôle de Omp2 dans l'attachement a été montré aussi pour *C. caviae* GPIC (Ting et al., 1995). D'autre part, les anticorps dirigés contre la protéine de choc thermique hsp70 (heat shock protein) de *Chlamydiae trachomatis* sérovar D peuvent également neutraliser l'infectivité des CE *in vitro* (Danilition et al., 1990). Des protéines membranaires de 18, 28, and 82 kDa de *C. trachomatis* sérovar E pourraient avoir un rôle dans l'attachement (Schmiel et al., 1991).

Toutes ces études montrent bien qu'il existe plusieurs mécanismes pour que les différentes espèces de *Chlamydiae* puissent entrer dans les cellules hôtes. Cette variabilité peut expliquer des niveaux différents de virulence entre les espèces de *Chlamydiae* et même entre les sérovars de la même espèce

2.2. L'ingestion des CE dans la cellule hôte

Après l'étape d'attachement, les CE sont rapidement internalisés en promouvant leur propre ingestion dans des phagocytes non professionnels (Moulder, 1991). Les modes d'entrée, par pinocytose, processus indépendant des microfilaments, et/ou par phagocytose, processus dépendant des microfilaments, varient selon les espèces de *Chlamydiae* mais également d'une souche à l'autre (Bavoil and Hsia, 1998).

Carabeo et ses collègues ont démontré qu'un recrutement actif des filaments d'actine au cours de l'infection de *C. trachomatis*, induit un changement de l'architecture de la membrane cellulaire (Carabeo et al., 2002). Ce phénomène a été confirmé en suite par (Clifton et al., 2004). Lors de l'attachement, les CE de *C. trachomatis* injectent la protéine Tarp (Translocated actin recruiting phosphoprotein) dans les cellules hôtes au moyen du système

de sécrétion de type III (T3S). La région N- terminale de cette protéine qui comporte une séquence répétée riche en tyrosine, est phosphorylée par la tyrosine kinase de la cellule hôte pour recruter l'actine et moduler la signalisation du cytosquelette de la cellule hôte (Jewett et al., 2006).

Après l'internalisation, les vacuoles empêchent la fusion avec les lysosomes des cellules hôtes pour assurer la réplication et la croissance des *Chlamydiae*. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette absence de fusion;

- 1- La vacuole pourrait fusionner avec des vésicules exocytiques contenant de la sphingomyéline de la cellule hôte. La Sphingomyéline est un lipide produit par l'appareil de Golgi qui est transféré à la vacuole des *Chlamydiae* pendant quelques heures après l'entrée dans la cellule hôte (Hackstadt et al., 1997). De plus, La vacuole de *Chlamydiae* acquiert des glycérophospholipides de l'appareil de Golgi et des mitochondries qui sont ensuite modifiés par les bactéries (Wylie et al., 1997).
- 2- Les *Chlamydiae* pourraient sécréter par l'intermédiaire du T3S des facteurs qui empêcheraient cette fusion. Le blocage de la transcription des *Chlamydiae* traités avec des antibiotiques entraîne une fusion rapide de la vacuole avec les lysosomes de la cellule hôte (Hackstadt et al., 1997). De plus, des protéines excrétées par les *Chlamydiae* ont été trouvées à la surface d'inclusion, les protéines de la membrane d'inclusion Inc. Ces protéines pourraient jouer un rôle dans l'inhibition de la fusion avec les lysosomes cellulaires (Rockey et al., 1995). La micro-injection d'anticorps monoclonaux anti-IncA, entraîne la fusion des vacuoles de *C. trachomatis* avec les lysosomes de la cellule hôte (Hackstadt et al., 1999).

2.3. La transformation des CE en CR

La réduction des ponts disulfure et la transformation de la MOMP en une forme monomérique constituent les plus importantes modifications accompagnant la transformation des CE en CR (Hatch et al., 1986). Cette réduction permet de fournir de l'énergie au cours des premières heures et d'exposer les pores nécessaires aux passages des différents métabolites à partir de la cellule hôte.

2.4. La multiplication des CR et les activités métaboliques

Les CR se divisent par fission binaire mais il y a au moins deux facteurs assurant la formation des septums lors de la division des procaryotes qui jusqu'ici n'ont pas été identifiés chez les *Chlamydiae*. Le premier est la filamentation thermosensible (Fts) qui se localise au niveau du

septum au cours de la division de la bactérie et le deuxième est le peptidoglycane. Une seule protéine antigénique (Sep) localisée dans le septum des CR au cours de la division de *Chlamydiae*, a été identifiée chez *C. trachomatis* et *C. psittaci* et pourrait avoir un rôle dans la division de CR (Brown and Rockey, 2000).

Le CR a besoin des métabolites de la cellule hôte pour se diviser par fission binaire. Les CE ont tendance à occuper le centre de l'inclusion, alors que la plupart des CR sont situés à la périphérie des inclusions. Fréquemment, des mitochondries ont été détectées à proximité de l'inclusion de *Chlamydiae*. L'analyse microscopique des CR en contact avec la membrane d'inclusion a montré une séparation claire (18-24 nm) entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe avec des structures denses aux électrons. Ces CR sont ceux qui sont en train de se diviser par fission binaire (Peterson and de la Maza, 1988) (**Figure 3**).

La concentration en adénosine triphosphate (ATP) des cellules infectées augmente significativement au cours de l'infection. L'infection stimule également la synthèse du glutamate et par conséquent la consommation de glucose va augmenter ainsi que la production de lactate et l'accumulation de glycogène (Ojcius et al., 1998). Cependant, d'autres causes comme le stress peuvent induire de tels changements. Cela a été confirmé par l'étude de l'infection de macrophage avec *C. pneumoniae* vivante ou tuée qui dans les deux cas ont induit des quantités élevées d'ATP dans les macrophages (Yaraei et al., 2005).

La séquence du génome de *C. trachomatis* a indiqué que les *Chlamydiae* sont des microbes aérobies qui utilisent probablement le glutamate comme principale source de carbone, et peut-être également le glucose et le 2-oxoglutarate (Bavoil et al., 2000). Cependant, une accumulation de glycogène dans l'inclusion est mise en évidence par une coloration à l'iode des cellules infectées par *C. trachomatis* mais pas dans celles qui sont infectées par *C. psittaci* (Moulder, 1991). De plus, la plupart des gènes qui codent les enzymes responsables de la synthèse de l'ATP, incluant les gènes qui codent pour les enzymes de synthèse et de dégradation du glycogène, sont présents dans le génome de *C. trachomatis* suggérant qu'elles sont capables de synthétiser une certaine quantité d'ATP (Iliffe-Lee and McClarty, 1999).

Les bactéries du genre *Chlamydiae* sont considérées comme des parasites énergétiques parce qu'une activité d'échange ATP/ADP (adénosine diphosphate) a été trouvée pour *C. psittaci* (Hatch et al., 1982). De plus, les deux gènes qui codent les deux transporteurs de l'échange ADP/ATP, NptÇt et Npt2Ct, sont trouvés dans le génome de *C. psittaci* (Bavoil et al., 2000). Le génome de *Protochlamydia amoebophila* encode 5 transporteurs putatifs dont 4 protéines ont été caractérisées biochimiquement. Le rôle de ces protéines dans le transport de l'énergie

de la cellule hôte aux bactéries a été confirmé suggérant que les *Chlamydiae* peuvent acquérir au moins une partie de leur ATP de la cellule hôte (Haferkamp et al., 2006; Trentmann et al., 2007).

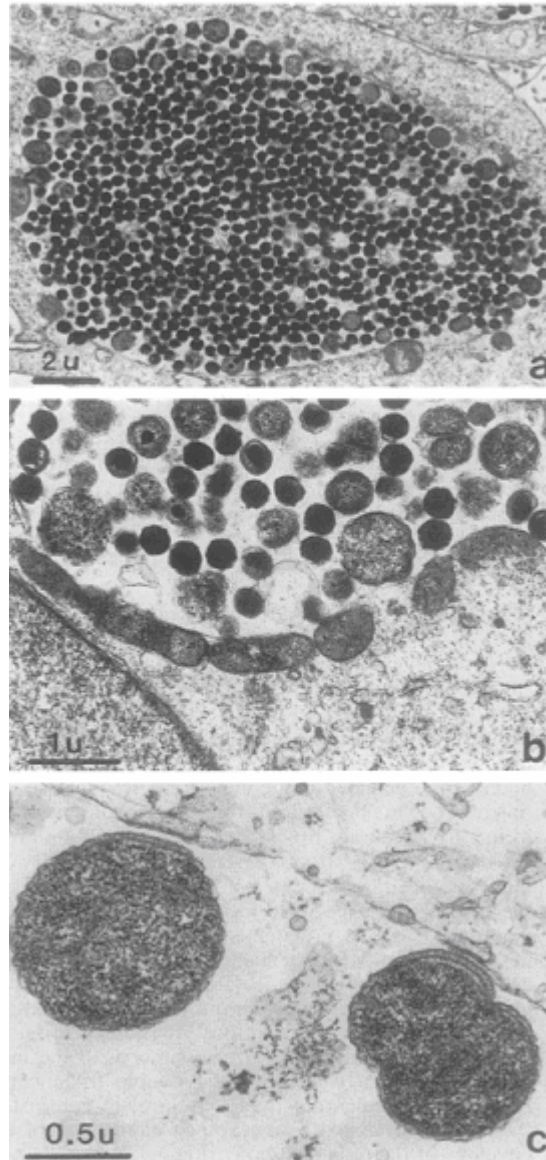


Figure 3 : Les activités métaboliques des CR

Cellules HeLa infectées par *C. psittaci*, 48h après l'infection en microscopie électronique. **a**, **b**) Les CE occupent le centre de l'inclusion, tandis que les CR sont situés à la périphérie de l'inclusion. Des mitochondries sont à proximité de l'inclusion. **c**) Deux corps réticulés en contact avec la membrane d'inclusion présentent une enveloppe modifiée au point de contact. Un CR est en train de se diviser par fission binaire (Peterson and de la Maza, 1988).

2.5. La différenciation des CR en CE

Les changements morphologiques de la différenciation commencent 36-48 h après l'infection. La diminution des niveaux d'énergie en particulier de l'ATP dans les CR et par conséquent une réduction des activités métaboliques des CR est un des signaux de la transformation de CR en CE. Cette diminution est induite par :

- 1- la formation de liaisons disulfates entre les résidus cystéines des protéines membranaires formant une membrane rigide
- 2- la séparation de la membrane d'inclusion et des CR (Bavoil et al., 1984).

D'autres signaux ont été observés au cours de la transformation en CE, comme la condensation du chromosome qui est due à l'action de deux protéines homologues d'histone (Hc1 et Hc2) (Hackstadt et al., 1993).

Récemment un modèle mathématique a été développé entre, d'une part, la longueur des canaux de T3S et le nombre d'inclusions et d'autre part, le mode de croissance de *C. trachomatis*, normal ou persistant (Hoare et al., 2008). Les auteurs ont montré que plus les inclusions s'agrandissent et plus l'activité de T3S diminue, plus le contact entre les CR et l'inclusion va diminuer. Cela va augmenter la différenciation de CR en CE ce qui correspond à une croissance normale. Plus les inclusions restent petites plus les CR gardent le contact avec la membrane d'inclusion et les activités de T3S persistent sans induire la différenciation complète de CR en CE formant des CR déformés lors du mode de croissance persistant.

Une autre étude a montré que 35 protéines de *C. pneumoniae* sont deux fois plus exprimées entre 24-48 h que lors de l'étape initiale du cycle de développement de *Chlamydiae*. Ce sont des protéines impliquées dans la biosynthèse des acides aminés, dans la modification de la membrane externe, dans la métabolisation de l'énergie et dans la régulation de la transcription (Mukhopadhyay et al., 2006). Ces protéines pourraient être impliquées dans la différenciation des CR en CE.

2.6. La libération des CE dans le milieu extracellulaire

Les CE sont libérés 48 à 72 h après l'infection soit par lyse de la cellule hôte (Moulder, 1991), soit par exocytose (Todd and Caldwell, 1985). Les nouveaux CE libérés dans le milieu extérieur, peuvent aller infecter d'autres cellules voisines en initiant un nouveau cycle. Les mécanismes de libération des CE des tissus spécialisés pourraient être plus compliqués que ceux qui sont observés dans des cultures cellulaires en monocouche. Il y a au moins trois modes de libération de *C. psittaci* des cellule épithéliales intestinales : 1) la rupture des cellules infectées ; 2) l'expulsion des cellules infectées entières dans la lumière intestinale et ;

3) l'extrusion et pincement des pseudopodes qui contiennent des *Chlamydiae* (Doughri et al., 1972; Moulder, 1991). Ce dernier mode pourrait correspondre aux souches intestinales de *C. pecorum* qui ne provoquent pas des signes cliniques chez l'animal infecté.

2.7. Inhibition de l'apoptose de la cellule hôte

La capacité des bactéries pathogènes à inhiber l'apoptose des cellules eucaryotes pendant l'infection assure la survie et la croissance des bactéries en permettant à celles-ci de se multiplier tranquillement à l'intérieure des cellules hôtes. Les bactéries pathogènes évoluent de plusieurs façons pour inhiber l'apoptose :

- 1- la protection des mitochondries en inhibant la libération du cytochrome C qui est une petite hémoprotéine associée avec la membrane interne de la mitochondrie.
- 2- l'activation des voies de survie des cellules en empêchant l'activation des caspases (cysteiny-l-aspartate-cleaving proteases) qui sont des enzymes capables de cliver des protéines au niveau de sites consensus spécifiques. Elles sont directement responsables du phénomène apoptotique de la cellule (Faherty and Maurelli, 2008). Il a déjà été montré que *Chlamydiae* pouvait inhiber les protéines pro- apoptotiques Bax et Bak de la membrane des mitochondries. La libération du Cytochrome C et l'activation des Caspases sont aussi bloquées dans les cellules infectées par *Chlamydiae* (Fan et al., 1998). Les *Chlamydiae* pourraient également sur- réguler l'expression des inhibiteurs des protéines d'apoptose (IAPs) de la cellule hôte (Rajalingam et al., 2006).

Les *Chlamydiae* utilisent sans doutes le T3S pour injecter les produits qui assurent l'inhibition de l'apoptose de la cellule hôte. Une enzyme protéase CPAF (chlamydial proteasome-like activity factor) de *Chlamydiae* a été identifiée. CPAF qui est synthétisée dans l'inclusion de *Chlamydiae*, est sécrétée dans le cytoplasme des cellules hôtes infectées (Fan et al., 2002). Récemment, le rôle de CPAF dans la dégradation des protéines pro-apoptiques et la protection de l'inclusion de *Chlamydiae* des lysosomes cellulaire a été prouvé (Dong et al., 2004; Kawana et al., 2007; Pirbhai et al., 2006).

2.8. La persistance

La capacité à induire une infection persistante est l'une des caractéristiques principales de toutes les espèces de la famille *Chlamydiaceae*. La persistance est souvent associée avec une infection chronique ou apparaît à la suite de traitements antibiotiques (Airenne et al., 1999). La persistance indique un état d'infection dans lequel la cellule hôte ne peut pas éliminer la

bactérie, ce qui induit des dommages continus. La persistance peut se transformer en maladie clinique, selon l'équilibre entre l'organisme et la cellule hôte (Hammerschlag, 2002).

De nombreuses études ont décrit des CR agrandis et pléomorphes dans l'état de persistance qui inhibe leur fission binaire et leur différenciation en CE. Ces changements sont généralement réversibles lors du dégagement de facteurs inhibiteurs de croissance. Cependant, quelles que soient les causes de la persistance *in vitro*, des similitudes générales ont été observées. Des différences significatives dans la croissance et les caractéristiques structurales ont été également rapportées (**Tableau 3**) (Hogan et al., 2004). Ces changements ont été aussi observés *in vivo* dans les intestins des porcs infectés par *C. suis* (**Figure 4**) (Pospischil et al., 2009). De plus, les profils d'expression des gènes changent généralement dans l'état de persistance (Dill et al., 2009; Hoelzle et al., 2003; Mathews et al., 2001). Cependant, l'état de persistance n'a pas de définition exacte en termes génétiques ce qui pourrait être lié *in vitro* à la cause de la persistance (Klos et al., 2009; Maurer et al., 2007; Mukhopadhyay et al., 2006).

Une corrélation entre la persistance et les souches non-fusionnées de *C. trachomatis* a été décrite par un modèle biomathématique (Peters et al., 2007). De plus, ce type de souches est fréquemment associé à l'infection génitale sub-clinique de l'homme (Geisler et al., 2001). Un autre modèle biomathématique a récemment montré une corrélation entre la taille du rayon des CR et/ou des projections de T3S qui sont en contact avec la membrane d'inclusion, et l'évolution vers la persistance comme mode de croissance des *Chlamydiae* (Hoare et al., 2008). Les auteurs ont pensé que quand le rayon des CR est supérieur à 1,3 μm , les *Chlamydiae* vont persister dans la cellule hôte.

Tableau 3 : Modes de persistance *in vitro* des différentes espèces de *Chlamydiae* (Hogan et al., 2004)

Induction	Espèce	Observations	Référence
Exposition aux antibiotiques (pénicilline)	<i>C. psittaci</i>	0-12 h, différenciation normale de CE à CR; 18-48 h, petites inclusions serrées sur des CR allongés; 28-48 h, séparation entre la membrane d'inclusion et les CR ; 36-48 h, des nucléoles multiples immatures dans le CR allongés; après élimination de pénicilline, la division des CR est redevenue normale.	(Matsumoto and Manire, 1970)
Carence en acides aminés	<i>C. trachomatis</i>	48 h, avec 10% d'acides aminés dans le milieu; les CR sont moyennement gonflés ou allongés. 72 h, avec 0% d'acides aminés; des inclusions allongées contenant quelques CR avec les nucleus (de centres denses et multiples), et des grandes formes irrégulières de CR occupent la majeure partie de l'inclusion.	(Coles et al., 1993)
Carence en fer	<i>C. trachomatis</i>	24 h, des substances électron- denses sont trouvés autour des inclusions; 72 h, les inclusions contiennent des CR de taille normale mais avec des membranes externes denses et onduleuses.	(Raulston, 1997)
Exposition à l' IFN- γ	<i>C. pneumoniae</i>	48h, petites inclusions contenant peu de CR allongés avec un aspect densitométrique dispersé	(Pantoja et al., 2001)
Infection de monocyte	<i>C. trachomatis</i>	5-7 jours, des inclusions contiennent des <i>Chlamydiae</i> avec des granules denses aux électrons; 10 jours, les inclusions contiennent des CR ovales et anormaux	(Koehler et al., 1997)
Infection par des phages	<i>C. caviae</i>	18-32 h, petites inclusions contenant peu de <i>Chlamydiae</i> , y compris des maxi- CR qui sont 2-5 fois plus large que la taille normale du CR; 32-44 h, lyse des maxi- CR et des membranes d'inclusion	(Hsia et al., 2000)
infection continue (6-7 cycles)	<i>C. trachomatis</i>	10-50% des cellules hôtes ont des inclusions contenant soit des CR normaux, soit des CR de >200 nm de diamètre qui ressemblent à des protoplastes, soit des CR de 100 nm de diamètre de formes ovales, denses et avec	(Shaw et al., 1999)

		une membrane simple	
Infection continue (plus de 4 années)	<i>C. pneumoniae</i>	10% des inclusions sont soit pratiquement normales mais contenant des substances dans la membrane de l'inclusion et quelques CR déformés avec une taille 4-5 fois plus large que la taille normale ou anormales avec des inclusions plus petites qui contiennent des CR déformés	(Kutlin et al., 2001)
Choc thermique (42°C)	<i>C. trachomatis</i>	5 h, quelques inclusions contiennent des CR avec la forme mosaïque; 20 h, les CR déformés sont prédominants	(Kahane and Friedman, 1992)

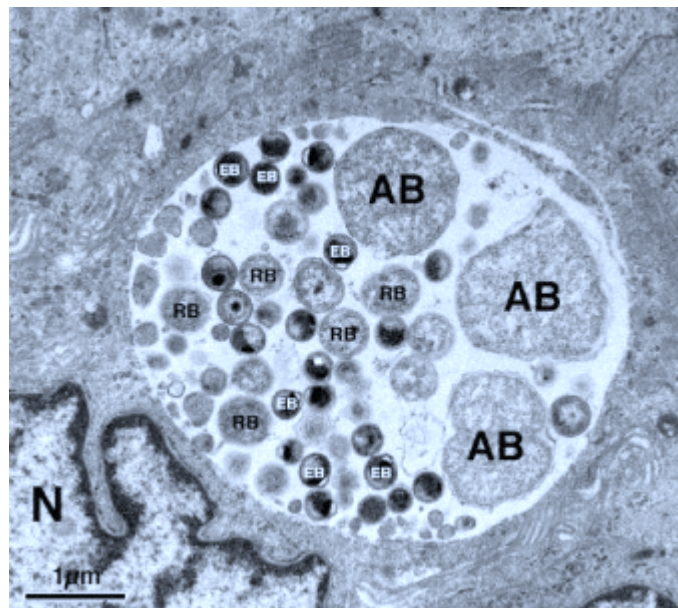


Figure 4 : Persistance *in vivo* des *Chlamydiae*

Inclusion d'une infection persistante *in vivo* de cellules intestinales de porc par *C. suis* contenant des formes anormales de CR (AB : aberrant body) (Pospischil et al., 2009).

Chapitre 3 : Les antigènes des *Chlamydiae*

1. Les antigènes non protéiques

1.2. Le lipopolysaccharide (LPS)

Comme pour les bactéries Gram négative, le LPS est un des composants majeurs de la membrane externe de toutes les espèces de *Chlamydiae*. Le LPS possède des épitopes qui est unique aux *Chlamydiae* mais également des déterminants antigéniques communs aux LPS des autres bactéries à Gram négatif (Caldwell and Hitchcock, 1984). Le LPS de *Chlamydiae* se compose de lipide A et d'acide 3-deoxy-D-manno-octulosonic (Kdo) qui est considéré comme l'antigène immunodominant du LPS (Kosma, 1999). Récemment, un anticorps contre un épitope spécifique du Kdo de *C. psittaci* a permis de distinguer les souches de *C. psittaci* de celles des *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* ou *C. pecorum* (Muller-Loennies et al., 2006). Le Kdo qui était spécifiquement identifié pour les *Chlamydiae* depuis longtemps, a été récemment détecté chez les *Acinetobacter* (Hanuszkiewicz et al., 2008).

Birkelund et ses collègues ont caractérisé deux anticorps monoclonaux dirigés contre le LPS de *Chlamydiae*, l'un réagit seulement avec les CE et l'autre réagit seulement avec les CR suggérant que le LPS pourrait être impliqué dans des rôles différents durant le cycle de développement (Birkelund et al., 1988).

Plusieurs fonctions possibles ont été attribuées au LPS de *Chlamydiae*. Le lipide A se compose de 5 acides gras dont seulement deux possèdent de longues chaînes (C20- C22). Cette structure induit une hydrophobicité élevée pour le LPS et par conséquent, une toxicité faible dans la cellule hôte (Brade et al., 1986; Nurminen et al., 1985). Cet aspect a été confirmé expérimentalement par une faible expression des cytokines des cellules HEK293 stimulées par le lipide A de *Chlamydiae* (Heine et al., 2007). Le LPS de *Chlamydiae* se lieraient à la MOMP pour potentiellement moduler l'exposition des sites antigéniques de celle ci à la surface des CE (Vretou et al., 1992). Le LPS pourrait jouer un rôle dans l'adhésion de *C. trachomatis*, ceci a été récemment démontré en traitant les cellule hôtes avec des inhibiteurs du LPS (Fadel and Eley, 2008). De plus, le LPS pourrait être exprimé dans le cytoplasme de la cellule hôte (Campbell et al., 1994; Karimi et al., 1989; Richmond and Stirling, 1981). Ceci a été récemment confirmé suggérant un rôle du LPS dans l'interaction avec des composants cytoplasmiques de la cellule hôte (Giles and Wyrick, 2008).

1.3. Le glycolipide

GLXA est un des glycolipides qui a été identifié chez *Chlamydiae* (l'exo-antigène de glycolipide). Il est différent du LPS et est associé à la membrane externe bactérienne, à la membrane d'inclusion et pourrait être trouvé aussi dans le cytoplasme de la cellule hôte (Stuart et al., 1991). L'utilisation de GLXA comme vaccin a permis une protection partielle contre l'infection génitale de la souris par *C. trachomatis* (Whittum-Hudson et al., 2001). Le prétraitement des cellules HeLa 229 avec du GLXA purifié a amélioré significativement le pouvoir infectieux de *C. trachomatis*. De plus, un anticorps dirigé contre GLXA a neutralisé *in vitro* l'infectivité de *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* et *C. psittaci* (Vora and Stuart, 2003). Ces études montrent bien le rôle de ce glycolipide dans l'attachement des *Chlamydiae* aux cellules hôtes.

1.4. Le peptidoglycane (PG)

Le peptidoglycane qui forme la paroi bactérienne, assure la protection mécanique et physique des cellules. Le PG est un polymère de N-acetylglucosamine et de N-acetylmuramic liés par des liaisons peptidiques. Contrairement aux bactéries Gram positives, le PG est plus fin et enchâssé entre la membrane externe et la membrane interne des bactéries Gram négatives.

Bien que les *Chlamydiae* soient sensibles à la pénicilline qui inhibe la synthèse du PG, aucun PG typique n'a été détecté jusqu'ici (Caldwell et al., 1981; Fox et al., 1990). Cependant, le génome de *C. trachomatis* aurait toutes les informations génétiques nécessaires pour la synthèse du peptidoglycane (Chopra et al., 1998). Au cours de l'infection par *C. trachomatis*, l'expression de certains gènes ayant un rôle dans la synthèse du PG comme *murA*, *murB* et *murC* qui sont les transférases de UDP-N-acetylglucosamine et l'enzyme *meso*-diaminopimelic acid (*m*-DAP), a été démontré par RT-PCR ou analyse biochimique (Hesse et al., 2003; McCoy et al., 2006; McCoy and Maurelli, 2005; McCoy et al., 2003). La protéine MurE a été détectée chez les CR de *C. trachomatis* suggérant qu'une synthèse de PG pourrait avoir lieu au niveau de leur divisions des CR (Skipp et al., 2005). De plus, les CE de *C. trachomatis* ou de *C. muridarum* peuvent également stimuler la récepteur cytolytique spécifique du PG sur les cellules épithéliales (Welter-Stahl et al., 2006). Toutes ces études montrent bien qu'un PG atypique, non détectable par les méthodes biochimiques classiques, pourrait être synthétisé chez *Chlamydiae*.

2. Les antigènes protéiques

2.1. La protéine majeure de la membrane externe (MOMP)

La MOMP est une protéine majeure riche en cystéines, de poids moléculaire d'environ 40 kDa qui fait partie de la membrane externe des *Chlamydiae* (**Figure 5**) (Newhall, 1987). La MOMP est présente tout au long du cycle du développement comme une porine mais sa structure est différente entre les deux formes. Les ponts disulfures qui sont bien liés par les résidus cystéines dans les CE pour assurer la rigidité, sont complètement réduits dans les CR pour que la membrane externe soit plus perméable (Bavoil et al., 1984).

La MOMP, exposée à la surface, joue un rôle dans l'attachement des CE à la cellule hôte (Fan and Stephens, 1997). Su et ses collègues ont démontré que l'infectivité des *Chlamydiae* était perdue lors du clivage de la MOMP après traitement des CE par la trypsine (Su et al., 1990a). Des anticorps dirigés contre des épitopes conformationnelles neutralisaient l'infectivité de *Chlamydiae* (Su et al., 1990b; Zhang et al., 1987). De plus, la protéine recombinante de la MOMP inhibe par compétition l'attachement des CE aux cellules hôtes (Su et al., 1996). Cependant on ne sait pas si la MOMP permet simplement d'initier les interactions électrostatiques et hydrophobes avec la surface des cellules hôtes ou si elle participe spécifiquement aux interactions avec des récepteurs spécifiques (Kuo et al., 1996). Jusqu'ici, aucun récepteur spécifique de la MOMP n'a été trouvé.

La MOMP est considéré comme la cible la plus importante pour induire une réponse immunitaire forte et protectrice. Pour cette raison, elle reste le candidat vaccinal principal contre les infections par les différentes espèces de *Chlamydiae*. Différentes méthodes ont été proposées pour exprimer la MOMP et l'utiliser comme vaccin contre les *Chlamydiae*;

- 1- La vaccination utilisant un plasmide contenant le gène *ompA* a partiellement protégé les dindes contre *C. psittaci* en empêchant les signes cliniques (Vanrompay et al., 1999; Vanrompay et al., 2001).
- 2- L'utilisation d'un adénovirus recombinant avec la MOMP a protégé les poulets contre *C. psittaci* (Zhou et al., 2007).
- 3- L'utilisation du vaccin de *Vibrio cholerae* ghosts (VCG) comme un vecteur pour exprimer la MOMP recombinante, a protégé significativement les souris contre une infection génitale par *C. trachomatis* (Macmillan et al., 2007).
- 4- Récemment, une étude a montré que les souris qui ont reçu un plasmide contenant le gène *ompA* et la protéine recombinante de la MOMP ont présenté des niveaux plus élevés d'anticorps, des lymphocytes T et des niveaux très faibles d'infection de *C.*

abortus dans la rate (Zhang et al., 2009). Cependant, le nombre de souris utilisées pour chaque groupe dans cette étude était faible (3 souris par groupe) et la souche inoculée d'épreuve était la même que celle du vaccin. De plus, un plasmide contenant le gène *ompA* qui a déjà été utilisé comme vaccin d'ADN contre *C. abortus*, n'a pas induit une protection suffisante pour protéger les souris gestante contre l'avortement y compris dans les mêmes conditions c'est-à-dire avec un rappel avec la protéine recombinante (Hechard et al., 2003a).

Une étude récente en immuno-microscopie électronique a montré que la MOMP de *C. trachomatis* a été détectée dans le cytoplasme des cellules épithéliales infectées par les *Chlamydiae* suggérant qu'elle pourrait traverser la membrane d'inclusion. La MOMP pourrait jouer un rôle dans le cycle de développement de *Chlamydiae* (Giles and Wyrick, 2008).

La MOMP se compose de 4 domaines variables (DV). Les DV sont exposés à la surface et portent les épitopes spécifiques de genre, d'espèce, de sous-espèce et de sérotypes de la famille *Chlamydiaceae* (Batteiger et al., 1996; Caldwell and Judd, 1982). En utilisant des anticorps monoclonaux contre ces DV, les souches de *C. trachomatis* sont classées en différents sérovars (Stephens et al., 1987; Stephens et al., 1988). Le gène *ompA* est le gène le plus variable dans le génome de *Chlamydiae*. A cause de cette variabilité génétique, on peut l'utiliser pour les études de typage, d'épidémiologie et d'évolution des différentes souches de *Chlamydiae* (Brunelle and Sensabaugh, 2006).

2.2. Les protéines riches en cystéines (Omp3 et Omp2)

Les deux protéines de la membrane externe Omp3 et Omp2 ont été également nommées small et large CRP (cystein rich protein), EnvA et EnvB (enveloppe protein) et OmcA et OmcB (outer membrane complex) respectivement (Allen and Stephens, 1993; Everett and Hatch, 1991; Hatch, 1996). Ces deux protéines riches en cystéines sont codées par la même opéron (Watson et al., 1995).

Omp3 est une lipoprotéine de 15 kDa par la présence du signal peptidase II et peut accéder à la surface des CE par sa partie lipidique (**Figure 5**) (Everett et al., 1994).

La présence de Omp2 à la surface de CE de *Chlamydiae* était controversée selon la souche utilisée. L'étude de Ting et collaborateurs a montré que Omp2 est exposée à la surface des CE de *C. caviae* GPIC (Ting et al., 1995). Ce phénomène a été confirmé également pour *C. trachomatis* sérovar L1 par l'utilisation d'anticorps monoclonaux contre la protéine Omp2 (Stephens et al., 2001). De plus, Omp2 a été récemment décrite comme un facteur d'adhésion de *C. trachomatis* LGV aux cellules hôte, GAG (l'héparine) étant son récepteur à la surface

de la cellule hôte (Fadel and Eley, 2007). Cela a été confirmé également pour *C. pneumoniae*, *C. caviae* et *C. trachomatis* sérovar L1 (Moelleken and Hegemann, 2008). Par contre, en immuno-microscopie électronique Omp2 chez *C. trachomatis* sérovar L2 a été localisée à la surface interne de la membrane externe des CE (Mygind et al., 1998a). Ce résultat a été aussi décrit pour *C. trachomatis* sérovar E (Moelleken and Hegemann, 2008). La présence ou non d'un site de liaison au GAG dans la séquence du gène *omp2* pourrait expliquer la différence d'exposition de la protéine Omp2 à la surface des CE entre les différents sérovars de *C. trachomatis* (Moelleken and Hegemann, 2008).

Omp2 est un antigène cible de la réponse immunitaire des lymphocytes T dans l'infection par *C. trachomatis* (Goodall, 2001). Bien que l'immunisation intramusculaire avec un plasmide contenant le gène *omp2* de *C. pneumoniae* dans un modèle murin ait induit une forte réponse en anticorps, les souris n'ont pas été protégées contre l'infection par *C. pneumoniae* (Penttila et al., 2000). L'analyse sérologique de Omp2 a montré qu'il s'agit d'une protéine immunogène majeure commune aux différentes espèces de *Chlamydiae* en particulier *C. trachomatis* et *C. pneumoniae* (Bas et al., 2001; Mygind et al., 1998b; Portig et al., 2003). Cependant, une étude récente a montré que la région C- terminale de Omp2 contenait deux épitopes spécifiques de *C. trachomatis*. L'expression de ces épitopes au moyen d'une protéine recombinante pourrait donner un antigène spécifique de *C. trachomatis* (Frikha-Gargouri et al., 2008).

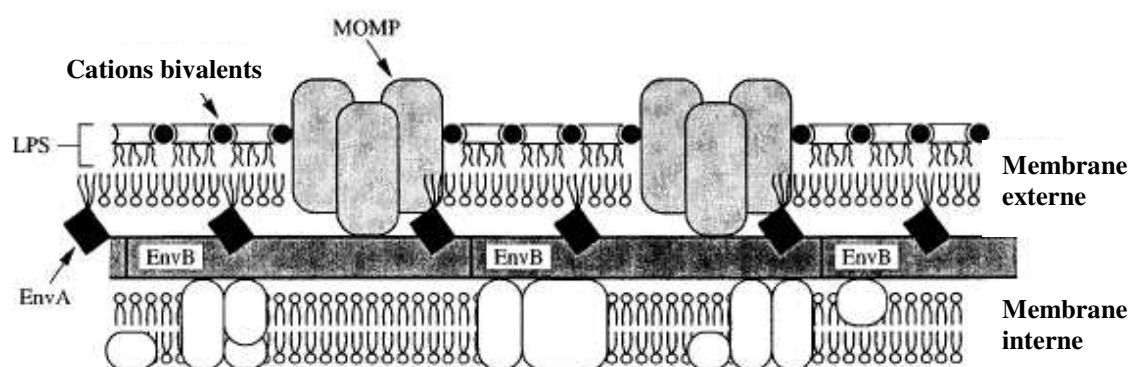


Figure 5 : Modèle schématique de l'enveloppe des CE de *C. psittaci* 6BC (Everett and Hatch, 1995).

2.3. Les protéines polymorphiques de la membrane externe POMP (polymorphic membrane proteins Pmp)

Le séquençage du génome de différentes espèces de *Chlamydiae* a permis d'identifier, pour chaque espèce, le nombre de gènes de la famille Pmp ayant une taille approximative de 90-100 kDa. Neuf gènes répartis en 2 clusters ont été identifiés pour *C. trachomatis* (pmpA à pmpI) (Stephens et al., 1998), 21 gènes pour *C. pneumoniae* (pmp1 à pmp21) (Kalman et al., 1999), 17 gènes pour *C. caviae* (Read et al., 2003) et 18 gènes répartis en 4 clusters pour *C. abortus* (Thomson et al., 2005).

Toutes les Pmps contiennent des séquences répétées de GGAI et FXXN en N-terminale de la protéine (Grimwood and Stephens, 1999). Au moins 6 protéines de la famille Pmps (90-98 kDa), ont été identifiées dans la membrane externe de *C. abortus* (Longbottom et al., 1998; Longbottom et al., 1996; Souriau et al., 1994). Une étude utilisant la technique de la détection des ARN messagers (RT-PCR), a montré que toutes les protéines de la famille des Pmps de *C. pneumoniae* sont exprimées au cours de l'infection, dont 11 protéines sont détectées par Western blot à partir des CE purifiés (Grimwood et al., 2001). De plus, 3 protéines de *C. trachomatis* (PmpE, G et H) sont détectées dans le complexe de la membrane externe des CE (Tanzer and Hatch, 2001).

Trois antigènes de la famille des Pmps (pmp8, 20 et 21) ont été reconnus par les cellules T CD4+ pendant l'infection des souris par *C. pneumoniae* (Mygind et al., 2004; Niessner et al., 2003). De plus, Les anticorps dirigés contre la PmpD de *C. trachomatis* ou contre la Pmp21 de *C. pneumoniae* ont réduit significativement l'infection suggérant que ces protéines pourraient avoir un rôle dans l'adhésion (Crane et al., 2006; Wehrl et al., 2004). Des analyses fonctionnelles de la famille des Pmps de *C. pneumoniae* ont montré que la Pmp10 qui est une protéine immunogène majeure de la famille des Pmps de *C. pneumoniae* (Pedersen et al., 2001), pourrait protéger la région C-terminale de la MOMP dans la membrane externe contre le clivage protéolytique (Juul et al., 2007). Une étude récente a montré un polymorphisme important des 9 gènes de la famille des Pmps entre les différents sérovars de *C. trachomatis* (Gomes et al., 2006). De plus, des profils d'expression différents ont été montrés pour les gènes de la famille des Pmps en utilisant différentes souches de *C. trachomatis* (Nunes et al., 2007). Cette étude suggère des rôles différents pour les protéines de la famille des Pmps au cours de l'infection de *Chlamydiae*. Ces rôles peuvent varier également en fonction des différentes espèces de *Chlamydiae*.

Certains gènes de la famille Pmp ont le domaine du site de clivage du signal peptide suggérant que ces protéines peuvent dépasser la membrane externe de *Chlamydiae*. Elles présentent aussi une homologie importante avec les protéines auto-transporteurs ou le système de sécrétion de type V (Henderson and Lam, 2001). Ce phénomène (auto-transportation) a été confirmé pour la protéine PmpD de *C. trachomatis* (Kiselev et al., 2007; Wehrl et al., 2004). De plus, une étude récente a permis d'identifier deux protéines (Pls1 et Pls2) à la surface de l'inclusion de *C. trachomatis*. Les gènes codant pour ces protéines avaient une similarité importante avec les gènes de la famille de Pmps (Pmp- like proteins) (Jorgensen and Valdivia, 2008).

2.5. La Porine (PorB)

La porine est une protéine de 38 kDa (PorB) qui fait partie de la membrane externe de *C. trachomatis*, a été identifiée par l'analyse de la séquence génomique de *C. trachomatis* (Kubo and Stephens, 2000). PorB est la deuxième protéine qui fonctionne comme une porine après identification de la MOMP, impliquée dans la diffusion des polysaccharides et des acides aminés. Elle est moins efficace dans ce processus de diffusion et moins abondante sur la surface externe de CE que la MOMP (Kubo and Stephens, 2001). Cependant, au cours de l'infection aiguë et chronique de *C. pneumoniae*, le profil d'expression de PorB était similaire à celui de la MOMP (Hogan et al., 2003).

Des anticorps polyclonaux dirigés contre PorB ont neutralisé l'infectivité de *C. trachomatis in vitro*. PorB présente 4 domaines antigéniques exposés à la surface des CE. Les anticorps anti-peptides spécifiques de PorB ont neutralisé l'infection de *C. pneumoniae* et *C. trachomatis* (Kawa and Stephens, 2002). Récemment, une test de vaccination sur souris a démontré que l'utilisation des protéines recombinantes de la MOMP et de PorB dans un seul plasmide a protégé significativement les animaux contre *C. trachomatis* sérovar D (Ifere et al., 2007). Cela peut renforcer l'idée qu'il existerait un antigène majeur tel que la MOMP qui serait commun aux différents sérovars de *C. trachomatis* (contrairement à la MOMP) et pourrait être utilisé comme vaccin contre l'infection par *C. trachomatis*.

2.6. La Mip (macrophage infectivity potentiator)

C'est une protéine de 27 kDa qui a été identifiée chez les CE et les CR de *C. trachomatis* par Lundemose et ses collègues en 1991. Le gène qui code cette protéine présente une similarité importante avec le gène *mip* de *Legionella pneumophila*. La protéine Mip, chez *Legionella*, est exposée à la surface de la bactérie et est responsable de l'initiation de l'infection.

Un anticorps monoclonal dirigé contre la Mip a inhibé 91% de l'infectivité de *C. trachomatis* *in vitro* (Lundemose et al., 1991; Lundemose et al., 1992). L'exposition de la Mip à la surface des CE de *C. trachomatis* a été récemment confirmée (Neff et al., 2007). En outre, la présence du signal peptidase II dans la séquence du gène *mip* a permis à la protéine Mip de se lier à l'acide gras palmitique (Lundemose et al., 1993b). Le prétraitement des CE de *C. trachomatis* avec FK506 ou la rapamycine, qui se lient sur le site peptidyl-prolyl cis/trans isomerase de la Mip, réduit l'attachement des *Chlamydiae* aux cellules hôtes (Lundemose et al., 1993a). De plus, la Mip de *C. trachomatis* a induit la plus forte production de cytokines pro-inflammatoires parmi plusieurs antigènes testés, y compris Omp2 et le LPS, lors de la stimulation des macrophages humains (Bas et al., 2008). Ces études suggèrent que la Mip de *Chlamydiae* est une lipoprotéine exposée à la surface des CE qui pourrait jouer un rôle dans l'attachement des CE aux cellules hôtes.

2.4. Les protéines de choc thermique

2.4.1 La Hsp 60 (GroEL)

Hsp 60 est une protéine chaperonne qui a été identifiée tout d'abord comme un des marqueurs de l'infection par *Chlamydiae* (Bavoil et al., 1990). Elle est également associée avec la sévérité des infections génitales chroniques de *C. trachomatis* (LaVerda et al., 1999; Toye et al., 1993). Une expression élevée de Hsp 60 de *Chlamydiae* a été produite en utilisant un milieu déficient en fer suggérant un rôle dans l'état de persistance des *Chlamydiae* (Raulston, 1997). La réponse élevée en anticorps dirigés contre Hsp 60 suggère que la protéine est facilement accessible au système immunitaire de l'hôte (Bavoil et al., 1990). Une étude récente a confirmé que Hsp 60 est localisée à la surface de CE de *C. pneumoniae* (Wuppermann et al., 2008). De plus, le prétraitement des cellules HEp-2 avec une Hsp 60 recombinante (rHsp 60) a réduit significativement l'infection par *C. pneumoniae* (Wuppermann et al., 2008).

La protéine rHsp 60 de *C. pneumoniae* a pu stimuler les cellules immunitaires innées *in vitro* par l'intermédiaire des récepteurs TLR2 et TLR4 (Toll-like receptor) et elle pourrait avoir un rôle dans la réponse pro-inflammatoire au cours de l'infection par *Chlamydiae* (Costa et al., 2002). L'immunisation des cobayes avec la protéine rHsp 60 a réduit les signes cliniques induites par l'infection par *C. caviae* (Rank et al., 1995). En revanche, l'immunisation des souris avec un plasmide contenant le gène *hsp 60* n'a pas protégé les souris contre

l'avortement par *C. abortus* (Hechard et al., 2004) soulignant les différences de réponses immunitaires entre les différentes espèces de *Chlamydiae* ou de *Chlamydophila*.

2.4.2. Hsp 10 (GroES)

Il n'y a pas beaucoup d'informations concernant Hsp 10 chez les *Chlamydiae*. Un titre élevé en anticorps spécifiques de Hsp 10 de *C. trachomatis* a néanmoins été associé avec la sévérité et la chronicité de la maladie génitale humaine (Betsou et al., 1999; LaVerda et al., 2000), mais il n'y a pas de lien avec l'arthrite aiguë due à *C. trachomatis* (Larsen et al., 1994). Ces études suggèrent que cette protéine est un marqueur potentiel de l'infection génitale chronique due à *C. trachomatis*.

2.4.3. Hsp 70 (DnaK)

La protéine DnaK est une protéine chaperonne immunogène (Larsen et al., 1994). La protéine DnaK est associée au complexe protéique de la membrane externe des CE de *C. trachomatis* mais elle n'est pas exposée à la surface des CE (Raulston et al., 2002). Elle se compose de deux domaines : un domaine localisé en N-terminal qui constitue la partie antigénique de la protéine, et qui est conservée et adhère à l'ATP et un autre domaine localisé en C-terminal qui est variable et adhère aux peptides (Birkelund et al., 1996). Les anticorps dirigés contre Hsp 70 de *Chlamydiae* peuvent neutraliser l'infectivité des CE *in vitro* (Danilition et al., 1990). Cependant, l'immunisation des souris avec le vaccin ADN contenant le gène de *dnaK* n'a pas protégé les souris contre l'infection par *C. abortus* (Hechard et al., 2003b).

2.4.4. HtrA (heat shock- induced serine protease)

Une analyse fonctionnelle de la protéine HtrA de *C. trachomatis* a été réalisée pour la première fois par Huston et collaborateurs en 2007. Sa séquence est homologue avec la protéine HtrA de *E. coli* qui est une protéine de choc thermique et une protéase à sérine. Une étude récente a démontré que la protéine HtrA de *C. trachomatis* est une chaperonne et fonctionne comme une protéase à une température de 37°C (Huston et al., 2008). L'expression de HtrA de *C. trachomatis* a augmentée lors de l'exposition des cellules infectées à une température élevée ou à la pénicilline suggérant que HtrA pourrait être impliquée dans la réponse au stress des *Chlamydiae* (Huston et al., 2008).

2.5. Les protéines de la membrane d'inclusion

Pour survivre dans les cellules eucaryotes, *Chlamydiae* doit se confronter aux mécanismes de défense de la cellule hôte et acquérir des métabolites nécessaires pour sa croissance bactérienne. Mais la réplication des *Chlamydiae* a lieu entièrement dans une vacuole intracellulaire (inclusion), dont la membrane constitue une barrière séparant les *Chlamydiae* du cytoplasme cellulaire riche en aliments (Bavoil et al., 2000). La membrane d'inclusion joue sûrement un rôle important dans les interactions entre les *Chlamydiae* et la cellule hôte. La modification de la membrane d'inclusion exige la synthèse par les *Chlamydiae* de protéines de la membrane d'inclusion, les protéines Inc (**Figure 6**) qui sont impliquées dans les interactions entre l'inclusion et les composants cytoplasmiques (Scidmore et al., 1996).

La première protéine Inc, nommée IncA chez *C. caviae*, a été identifiée en comparant la réponse sérologique des animaux infectés par des *Chlamydiae* vivantes et celle des animaux immunisés par des *Chlamydiae* tuées (Rockey and Rosquist, 1994). Puis, d'autres protéines d'inclusion ont été identifiées par cette technique comme IncB et IncC de *C. caviae* (Bannantine et al., 1998a).

La plupart des protéines Inc réagissent seulement avec des sérums d'animaux infectés par les *Chlamydiae*. Elles se trouvent dans la membrane d'inclusion et ont un domaine hydrophobe unique qui est localisé approximativement entre les acides aminés 50-80 de la protéine (**Figure 7**) (Scidmore et al., 1996). Cependant, IncA de *C. psittaci* a été également détectée sur les *Chlamydiae* (Beeckman et al., 2008). Il y a des protéines n'ayant pas de domaine hydrophobe qui ont été trouvées à la surface de l'inclusion et également, des protéines qui ont un domaine hydrophobe mais qui ne sont pas détectées à la surface de l'inclusion (Rockey et al., 2002). Au moins, 50 protéines d'inclusion putatives ont été identifiées chez *C. trachomatis* dont 22 ont été trouvées à la surface de la membrane d'inclusion (Li et al., 2008). Plus de 6 protéines ont été détectées à la surface de l'inclusion pour *C. pneumoniae* (Flores et al., 2007; Luo et al., 2007a; Luo et al., 2007b; Luo et al., 2007c), et récemment, une protéine d'inclusion a été détectée pour *C. abortus* (Vretou et al., 2008).

Une protéine de 28 kDa qui est codée par l'ORF 3 du plasmide de *C. psittaci* (Pgp3), a été trouvée également à la surface de l'inclusion (Comanducci et al., 1994). Elle est très immunogène contre des sérums humains infectés par *C. trachomatis* et des sérums aviaires infectés par *C. psittaci* (Storni et al., 2006). De plus, une étude récente a montré qu'une protéine Pg3 recombinante de *C. psittaci* est bien immunogène pour les sérums aviaires, humains, félins et porcins infectés par *C. psittaci*, *C. trachomatis*, *C. felis* et *C. suis*

respectivement (Donati et al., 2009). Cette étude suggère que Pgp3 peut être utilisée comme un marqueur de l'infection humaine et animale par *Chlamydiae*. L'immunisation des souris avec la protéine Pgp3 recombinante a inhibé la transmission de l'infection par *C. trachomatis* de la partie inférieure à la partie supérieure du tractus génital (Donati et al., 2003).

L'analyse en RT-PCR a montré que les gènes *incD*, *incE*, *F* et *G* de *C. trachomatis* sont transcrits 2 h après l'infection de la cellule hôte par *Chlamydiae* (Scidmore-Carlson et al., 1999). La micro-injection de IncA de *C. trachomatis* a montré qu'elle participe à la fusion des inclusions (Hackstadt et al., 1999). De plus, les inclusions des souches de *C. trachomatis* qui ont une protéine IncA mutante ne fusionnent pas (Suchland et al., 2000). Rockey et ses collègues ont trouvé que la structure de IncA de *C. caviae* est modifiée dans le cytoplasme de la cellule infectée par phosphorylation par des enzymes de la cellule hôte. IncA est une protéine phosphorylée par des acides aminés comme la sérine et la thréonine (Rockey et al., 1997). IncG de *C. trachomatis* a réagit spécifiquement avec les protéines 14-3-3 β des cellules hôtes (Scidmore and Hackstadt, 2001). Ce sont des protéines qui ont la capacité de se lier aux autres protéines de fonctions diverses, y compris des kinases, des phosphatases et des récepteurs transmembranaires. De plus, certaines protéines d'inclusion de *C. trachomatis* ou de *C. pneumoniae* ont réagissent avec l'enzyme Rab GTPases de la cellule hôte suggérant que ces protéines peuvent être impliquées dans le recrutement de Rab GTPases dans l'inclusion (Cortes et al., 2007; Rzomp et al., 2006). Sachant que la Rab GTPase est une protéine de la grande famille des enzymes impliquées dans la génération, le transport, et la fusion des vésicules et le recrutement spécifique des molécules effectrices au vésicule, le recrutement de telles enzymes à la surface de l'inclusion au cours de l'infection par les *Chlamydiae* pourrait être une indication sur les échanges entre les *Chlamydiae* et la cellule hôte.

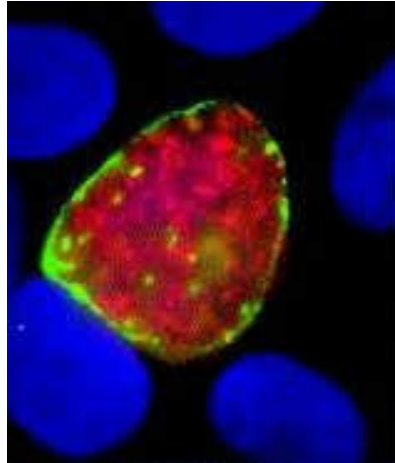


Figure 6 : La protéine IncA de *Chlamydiae*

Cellule Hela infectée par *C. trachomatis* sérovar L2 et fixée par le méthanol 30h après l'infection. Le noyau est coloré en bleu par le 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). La protéine IncA colorée en vert est trouvée à la surface de la membrane de l'inclusion. La protéine Hsp60 colorée en rouge est trouvée dans l'inclusion (Rockey et al., 2002).

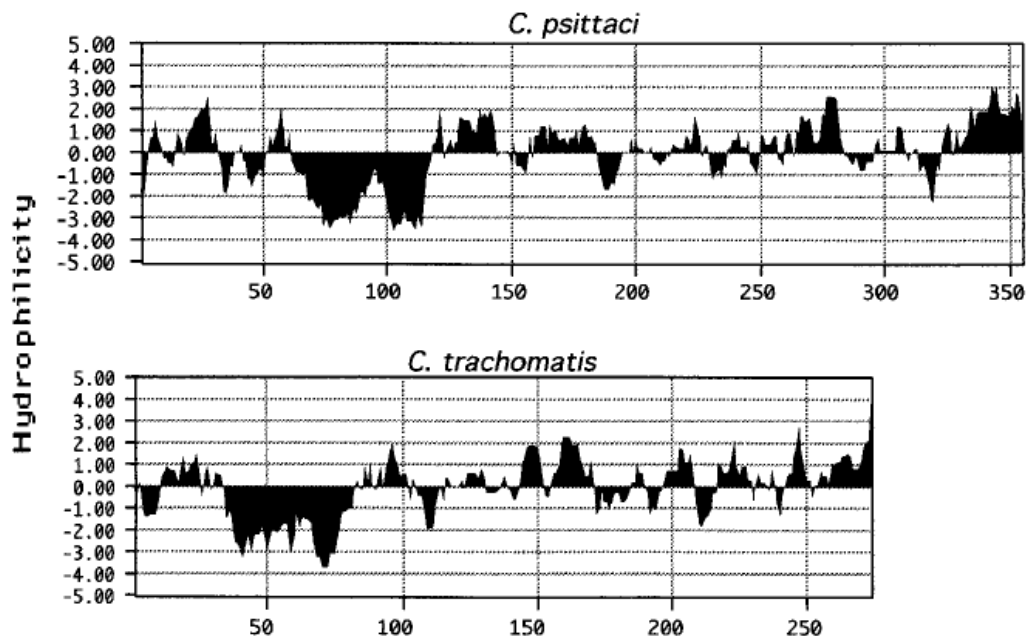


Figure 7 : La domaine hydrophobe de la protéine IncA

Comparaison des deux protéines IncA de *C. psittaci* et de *C. trachomatis* par analyse de l'hydrophobicité en utilisant l'algorithme développé par Kyte et Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982). L'image montre qu'il y a un unique domaine hydrophobe bilobé dans la région N-terminal des deux protéines. L'axe vertical montre l'hydrophobicité, les points négatifs indiquant l'hydrophobicité (Bannantine et al., 1998a).

3. Le système de sécrétion de type III (T3S) et les projections de surface

Depuis les années 80, Matsumoto a décrit des projections à la surface de CR qui sont en contact avec la membrane d'inclusion (Matsumoto, 1981). Ces projections pourraient être des canaux du système de sécrétion de type III (T3S) des *Chlamydiae* (Bavoil and Hsia, 1998). T3S, qui facilite la translocation directe des facteurs de virulence des bactéries dans le cytoplasme de la cellule eucaryote, a été déjà bien décrit pour différentes bactéries pathogènes des animaux comme; *Yersinia*, *salmonelle*, *Shigella*, *Escherichia coli* et ainsi que pour des bactéries qui infectent les plantes (Hueck, 1998). Le séquençage du génome total des différentes espèces de *Chlamydiae* a révélé l'importance de T3S en montrant des similarités importantes entre certains gènes de *Chlamydiae* et les gènes de T3S d'autres bactéries Gram négatives comme *Yersinia* (Peters et al., 2007). Les protéines de T3S franchissent probablement la membrane interne et externe des *Chlamydiae*, la membrane cytoplasmique de la cellule hôte pendant l'attachement ou la membrane de l'inclusion pendant la réplication intracellulaire pour assurer la survie et la croissance des *Chlamydiae* dans la cellule hôte (Figure 8).

La machinerie de T3S de *Chlamydiae*, y compris toutes les familles de l'ordre *Chlamydiales*, se compose approximativement de 25 protéines codées par au moins trois clusters de gènes différents. Tandis que les gènes qui codent les protéines putatives de translocation et les protéines flagellaires, ont des positions variables sur le génome selon les différentes espèces de la famille *Chlamydiaceae*. Ces gènes ne sont pas trouvés pour la famille *Parachlamydiaceae*. De plus, les protéine qui se trouvent à la surface de la membrane de l'inclusion peuvent être également considérées comme des facteurs potentiels de la machinerie du T3S (Subtil et al., 2001).

Récemment, plus de 20 protéines de T3S de *C. trachomatis* et *C. pneumoniae* ont été détectés dans le cytoplasme de la cellule infectée (Kleba and Stephens, 2008). De plus, la fonction possible de 26 gènes de T3S de *C. psittaci* a été identifiée par détection de l'ARN messager (RT-PCR) de ces gènes au cours de l'infection (Beeckman et al., 2008). Ces études suggèrent que la machinerie de T3S pourrait être fonctionnelle pour les différentes espèces de *Chlamydiae*.

CopN (chlamydial outer protein) est une des premières protéines de T3S identifiées, également connue comme lcrE, elle est l'homologue de la protéine sécrétée de *Yersinia* YopN. Cette protéine est présente sur les CE, les CR, à la surface de la membrane de

l'inclusion et dans le cytoplasme de la cellule hôte. Les messagers du gène qui encode CopN de *C. trachomatis* sont détectés significativement 12-20 h après l'infection (Fields and Hackstadt, 2000). L'immunisation de souris ou de hamsters avec une protéine CopN recombinante a protégé les animaux contre l'infection par *C. pneumoniae* (Sambri et al., 2004; Tammiruusu et al., 2007). De plus, une étude récente a démontré que CopN est indispensable à la croissance intracellulaire de *C. pneumoniae* et joue un rôle essentiel dans sa virulence (Huang et al., 2008).

Selon un modèle biomathématique qui a été récemment développé, la longueur des canaux de T3S joue un rôle majeur dans la différenciation des CR en CE au cours du cycle de développement de *Chlamydiae* et par conséquent pour orienter les CR vers une croissance normale ou persistante (Hoare et al., 2008). De plus, la diminution de l'expression de plusieurs cytokines au cours de l'infection par *Chlamydiae* dépend de l'expression de certains gènes de T3S (Prantner and Nagarajan, 2009).

La population de protéines de T3S dans la cellule hôte change au cours de l'infection, suggérant que ces protéines jouent différents rôles selon les étapes du cycle de développement des *Chlamydiae* (Kleba and Stephens, 2008). En comparant les séquences des gènes du T3S de différentes espèces de *Chlamydiae*, des différences génétiques ont été mises en évidence afin d'expliquer les différences de pathologies ou de virulences observées entre les différentes espèces de *Chlamydiae* (Peters et al., 2007).

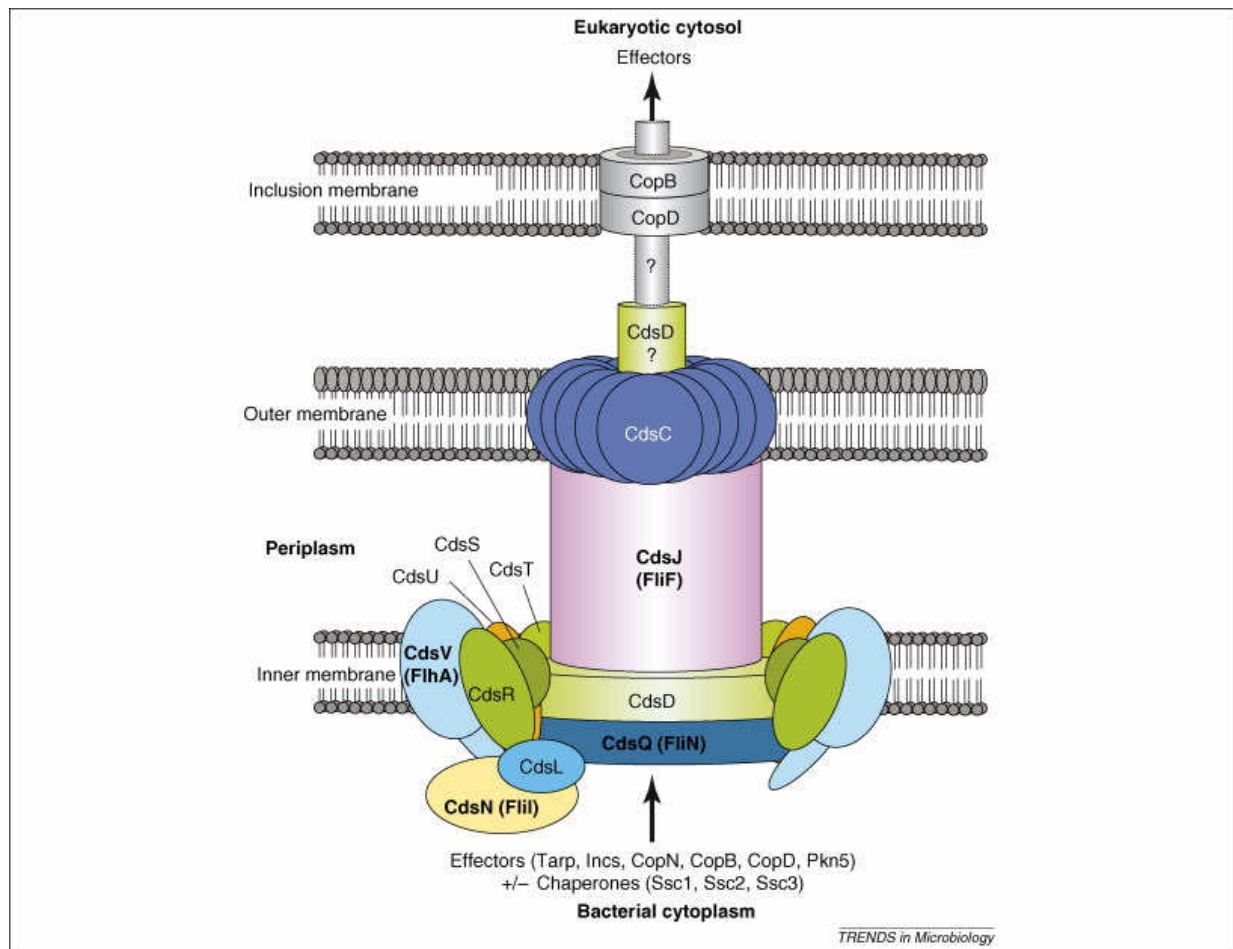


Figure 8 : Structure putative de la « machinerie » de T3S de *Chlamydiae* dérivée de T3S de *Yersinia* et de *Salmonella* (Peters et al., 2007).

Chapitre 4 : Les infections à *Chlamydiae*

1. Les manifestations cliniques

1.1. *Chlamydia trachomatis*

C. trachomatis est la cause principale de cécité dans le monde. De plus, *C. trachomatis* est considéré comme la bactérie la plus commune des maladies sexuellement transmise (MST). En utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre différents domaines variables de la MOMP, les souches de *C. trachomatis* ont été classées en 19 sérovars : A, B, Ba, C (principalement isolées des infections du trachome), D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J, Ja, K (infections urogénitales) et L1, L2, La et L3 causant la lymphogranulomatose vénérienne (LGV). Parmi des infections urogénitales, les sérovars D-F sont les plus fréquemment trouvés dans le monde (Pannekoek et al., 2008).

Le trachome commence par une kératoconjonctivite mucopurulente pouvant entraîner une cécité plus au moins tardive. L'infection touche au départ la paupière puis elle évolue en l'absence de traitement vers des lésions cornéennes irréversibles en formant des tissus cicatriciels qui entraînent des déformations des paupières qui peuvent aboutir à la cécité. La LGV est une thrombopolymphangite et une perilymphangite avec extension de l'inflammation au ganglion infecté et aux tissus adjacents. Elle est observée chez les deux sexes mais avec une forte prédominance masculine. Sa persistance conduit à des lésions destructrices tardives conséquences de la lymphadénite (Siboulet et al., 1985).

Beaucoup d'infections urogénitales par *C. trachomatis* passent inaperçues constituant une menace constante de transmission de cette bactérie pathogène. Une transmission verticale lors de l'accouchement peut donner des conjonctivites et/ou des infections des poumons et des organes génitaux des nouveau-nés (Schachter and Caldwell, 1980). Les infections à *C. trachomatis* qui ne sont pas traitées, peuvent mener à l'infertilité chez les femmes. Chez l'homme, les infections se traduisent le plus souvent par une urétrite, pouvant évoluer dans les cas les plus graves vers une épididymite.

1.2. *Chlamydia muridarum*

C. muridarum est responsable de pneumonie chez les souris et les hamsters et était considéré auparavant comme un biovar murin de *C. trachomatis*. Les infections du poumon ou du tractus génital des souris par *C. muridarum* constituent des modèles pour l'infection humaine par *C. trachomatis*. Cependant, bien que de tels modèles soient particulièrement utiles pour

l'étude des paramètres spécifiques de la réponse immunitaire, la pathogénie des deux infections ne présente que peu de similitudes (Read et al., 2003).

1.3. *Chlamydia suis*

Les souches de *C. suis* sont associées à des pneumonies, des conjonctivites, des polyarthrites, des entérites et des désordres de la reproduction chez les porcs (Sachse et al., 2004). Cependant, elles sont fréquemment trouvées dans les intestins des porcs sains (Kauffold et al., 2006). Des souches résistantes à la sulfadiazine et/ou au tétracycline ont été isolées des conjonctivites de porc (Rogers and Andersen, 1999). De plus, *C. suis* a été récemment détectée dans quelques échantillons prélevés sur la conjonctive des moutons avec et sans conjonctivite suggérant que *C. suis* n'est pas limité à l'espèce porcine (Polkinghorne et al., 2009).

1.4. *Chlamydophila psittaci*

Toutes les souches de *C. psittaci* sont actuellement regroupées en 7 génotypes aviaires (A, B, C, D, E, F et E/B) et 2 génotypes non- aviaires (M56 et WC) d'après la RFLP du gène *ompA*. Les souches des génotypes A et B sont normalement associées à la psittacose de psittacidés et de pigeons respectivement. Le génotype C a été principalement isolé de canards et d'oies, tandis que le génotype D a été principalement trouvé chez les dindes. Le génotype F a été isolé de psittacidés et de dindes. Les souches du génotype E sont les plus diverses; 20% des souches ont été isolées de pigeons. De plus, des souches du génotype E ont été isolées de cas mortels de ratites (ex : autruches, émeus), de manifestations respiratoires des canards et des dindes et de temps en temps de cas humains. Les souches du génotype E/B ont été isolées principalement de canards. Les génotypes WC et M56 ont été isolés d'une vache et d'un rat respectivement (Beeckman and Vanrompay, 2009).

Les souches de *C. psittaci* infectent au moins 465 espèces d'oiseaux qui appartiennent à plus de 30 ordres aviaires (Kaleta and Taday, 2003). Les symptômes de l'infection varient en fonction des souches et de l'espèce d'oiseau. Les signes cliniques typiques de l'infection par les souches virulentes de *C. psittaci* sont "pneumo-entériques" : diarrhée accompagnée d'une perte de poids, de troubles respiratoires, de décharges nasales, d'une polyurie et d'un abattement. Chez les dindes, les souches du sérovar D induisent la maladie la plus grave, entraînant une conjonctivite, une rhinite, une pneumonie, une péricardite, une entérite et une diminution de la production d'œufs (Vanrompay et al., 1995). En revanche, les canards et les pigeons sauvages sont souvent des porteurs asymptomatiques de *C. psittaci* (Magnino et al.,

2009). Les souches de *C. psittaci* peuvent infecter d'autres mammifères, tels que le chien, le cheval et le porc (Kauffold et al., 2006; Sprague et al., 2008; Theegarten et al., 2008). La psittacose présente un risque majeur pour la santé humaine (**voir Annexe 2**). Les personnes qui sont fréquemment en contact avec des oiseaux domestiques ou de compagnie, sont les plus exposées à l'infection. Les symptômes chez l'homme sont variables et non spécifiques. Ils ressemblent à la grippe avec de la fièvre, des maux de tête, des myalgies et des diarrhées. Mais des signes plus sévères sont également rapportés comme une pneumonie, une endocardite ou une encéphalite. Parfois, la maladie peut être mortelle (Petrovay and Balla, 2008).

1.5. *Chlamydophila abortus*

C. abortus, responsable de la chlamydiose abortive également désignée en anglais OEA (ovine enzootic abortion), constitue l'une des causes majeures d'avortements chez les ovins et les caprins. Les souches de *C. abortus* sont responsables également de nombreuses infections locales telle que des conjonctivites, des arthrites, des entérites, des pneumonies, des orchites et des épидидymites. Elles peuvent également infecter les bovins, les porcins et les équins (Nietfeld, 2001; Rodolakis et al., 1998). Les avortements se produisent en fin de gestation, sans signe clinique précurseur. Des mises bas prématurées ou à terme de produits chétifs qui meurent ou s'élèvent mal ont également lieu. Par ailleurs, l'infection par *C. abortus* confère aux animaux une immunité suffisante pour éviter de nouveaux avortements (Rodolakis et al., 1998). Chez les femelles non gestantes, l'infection se développe généralement vers une forme asymptomatique qui peut induire l'avortement pendant la gestation suivante (Waldhalm et al., 1971). Les foetus peuvent être infectés dans l'utérus (Rodolakis and Bernard, 1977). L'infection des mâles par le contact avec les femelles infectées, peut atteindre les vésicules séminales entraînant l'épididymite.

C. abortus présente un risque zoonotique en particulier pour les femmes enceintes (**voir Annexe 2**). Plusieurs cas d'avortement humain par *C. abortus* ont été rapportés dans des différents pays dans le monde (Pospischil et al., 2002).

1.6. *Chlamydophila pneumoniae*

C. pneumoniae est un pathogène humain retrouvé à travers le monde qui infecte principalement les voies respiratoires supérieures particulièrement chez les enfants (Hammerschlag, 2000). Elle est également associée aux maladies coronariennes chroniques telles que l'athérosclérose menant à l'infarctus du myocarde, ainsi qu'à l'anévrisme aortique

abdominal (Blanchard et al., 2000). Des études séro-épidémiologiques montrent que plus de 60% des adultes sont porteurs ou ont été exposés à cette bactérie durant leur vie et ce, tôt dans l'enfance. *C. pneumoniae* est la plus fréquente, après *Streptococcus pneumoniae* et *Mycoplasma pneumoniae*. Elle est considérée comme la 3^{ème} cause de broncho-pneumopathie bactérienne chez les enfants de plus de 5 ans (Kuo et al., 1995). Cette bactérie pourrait également être impliquée dans des maladies neuro- dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Guillain-Barré et certaines formes de méningo-encéphalites (Korman et al., 1997). Le séquençage du gène *ompA* a permis de classer les souches humaines de *C. pneumoniae* isolées des athéroscléroses en 3 génotypes (A, B et C) (Cochrane et al., 2005).

Des souches de *C. pneumoniae* ont été également isolée chez le cheval (Storey et al., 1993), le koala (Jackson et al., 1999), les amphibiens australiens et africains (Berger et al., 1999), les serpents, les iguanes, les caméléons (Bodetti et al., 2002) et les bandicoots (Kutlin et al., 2007). Malgré la grande homologie génétique (94-100%) trouvée entre les souches isolées de Koala et les souches humaines, des différences au niveau de la culture cellulaire, de la morphologie des CE et de l'inclusion ont été démontrées entre une souche isolée de koala et une souche humaine (Kutlin et al., 2007; Mitchell et al., 2009a).

1.7. *Chlamydophila caviae*

C. caviae cause des infections oculaires chez le cobaye (Guinea pig inclusion conjunctivitis GPIC). Malgré la différence phylogénétique existant entre *C. trachomatis* et *C. caviae*, cette dernière pourrait fournir un bon modèle pour l'étude de l'infection et de la pathogénie de *C. trachomatis* chez l'homme. Ceci repose sur la similitude des mécanismes de transmission (ex. sexuelle) et d'évolution vers une chronicité de la maladie (ex. la formation de pannus et de salpingite tubaire pendant les infections oculaires et génitales respectivement) (Rank and Sanders, 1992; Read et al., 2003).

1.8. *Chlamydophila felis*

C. felis est l'agent responsable de la Chlamydiose féline, caractérisée par une conjonctivite aiguë ou chronique et une pneumonie chez les chats (Sykes, 2005). *C. felis* est considéré comme l'agent le plus commun de la conjonctivite féline dans le monde : 11 à 16% des chats domestiques en Europe, 5% aux USA et plus de 25% au Japon, sont infectés par *C. felis* d'après des résultats de PCR ou de sérodiagnostic (Ohya et al., 2008). Des avortements

spontanés ont été également observés chez des chattes atteintes d'infections cliniques ou chroniques par *C. felis* (Rodolakis, 1993).

1.9. *Chlamydophila pecorum*

La majorité des ruminants sains héberge *C. pecorum* dans leurs intestins cependant, cette bactérie peut induire différents signes cliniques, tels qu'une pneumonie, une arthrite, une conjonctivite, une entérite ou des infections urogénitales chez les bovins, les petits ruminants, les porcs et les koalas (voir Annexe 1) (Tableau 4).

Tableau 4 : Signes cliniques induits par *C. pecorum* chez différentes espèces animales

Signes cliniques	Ovin et caprin	Bovin	Porcin	Koala
Encéphalomyélite	-	+	-	-
Pneumonie	+	+	+	+
Arthrite	+	+	+	-
Conjonctivite	+	+	+	+
Avortement	+	+/-	+	-
Métrite	-	+	+	+
Entérite	-	+	+	+
Infection urinaire	-	-	+	+

1.9.1. Chez les bovins

C. pecorum est probablement l'espèce de *Chlamydiae* prédominante dans l'intestin (Longbottom, 2004) et le tractus génital (Jee et al., 2004) des bovins sains. Plus de 67% des échantillons de cellules vaginales collectés chez des génisses ayant un titre anticorps anti-*Chlamydiae* élevé, sont positifs pour *C. pecorum* par PCR en temps réel (DeGraves et al., 2003). De plus, 51% des génisses sont infectées par *C. pecorum* pendant les 2 premiers mois après la naissance suggérant que ces infections génitales ne sont pas transmises par la voie vénérienne (Jee et al., 2004). En revanche, un faible pourcentage d'infections par *C. pecorum* a été détecté dans le sperme et les échantillons de lavage préputial (1-2/120) de taureaux sains (Kauffold et al., 2007). Des souches de *C. pecorum* sont également isolées de nombreuses maladies telles que l'encéphalomyélite sporadique, la polyarthrite, la pneumonie, l'entérite et l'endométrite (Doughri et al., 1974; Kaltenboeck et al., 2009; McNutt and Waller, 1940; Storz et al., 1966; Wilson and Thomson, 1968; Wittenbrink et al., 1993). Les infections dues aux

Chlamydiae y compris à *C. pecorum* pourraient réduire la fertilité des bovins (Kaltenboeck et al., 2005), mais une étude suédoise comparant la séroprévalence entre des cas cliniques et control a suggéré que les problèmes de reproduction ne sont pas liés aux infections dues aux *Chlamydiae* y compris à *C. pecorum* (Godin et al., 2008). Cependant, des infections intestinales des veaux par *C. pecorum* pourraient affecter à long terme la santé de ces animaux et provoquer des pertes économiques importante par exemple un perte de poids (Reinhold et al., 2008). De plus, des infections respiratoires dues à *C. pecorum* ou à *C. abortus* pourraient être associées à une inflammation chronique des poumons qui pourrait affecter à long terme leur fonction (Reinhold et al., 2007).

1.9.2. Chez les petits ruminants

Les souches de *C. pecorum* sont frequemment trouvées dans l'intestin des petits ruminants asymptomatiques. Chez les agneaux, elles colonisent l'intestin dès qu'ils commencent à paître (Clarkson and Philips, 1997). Cependant, comme chez les bovins, des souches de *C. pecorum* sont isolées de cas de conjonctivite, d'arthrite et d'orchite ovine (Rodolakis et al., 1989; Storz et al., 1968). La chlamydiose abortive des petits ruminants est généralement due à *C. abortus*, mais quelques souches de *C. pecorum* ont été isolées d'avortements ovins et caprins en particulier au Maroc et en Tunisie (Rekiki et al., 2004). Cependant, l'inoculation intradermique ou intraveineuse des brebis gestantes avec une souche isolée d'avortement ovin, induit beaucoup moins d'avortement que *C. abortus* (1/5 versus 5/5) (Rodolakis et Souriau, 1989). De plus, l'inoculation intrapéritonéale de souris gestantes avec des souches de *C. pecorum* isolées d'avortements ovins et caprins n'entraîne pas de mortalité fœtale malgré une infection plasentaire (Rekiki et al., 2004). Aucune souche de *C. pecorum* n'était invasive dans le modèle souris (Rodolakis et al., 1989), suggérant que la souris conventionnelle n'est pas un modèle approprié pour l'étude des infections à *C. pecorum*. Des cofacteurs tels que des carences nutritionnelles, une sensibilité particulière de certaines races ovines ou caprines, ou une infection parasitaire concomitante pourraient favoriser l'avortement des petits ruminants infectés par *C. pecorum*.

Cependant, l'inoculation par voie orale des brebis gestantes par des souches de *C. pecorum* isolées de fèces des brebis asymptomatiques seules ou en association avec *Fasciola hepatica* n'a pas entraîné l'invasion des tissus par *C. pecorum* (Philips and Clarkson, 1998). Ces études suggèrent que les souches intestinales de *C. pecorum* ne peuvent pas passer l'épithélium intestinal mais elles persistent dans l'intestin pendant longtemps.

1.9.3. Chez les porcs

Chez les porcs, l'infection par *C. pecorum* a été associée à des cas de pneumonie, de polyarthrite, de pleurite, de péricardite et d'avortement (Kaltenboeck et al., 1992; Kaltenboeck et al., 1993; Kaltenboeck and Storz, 1992). Les avortements à *Chlamysiae* des porcs sont le plus souvent dus à une infection mixte par *C. pecorum* et *C. suis* (Schiller et al., 1997).

C. pecorum est rarement mise en évidence dans le sperme ou les fécès des verrats. *C. suis* est l'espèce de *Chlamydiae* prédominante dans les fécès et *C. psittaci* a été trouvée souvent dans le sperme (Kauffold et al., 2006). De plus, contrairement aux bovins, des *Chlamydia*-like ont fréquemment été détectées dans les écouvillons vaginaux collectés sur des truies saines (Camenisch et al., 2004).

Donc, contrairement à ce qui est observé chez les ruminants *C. pecorum* est rarement présente chez les porcs asymptomatiques.

1.9.4. Chez les koalas

Chez les koalas, *C. pecorum* cause des conjonctivites et des infections urogénitales qui pourraient provoquer de l'infertilité chez les femelles (Cockram and Jackson, 1974; McColl et al., 1984). La prévalence de *C. pecorum* pourrait atteindre 85% chez les populations de koalas avec plus de 17% de cas cliniques (Jackson et al., 1999). Plus de 58% des jeunes koalas avaient un niveau élevé d'infection oculaire et urogénitale suggérant que la transmission de la mère vers le petit est une voie de transmission importante. De plus, *C. pecorum* a été trouvée plus pathogène que *C. pneumoniae* pour les koalas (Jackson et al., 1999).

1.9.5. Chez d'autres animaux

Une souche de *C. pecorum* a été isolée d'un cas de conjonctivite chez le bandicoot barré occidental en Australie (Warren et al., 2005). Trois échantillons fécaux collectés de pigeons sains au Japon ont été trouvés positifs par PCR pour *C. pecorum* (Tanaka et al., 2005). Récemment, une infection mixte par *C. pecorum* et *C. abortus* a été mise en évidence lors d'un avortement chez le buffle en Italie (Greco et al., 2008).

2. Le diagnostic de *Chlamydiae*

Il y a deux approches principales pour le diagnostic des infections à *Chlamydiae*. La première consiste à détecter directement l'agent dans d'échantillons de tissus ou des écouvillons, et la seconde consiste à détecter par sérologie des anticorps anti-*Chlamydiae*. Finalement, le test de diagnostic dépend du type d'échantillons qui sont soumis au laboratoire d'analyse (Sachse et al., 2009b). Cependant ces deux types de tests n'ont ni la même valeur ni le même but.

2.1. Le diagnostic direct

2.1.1. L'examen bactérioscopique

La première méthode rapide et facile à utiliser, qui permet de mettre en évidence les *Chlamydiae* sur des prélèvements (placenta, fœtus), est l'examen microscopique après coloration. Diverses colorations sont utilisées comme; la coloration de Giemsa, et de Stamp ou ses variantes, Machiavello, Ziehl-Neelsen (Silberman and Fiset, 1968). Cependant cette méthode est peu sensible et peu spécifique, elle nécessite une observation avisée pour éviter de confondre les *Chlamydiae* avec les *Brucella* ou plus encore les *Coxiella*.

2.1.2. L'isolement de la bactérie

L'isolement des bactéries reste le moyen le plus efficace pour étudier la bactérie, mais cela n'est pas pratiqué pour le diagnostic. Des précautions doivent être prises pour empêcher la perte d'infectivité pendant le stockage et le transport des échantillons cliniques au laboratoire de microbiologie et pour également limiter la contamination éventuelle avec d'autres bactéries qui peuvent interférer avec l'isolement des *Chlamydiae*. Des antibiotiques réduisent les risques de contamination comme la gentamicine et la streptomycine, tandis que la pénicilline, les tétracyclines et le chloramphénicol doivent être évités car ils empêchent la croissance de *Chlamydiae* (Sachse et al., 2009b).

Historiquement, la première méthode pour cultiver les *Chlamydiae* en dehors de l'hôte naturel, a été développée en 1935, quand Burnet et Rountree ont réussi à cultiver l'agent de la psittacose dans la membrane chorioallantoïdienne de l'œuf embryonné de poule (Burnet and Rountree, 1935). Plus tard en 1940, Rake et ses collègues ont découvert que l'agent de (LGV) pourrait se multiplier dans les cellules de la membrane vitelline des embryons de poulet (Rake et al., 1940). Puis, l'utilisation des œufs fécondés est devenue jusqu'à aujourd'hui, une des méthodes les plus utilisées dans les laboratoires de microbiologie pour cultiver toutes les espèces de *Chlamydiae*. Cependant cette technique est trop longue (5 à 12 jours) et trop

laborieuse pour être utilisée en routine pour l'isolement. L'isolement sur culture cellulaire est toujours préférable.

Plusieurs lignées de cellules ont été utilisées pour cultiver les *Chlamydiae*, mais le taux de multiplication varie selon la lignée de cellules et l'espèce de *Chlamydiae* cultivée. De nombreuses lignées de cellules ont été utilisées pour *C. trachomatis* comme les cellules : McCoy, BGIMK et HeLa 229. Pour *C. pneumoniae*, l'espèce la plus difficile à cultiver sur cellules, les lignées HL et HEp-2 sont les plus utilisées. Pour *C. psittaci*, *C. abortus* et *C. pecorino*, les cellules McCoy sont les plus utilisées (Cles and Stamm, 1990; Roblin et al., 1992; Rodolakis and Chancerelle, 1977; Stamm, 1990).

La pénétration des *Chlamydiae* dans les cellules en culture peut être augmentée par la centrifugation et/ou par le traitement chimique des cellules cultivées, avant ou pendant l'infection, en utilisant par exemple la cycloheximide et le diethylaminoethyl-dextran (Sachse et al., 2009b). Après l'incubation à 37°C pendant 2 ou 3 jours, les cellules infectées sur lamelle peuvent être fixées par l'acétone et colorées en utilisant soit une coloration chimique comme l'acridine orange (**Figure 9**) ou l'immunofluorescence indirecte (**Figure 10**) pour démontrer la présence des inclusions intra cytoplasmiques des *Chlamydiae*.

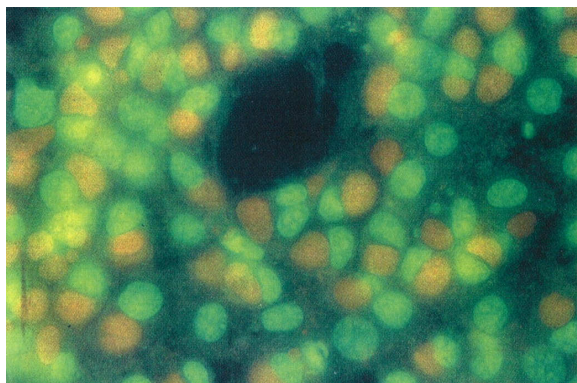


Figure 9 : Les inclusions des *Chlamydiae* colorées par l'acridine orange

Cellules McCoy infectées par *C. abortus* AB14 (isolée de l'avortement ovine en France), colorées 36 h après l'infection en utilisant l'acridine orange. Les inclusions contenant des CR riches en ARN sont colorées en orange et l'ADN du noyau cellulaire en vert.

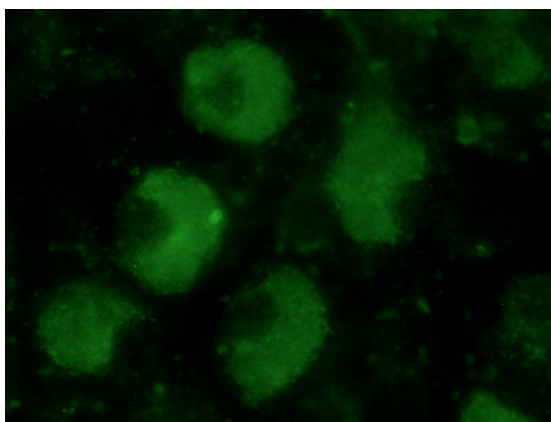


Figure 10 : Les inclusions des *Chlamydiae* colorées par l'immunofluorescence

Cellules McCoy infectées par *C. pecorum* VB2 (isolée d'une épididymite ovine en France), colorées 48 h après l'infection par l'immunofluorescence en utilisant un sérum ovine dirigé contre *C. pecorum* (Thèse Yousef Mohamad K., 2009).

2.1.3. La détection des antigènes

L'utilisation de techniques de détection des antigènes peut améliorer la spécificité et la sensibilité du diagnostic comme lorsqu'on utilise des anticorps monoclonaux spécifiques couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (Immunofluorescence (IF), Fluorescent Antibody Test (FAT)) ou à la phosphatase alcaline (Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)). Cette technique présente l'avantage de détecter dans les échantillons, les *Chlamydiae* vivantes ou mortes. L'utilisation d'anticorps polyclonaux, souvent dirigés contre le LPS, ne permet pas d'identifier l'espèce de *Chlamydiae* mais peut fausser le diagnostic car le LPS porte des antigènes communs avec d'autres bactéries Gram négatives.

Il faut prendre en compte aussi les tissus qui pourraient être utilisés pour préparer les échantillons. Par exemple, lors d'avortement chez les ruminants, les échantillons les plus utilisés sont préparés à partir de membranes placentaires, de cotylédons ou à partir d'écouvillons vaginaux prélevés au moment de l'avortement ou du liquide gastrique ou du poumon des foetus avortés (Longbottom and Coulter, 2003; Souriau and Rodolakis, 1986).

2.1.4. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les possibilités de détection rapide et spécifique des *Chlamydiae* ont considérablement été améliorées depuis le développement des méthodes moléculaires, en particulier la PCR. La PCR permet la caractérisation des différentes espèces bactériennes et l'identification directe des échantillons cliniques, en effet la PCR permet la détection de l'agent pathogène qu'il soit viable ou non. La PCR a permis de détecter 6 fois plus d'animaux excréteurs par voie vaginale que l'isolement sur la culture cellulaire (Sykes et al., 1999).

La plupart des méthodes de PCR classiques, pour le diagnostic des *Chlamydiae*, utilise des amorces dans l'opéron ribosomal d'ARN (16S/ 23S) (Everett and Andersen, 1999), ou dans le gène *ompA* (Kaltenboeck et al., 1992). D'autres gènes sont proposés également pour la PCR classique comme *omp2* ou *pmp* (Hartley et al., 2001; Laroucau et al., 2001).

Tandis que, la PCR classique peut seulement confirmer la présence ou l'absence d'une bactérie pathogène, la PCR en temps réel (quantitative) permet en plus, de quantifier l'agent dans les échantillons en utilisant la fluorescence. La mesure de la fluorescence à chaque cycle de PCR peut se faire par des marquages fluorescents spécifiques de l'ADN double brin (SYBER GREEN) ou par deux sondes spécifiques du produit d'amplification portant chacune un marqueur fluorescent (LightCycler). La quantification permet aussi l'élimination des bruits de fond (bandes non spécifiques) qui sont produites par un nombre de cycles élevés en PCR

classique (35-50 cycles) (Sachse et al., 2009b). Différentes amorces ont été proposées pour la PCR quantitative pour le diagnostic des *Chlamydiae* dans le gène ribosomal 23S (DeGraves et al., 2003; Ehricht et al., 2006; Everett et al., 1999b), le gène *ompA* (Geens et al., 2005; Pantchev et al., 2008) et *incA* (Menard et al., 2006).

En plus de la sensibilité et la rapidité, l'utilisation des amorces spécifiques de plusieurs gènes par PCR classique ou quantitative (PCR multiplex) a permis de rechercher plusieurs agents pathogènes simultanément (Schaeffer and Henrich, 2008) (Berri et al., 2009).

Néanmoins, la présence de faux positifs ou de faux négatifs constitue un des inconvénients potentiels de la PCR pour la détection des microorganismes. Les faux positifs, sont dus notamment à la contamination des prélèvements par les produits des réactions de PCR précédentes, ce qui implique l'utilisation d'équipements spéciaux ou de locaux spécifiques pour éviter ces contaminations par des aérosols. Les faux négatifs sont essentiellement dus à la présence d'inhibiteurs (ex. les échantillons de fèces). L'addition de contrôle interne dans la réaction de PCR permet de les détecter.

Dans certains cas, la seule identification de l'espèce bactérienne n'est pas suffisante, des informations complémentaires sur la sous-espèce, le sérotype ou le génotype et certains facteurs de virulence peuvent être nécessaires. Récemment, la technologie des microarrays a ouvert de nouvelles possibilités particulièrement utiles pour le diagnostic des maladies infectieuses (Sachse et al., 2009b). Les microarrays permettent de tester sur les échantillons d'ADN, un grand nombre de sondes qui peuvent être dérivées des fragments polymorphes de gènes et/ou de différentes régions génomiques. Sachse et ses collègues ont développé deux microarrays : une pour la détection et la différenciation des espèces de *Chlamydiae* et des espèces de *Chlamydophila* en utilisant des sondes dérivées de l'espace intergénique 16s/23s, et l'autre pour différencier les différents génotypes de *C. psittaci* en utilisant des sondes d'hybridation dérivées des domaines variables (2 et 4) du gène *ompA* (Sachse et al., 2005; Sachse et al., 2009a).

2.2. Le diagnostic indirect

La détection des anticorps chez les animaux infectés par *Chlamydiae* a deux buts; la confirmation de la présence ou l'absence de l'infection et la détermination du statut immunitaire de l'animal après la vaccination. Il y a plusieurs méthodes de diagnostic indirect de *Chlamydiae*, mais le choix dépend de la situation épidémiologique chez l'espèce animale infectée. Les animaux d'une même espèce peuvent être infectés par différentes espèces de *Chlamydiae* et présenter les mêmes signes cliniques par exemple, *C. abortus* et *C. pecorum*

chez les ruminant, *C. suis*, *C. abortus* et *C. pecorum* chez les porcs et *C. pecorum* et *C. pneumoniae* chez les koala (Sachse et al., 2009b).

2.2.1. La fixation du complément (CFT, Complement Fixation Test)

Le CFT était autrefois le test le plus généralement utilisé dans les laboratoires vétérinaires (Stamp et al., 1952). Pendant plus de 50 ans, le test CFT a été utilisé pour le diagnostic sérologique de la chlamydie abortive. Il a été recommandé par le bureau international des épizooties (OIE, 2000) (www.oie.int) pendant très longtemps. Une version automatisée (Seramat) de CFT a été récemment développée. Les résultats corrélaient bien avec ceux des essais réalisés manuellement (Magnino et al., 2005). Cependant, le CFT manque de spécificité car son antigène se compose principalement de LPS, qui est commun à toutes les espèces de la famille *Chlamydiaceae* (Brade et al., 1987).

2.2.2. Micro-Immuno-Fluorescence (MIF)

La MIF était beaucoup plus utilisée pour le typage des souches que pour le dépistage des *Chlamydiae* (Eb and Orfila, 1982; Eb et al., 1986). Elle est généralement sensible et spécifique mais elle exige un examen au microscope, ce qui rallonge considérablement le temps de lecture et augmente le coût du diagnostic vétérinaire et n'est pas compatible avec l'analyse d'un grand nombre de sérums.

2.2.3. ELISA

Le test ELISA est plus spécifique et plus sensible que le CFT surtout quand il utilise un antigène spécifique. Plusieurs test d'ELISA ont été proposés pour le diagnostic de la chlamydie abortive en utilisant un extrait protéique total des CE (Anderson et al., 1995; Markey et al., 1993) ou du LPS purifié des CE (Jones et al., 1997; Sting and Hafez, 1992).

Pour augmenter la spécificité du sérodiagnostic, un test rELISA (recombinant ELISA) a été développé en utilisant des antigènes recombinants comme le LPS (Griffiths et al., 1996), la MOMP (Kaltenboeck et al., 1997) ou les Pmps, un antigène développé par Rodolakis A., à l'INRA, Nouzilly, France (Buendia et al., 2001). Les MOMP recombinantes entières de *C. suis*, *C. abortus* et *C. pecorum* ont été également proposées pour un test ELISA spécifique d'espèce (Hoelzle et al., 2004).

Un test cELISA (compétition) a été développé en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre la MOMP dont la fixation est empêchée par la présence des anticorps de sérum positifs (Salti-Montesanto et al., 1997). Cependant, l'inhibition dépend de

la quantité et de la qualité des anticorps de compétition, qui pourraient identifier des épitopes linéaires ou conformationnels de la MOMP (Vretou et al., 2007).

Une étude récente a comparé entre plusieurs tests ELISA utilisés pour le diagnostic de *C. abortus* chez les moutons et en particulier, pour examiner les faux positifs qui peuvent être dus à la présence des souches de *C. pecorum* chez les animaux sains. Le test ELISA utilisant la protéine Omp90-4 recombinante, une protéine de la famille des Pmps, a été le plus spécifique et le plus sensible (McCauley et al., 2007). En comparant tous les kit commerciaux utilisés, le kit le plus spécifique et le plus sensible est le kit Pourquoiier qui a été développé par l'INRA- Nouzilly et l'Institut Pourquoiier (Montpellier, France) et qui utilise un fragment spécifique de Pmps (80-90 kDa) de *C. abortus* (Vretou et al., 2007).

Pendant ces dernières années, plusieurs kits ELISA ont été développés pour le diagnostic sérologique spécifique de *C. abortus* mais il est toujours nécessaire : I) de trouver une méthode pour différencier sérologiquement les animaux vaccinés avec le vaccin vivant des animaux infectés par *C. abortus* et II) de développer un antigène spécifique de *C. pecorum* pour distinguer les animaux infectés par *C. pecorum* des animaux infectés par d'autres espèces de *Chlamydomphila* (Sachse et al., 2009b).

Résultats

Article 1. La protéine de la membrane d'inclusion IncA peut être considérée comme un antigène candidat pour le sérodiagnostic de *Chlamydophila pecorum*

Les souches de *Chlamydophila pecorum* qui sont associées aux différentes maladies chez les ruminants, les porcs et les koalas sont également trouvées dans l'intestin et le mucus vaginal des ruminants asymptomatiques. Ainsi, elles peuvent être responsables de la réponse sérologique positive parfois vue chez les animaux examinés pour *C. abortus*. Ceci a conduit à développer des tests utilisant des antigènes spécifiques de *C. abortus*. Mais dans ces conditions les infections dues à *C. pecorum* ne sont plus détectées et le rôle de cette espèce pourrait être sous-estimé. Malgré des variations antigéniques importantes entre les souches de *C. pecorum*, il serait utile d'identifier des antigènes spécifiques, immunodominants de l'infection par *C. pecorum* qui pourraient être utilisés dans le test ELISA chez les ruminants. Dans ce but, une banque génomique d'ADN de *C. pecorum* souche M14 a été criblée en utilisant un sérum ovin dirigé contre cette souche et plusieurs antigènes ont été sélectionnés.

Un antigène de 35-kDa porté par la protéine IncA (une protéine de la membrane d'inclusion et du système de sécrétion de type III des *Chlamydiae*) n'a pas réagi avec le sérum murin dirigé contre *C. abortus* mais, a réagi avec un anticorps monoclonal spécifique de *C. pecorum* et avec plusieurs sérums dirigés contre différentes souches de *C. pecorum*.

La protéine recombinante IncA pourrait donc être un antigène spécifique pour le sérodiagnostic de l'infection par *C. pecorum*.

Les résultats de cette étude sont rapportés dans l'article ci-joint

« The recombinant 35-kDa inclusion membrane protein IncA could be considered as a suitable candidate antigen for *Chlamydophila pecorum* serodiagnosis »

qui a été soumis pour publication dans Veterinary Microbiology (août, 2009).

The recombinant 35-kDa inclusion membrane protein IncA could be considered as a suitable candidate antigen of *Chlamydophila pecorum* serodiagnosis

Khalil Yousef Mohamad, Abdessalem Rekiki, Mustapha Berri and Annie Rodolakis

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380, Nouzilly (Tours), France

Abstract

Chlamydophila pecorum strains are commonly found in the intestine and vaginal mucus of asymptomatic ruminants. Thus, they may induce a positive serological response when the animals are tested for *C. abortus*. They have been also associated with different pathological diseases in ruminants, in swine and in koala. Because of antigenic variations between *C. pecorum* strains, the identification of specific *C. pecorum* immunodominant antigens recognized in the context of this pathogen infection which could be use in ELISA test is still needed. A gene encoding 35-kDa inclusion membrane protein *incA* of *C. pecorum* was isolated by immuno-screening of *C. pecorum* DNA library using ovine anti-*C. pecorum* antibodies. The recombinant IncA protein did not react with a murine serum directed to *C. abortus* but reacted with a specific monoclonal antibody of *C. pecorum* and toward several ovine serums samples obtained after an experimental infection with different *C. pecorum* strains. This protein might be a good candidate for specific diagnostic of *C. pecorum* infection.

1. Introduction

Chlamydophila pecorum strains have been isolated from small and large ruminants, koalas and swine. In ruminant, *C. pecorum* is commonly found in the intestine or the vaginal mucus of animal without any clinical sign. However, some *C. pecorum* strains cause in ruminant and in swine numerous diseases, such as pneumonia, polyarthritis, conjunctivitis, enteritis, encephalomyelitis and abortion (Kaltenboeck and Storz, 1992; Rodolakis et al., 1998). In koala, *C. pecorum* is known to cause reproductive disease, infertility and urinary tract disease (Jackson et al., 1999). Wild animals could also be infected by *C. pecorum* strains which cause conjunctivitis in western barred bandicoot and abortion in water buffalo (Greco et al., 2008; Warren et al., 2005). *C. pecorum* could be responsible for the positive serological response sometimes seen in flocks, being tested for *C. abortus* which is a zoonotic pathogen that induces infectious abortion in ruminants, termed ovine enzootic abortion (OEA).

Serodiagnostic tests such as the complement fixation test (CFT) and the enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) are the simplest methods for the detection of animal's chlamydial infections. The CFT was mostly used for chlamydiosis until the development of ELISA tests because of the false positive response obtained with anti-complementary serum samples. In addition, this test lacks specificity due to its antigen, consisting mainly of the LPS, which is common in all *Chlamydiaceae* species. Thus, the CFT as well as the ELISA tests using whole bacteria or protein extracts cannot differentiate between antibodies directed against *C. abortus* or *C. pecorum*, (Brade et al., 1987; Markey et al., 1993).

A number of experimental ELISA assays have been developed based on synthetic peptide antigens deduced from the variable segments VS2 and VS4 of the *C. abortus* major outer membrane protein (MOMP) for the detection of species specific antibodies in ovine and bovine sera (Kaltenboeck et al., 1997). An indirect ELISA, using recombinant fragments of the polymorphic outer membrane proteins (POMP) of *C. abortus* as antigens, was described allowing the detection of *C. abortus* antibodies in ovine sera (Longbottom et al., 2001).

The commercial ELISA kit that was developed by INRA-Nouzilly which uses a recombinant fragment of the 80-90 kDa POMP protein, and was produced by the Institut Pourquier (Montpellier, France), showed both high sensitivity (90.9%) and specificity (85.9%) for ovine *C. abortus* infection detection (Buendia et al., 2001). This ELISA assay was found as very specific for the serological diagnosis of *C. abortus* after a comparison study involving CFT, CHEKIT, cELISA, and rOMP90 tests (Vretou et al., 2007).

The entire recombinant MOMP of *C. abortus*, *C. suis* and *C. pecorum* were also suggested in ELISA test as a species-specific serodiagnostic antigen. However, the level of serological cross-reactivity between the different rMOMPs was more than 17% (Hoelzle et al., 2004).

The development of a specific antigen for *C. abortus* diagnosis could prevent the appearance of false positive reaction induced by intestinal *C. pecorum* strains, but the detection of different *C. pecorum* infections will be disregarded.

In the present study, we focused on the research and the identification of a specific antigen that can distinguish the animals infected with *C. pecorum* from animals infected with the other chlamydial species. This would allow us to estimate the prevalence of *C. pecorum* infection in epidemiological studies and to improve the diagnostic of the OEA in ruminant by removing the serological cross-reactivity between *C. pecorum* and *C. abortus*.

2. Materials and Methods

2.1. Chlamydial strains

Five chlamydial strains were used in this study: 4 strains of *C. pecorum* and 1 strain of *C. abortus* (Table 1). All strains were propagated in the yolk sac of chicken embryos and stored at -70 °C as previously described (Rodolakis, 1976).

2.2. Serum samples

Serum samples obtained after an experimental infection of sheep or mice with various *C. pecorum* isolates were used in this study. Serum samples were collected from 10 ewes; 3 ewes were inoculated with *C. pecorum* M14, 3 with *C. pecorum* AB10, 2 with *C. pecorum* LW679 and 2 with *C. pecorum* iB5. Approximately 10^6 PFU/Sheep of each strain were inoculated subcutaneously 4 times at 3 weeks intervals. Two serum samples which were obtained from mice inoculated with *C. pecorum* M14 or *C. pecorum* AB10 were previously used (Rekiki et al., 2004). One serum was pooled from 10 mice infected experimentally with *C. abortus* AB7. Approximately 10^4 PFU/mouse were inoculated subcutaneously 3 times at 2 weeks intervals. The specific monoclonal anti- *C. pecorum* antibody PD3 was produced at INRA- Nouzilly and previously described (Salinas et al., 1996).

In addition, 8 bovine serum samples were collected from herd without any clinical sign.

All these serum samples were examined using microimmunofluorescence (MIF) test as previously described (Salinas et al., 1996).

2.3. Construction and immunoscreening of *C. pecorum* genomic DNA expression library

A genomic DNA was prepared from purified *C. pecorum* M14 strain as previously described (Boumedine and Rodolakis, 1998). The genomic library was constructed using Lambda ZAP Express vector according to the manufacturer's protocole (Stratagene, Lyon, France). The recombinant phages were selected using the ovine anti-*C. pecorum* M14 serum. Several phage clones, which were plaque purified, were converted to the recombinant pBK-CMV plasmid in *E. coli* XLOR according to the manufacturer's instructions (Stratagene).

2.4. Immunoblotting

Total proteins expressed by cloned *C. pecorum* M14 DNA in *E. coli* XLOR were analyzed by immunoblotting. *E. coli* XLOR containing the recombinant plasmid was cultured in LB at 37°C overnight. The cells were pelleted by centrifugation (5000g/ 10 min) resuspended in Laemmli sample buffer containing 5% of 2-mercaptoethanol (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) and boiled at 95°C for 10 min. The proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis (Laemmli, 1970) and transferred onto nitrocellulose membranes in Tris-glycine buffer (containing 0.1 M Tris base, 0.192 M glycine, and 10% methanol) at 65 mA for 60 min (Towbin et al., 1979). Immunoreactive proteins of *C. pecorum* were detected by western blot analysis using ovine serum sample as the first antibody, subsequently reacted with anti-sheep alkaline phosphatase conjugate (Sigma-Aldrich, Lyon, France) as the secondary antibody, and visualized by BCIP/NBT color substrate (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France).

2.5. DNA sequence analysis

Plasmid DNAs were purified by a QIAprep Miniprep kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) from cultures of *E. coli* XLOR clones containing different *C. pecorum* M14 DNA inserts. The cloned DNAs identified by western blot were sequenced at Genome Express Company (Cogenic, Meylan, France) by using T7 forward and reverse primers. The BLASTn and BLASTx in NCBI against the complete genome sequence of *Chlamydia* allowed the identification of the cloned genes.

2.6. Cloning of *incA* gene

The DNA of ovine *C. pecorum* AB10 strain was extracted using the Dneasy kit following the manufacturer's instructions (Qiagen). The *incA* gene was amplified by PCR with two primers, containing *Bam*HI and *Kpn*I restriction sites respectively (restriction sites are underlined), as follows: In-E58-F (5'-CTCGGATCCACAGTGAATCCCCTACGAA -3') and In-E58-R (5'-CTCGGTACCTTTTTGAAGCGCTGTTTCAT -3'). PCR reaction was performed according to the GoTaq Flexi DNA Polymerase protocol (Promega) in an automated DNA thermal cyclor

(Biometra, Goettingen, Germany). After an initial denaturation period of 5 min at 94 °C, reactions were subjected to 30 cycles of 30 sec at 94 °C, 45 sec at an annealing temperature of 63 °C, then 72 °C for 1.5 min with a final extension step at 72 °C for 10 min. The PCR product was purified using the QIAquick PCR kit (Qiagen), and ligated into the pQE30-HisTag expression vector (Qiagen). The recombinant construct (pQE30/*incA*) was used to transform *E. coli* TG1 cells. The recombinant IncA protein was purified in native condition using Nickel affinity chromatography column following the manufacturer's instructions (Qiagen).

3. Results

The immunoscreening of *C. pecorum* genomic DNA library identified 16 immunoreactive clones with various signal intensities (Table 1). The molecular masses of 4 (B3, A10, B15 and B11) out of the sixteen clones were identified by western-blotting method (Figure 1). Three clones (B3, A10 and B15) which had a molecular mass of 32-33 kDa reacted with the same MAb PD3 (Fig. 2). Two immunoreactive proteins showing a molecular mass of 18 and 30 kDa were identified in the fourth clone (B11) (Figure 1).

Sequence analysis and BLAST search of the completed chlamydial genome sequence showed that the 18, 30 and 32-33 kDa proteins corresponded to rRNA methylase family spoU protein (459 bp), peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Mip precursor (744 bp), and inclusion membrane protein IncA (981 bp) respectively.

Full length *incA* gene of *C. pecorum* was cloned in pQE-30 vector and a recombinant 35 kDa protein was expressed. Immunoblotting analysis showed that the purified rIncA reacted with the MAb PD3 (Figure 3) and with all murine and ovine serum samples obtained after an experimental infection with different *C. pecorum* strains. However, no reaction had been seen with the murine serum directed against *C. abortus*. In addition, the ability of the recombinant IncA to detect anti- *C. pecorum* antibodies in healthy ruminant herds was tested using 8 bovine serum samples, 6 out of 8 serum samples were found positive (Figure 4).

4. Discussion

For *C. pecorum* diagnosis, several DNA-based techniques have been proposed by conventional PCR (Everett et al., 1999; Kaltenboeck et al., 1992) or real time PCR by using primers derived from 23S rRNA or *ompA* genes (DeGraves et al., 2003; Yang et al., 2006). In addition, a multiplex PCR was recently developed for detecting *C. abortus*, *C. pecorum* and

Coxiella burnetii (Berri et al., 2009). However, at present, there is no serodiagnostic system that specifically detects *C. pecorum* infection.

In this study, we proposed *C. pecorum* inclusion membrane protein *incA* as a new diagnostic antigen. Our results showed the *incA* was obtained by immunoscreening of *C. pecorum* genomic library with the ovine anti-*C. pecorum* serum sample. Three out of sixteen clones had the *incA* gene and a strong band was detected reacting with ovine serum directed against different *C. pecorum* strains suggesting that this protein could be a common and immunodominant antigen for *C. pecorum*. The recombinant IncA protein reacted with the specific anti-*C. pecorum* MAb PD3, but did not react with the murine serum directed against *C. abortus*, suggesting that IncA could be a specific *C. pecorum* antigen. Although, the biochemical properties, including multimeric structure of IncA proteins are conserved between chlamydial species, there is few similarity in the *incA* sequences and antibodies against IncA do not cross-react between different chlamydial species (Delevoye et al., 2004). Thus, this gene was proposed as chlamydial specie-specific diagnosis in quantitative PCR or in immunodiagnostic test to detect *C. psittaci* and *C. trachomatis* respectively (Menard et al., 2006; Tsai et al., 2007). In addition, recent *in silico* study proposed IncA as a major antigen for *C. pneumoniae* diagnosis (Park et al., 2009).

A variant coding tandem repeats (CTR) was identified along *incA* gene sequence of *C. pecorum* allowing the classification of 19 *C. pecorum* strains isolated from ruminant into 3 groups by comparing the variable motifs of the CTR (Yousef Mohamad et al., 2008a). Seven out of eight pathogenic strains of different clinical and geographical origins were found in one group in which the CTR of *incA* in these strains contains only alanine and proline motif (APA). In addition, a multi-virulence locus sequence typing (MVLST) technique was developed for *C. pecorum* strains classifying into 4 groups; one of which contains only 6 out of 8 pathogenic strains (Yousef Mohamad et al., 2008b). This latter study suggested the use of *ompA*, *incA* and ORF663 genes as molecular markers for the epidemiological studies of *C. pecorum*.

Although, the CTR in *incA* sequence were variable among *C. pecorum* strains, they did not hamper the reaction of recombinant IncA protein with serum samples from sheep immunised with *C. pecorum* including pathogenic or intestinal strains. This suggests that IncA protein has common epitopes recognised by different *C. pecorum* strains. It would be interesting to examine the antigenicity of these motifs and to produce synthetic peptide antigens based on these motifs which could be useful for distinguishing between animals infected by pathogenic or non- pathogenic *C. pecorum* strains.

The rIncA reacted also with 6 out of 8 serum samples collected from healthy bovine herds. This suggest that *C. pecorum* persist in the intestine or vaginal mucus of healthy ruminants as previously demonstrated (Longbottom, 2004). More than 51% of female calves acquired natural infection with *C. pecorum* in the first 2 months after birth (Kaltenboeck et al., 2005). In addition, a investigation study shown that *C. pecorum* was more widespread in cattle than *C. abortus* and the bacteria were frequently detected in vaginal swabs and fecal samples (Jee et al., 2004). That it is necessary to have an approach that could detect clinically unapparent intestinal infection caused by *C. pecorum* have also been reported to be prevalent in both abortion- affected and unaffected ruminant flocks (Reinhold et al., 2008).

In conclusion, this is the first report about the utilization of a recombinant IncA as a potential specific antigen for *C. pecorum* diagnosis. Further analysis is needed to evaluate using of this antigen in ELISA test.

References

- Berri, M., Rekiki, A., Sidi Boumedine, K., and Rodolakis, A., 2009. Simultaneous differential detection of *Chlamydomphila abortus*, *Chlamydomphila pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. *BMC Microbiol.* 9, 130.
- Boumedine, K. S., and Rodolakis, A., 1998. AFLP allows the identification of genomic markers of ruminant *Chlamydia psittaci* strains useful for typing and epidemiological studies. *Res Microbiol.* 149, 735-44.
- Brade, H., Brade, L., and Nano, F. E., 1987. Chemical and serological investigations on the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 2508-12.
- Buendia, A. J., Cuello, F., Del Rio, L., Gallego, M. C., Caro, M. R., and Salinas, J., 2001. Field evaluation of a new commercially available ELISA based on a recombinant antigen for diagnosing *Chlamydomphila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. *Vet Microbiol.* 78, 229-39.
- DeGraves, F. J., Gao, D., Hehnen, H. R., Schlapp, T., and Kaltenboeck, B., 2003. Quantitative detection of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* by high-sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle. *J Clin Microbiol.* 41, 1726-9.
- Delevoye, C., Nilges, M., Dautry-Varsat, A., and Subtil, A., 2004. Conservation of the biochemical properties of IncA from *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia caviae*: oligomerization of IncA mediates interaction between facing membranes. *J Biol Chem.* 279, 46896-906.
- Everett, K. D., Hornung, L. J., and Andersen, A. A., 1999. Rapid detection of the *Chlamydiaceae* and other families in the order *Chlamydiales*: three PCR tests. *J Clin Microbiol.* 37, 575-80.
- Faye, P., Charton, L., Mage, C., Bernard, C., and Le Layec, C., 1972. Propriétés hémagglutinantes du virus de l'avortement enzootique des petits ruminants (Souches de *Rakeia* d'origine ovine et caprine). *Bul. Acad. Vet. Fr.* 45, 169- 173.
- Greco, G., Corrente, M., Buonavoglia, D., Campanile, G., Di Palo, R., Martella, V., Bellacicco, A. L., D'Abramo, M., and Buonavoglia, C., 2008. Epizootic abortion related to infections by *Chlamydomphila abortus* and *Chlamydomphila pecorum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology.* 69, 1061-9.
- Hoelzle, L. E., Hoelzle, K., and Wittenbrink, M. M., 2004. Recombinant major outer membrane protein (MOMP) of *Chlamydomphila abortus*, *Chlamydomphila pecorum*, and *Chlamydia suis* as antigens to distinguish chlamydial species-specific antibodies in animal sera. *Vet Microbiol.* 103, 85-90.
- Jackson, M., White, N., Giffard, P., and Timms, P., 1999. Epizootiology of *Chlamydia* infections in two free-range koala populations. *Vet Microbiol.* 65, 255-64.
- Jee, J., Degraives, F. J., Kim, T., and Kaltenboeck, B., 2004. High prevalence of natural *Chlamydomphila* species infection in calves. *J Clin Microbiol.* 42, 5664-72.
- Kaltenboeck, B., Heard, D., DeGraves, F. J., and Schmeer, N., 1997. Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies against abortigenic *Chlamydia psittaci* in ruminants. *J Clin Microbiol.* 35, 2293-8.

- Kaltenboeck, B., Hennen, H. R., and Vaglenov, A., 2005. Bovine *Chlamydia* spp. infection: do we underestimate the impact on fertility? *Vet Res Commun.* 29 Suppl 1, 1-15.
- Kaltenboeck, B., Kousoulas, K. G., and Storz, J., 1992. Two-step polymerase chain reactions and restriction endonuclease analyses detect and differentiate *ompA* DNA of *Chlamydia* spp. *J Clin Microbiol.* 30, 1098-104.
- Kaltenboeck, B., and Storz, J., 1992. Biological properties and genetic analysis of the *ompA* locus in *Chlamydiae* isolated from swine. *Am J Vet Res.* 53, 1482-7.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-5.
- Longbottom, D., 2004. Chlamydial infections of domestic ruminants and swine: new nomenclature and new knowledge. *Vet J.* 168, 9-11.
- Longbottom, D., Psarrou, E., Livingstone, M., and Vretou, E., 2001. Diagnosis of ovine enzootic abortion using an indirect ELISA (rOMP91B iELISA) based on a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP91B of *Chlamydia abortus*. *FEMS Microbiol Lett.* 195, 157-61.
- Markey, B. K., McNulty, M. S., and Todd, D., 1993. Comparison of serological tests for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection of sheep. *Vet Microbiol.* 36, 233-52.
- Menard, A., Clerc, M., Subtil, A., Megraud, F., Bebear, C., and de Barbeyrac, B., 2006. Development of a real-time PCR for the detection of *Chlamydia psittaci*. *J Med Microbiol.* 55, 471-3.
- Norton, W. L., and Storz, J., 1967. Observations on sheep with polyarthritis produced by an agent of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group. *Arthritis Rheum.* 10, 1-12.
- Park, S. H., Kwon, S. J., Lee, S. J., Kim, Y. C., Hwang, K. Y., Kang, Y. H., and Lee, K. J., 2009. Identification of immunogenic antigen candidate for *Chlamydia pneumoniae* diagnosis. *J Proteome Res.*
- Reinhold, P., Jaeger, J., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Bachmann, R., Schubert, E., Melzer, F., Elschner, M., and Sachse, K., 2008. Impact of latent infections with *Chlamydia* species in young cattle. *Vet J.* 175, 202-11.
- Rekiki, A., Bouakane, A., Hammami, S., El Idrissi, A. H., Bernard, F., and Rodolakis, A., 2004. Efficacy of live *Chlamydia abortus* vaccine 1B in protecting mice placentas and fetuses against strains of *Chlamydia pecorum* isolated from cases of abortion. *Vet Microbiol.* 99, 295-9.
- Rodolakis, A., 1976. [Abortive infection of mice inoculated intraperitoneally with *Chlamydia ovis*]. *Ann Rech Vet.* 7, 195-205.
- Rodolakis, A., Bernard, F., and Lantier, F., 1989. Mouse models for evaluation of virulence of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants. *Res Vet Sci.* 46, 34-9.
- Rodolakis, A., Salinas, J., and Papp, J., 1998. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet Res.* 29, 275-88.
- Salinas, J., Souriau, A., De Sa, C., Andersen, A. A., and Rodolakis, A., 1996. Serotype 2-specific antigens from ruminant strains of *Chlamydia pecorum* detected by monoclonal antibodies. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 19, 155-61.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76, 4350-4.
- Tsai, P. Y., Hsu, M. C., Huang, C. T., and Li, S. Y., 2007. Human antibody and antigen response to IncA antibody of *Chlamydia trachomatis*. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 20, 156-61.
- Vretou, E., Radouani, F., Psarrou, E., Kritikos, I., Xylouri, E., and Mangana, O., 2007. Evaluation of two commercial assays for the detection of *Chlamydia abortus* antibodies. *Vet Microbiol.*
- Warren, K., Swan, R., Bodetti, T., Friend, T., Hill, S., and Timms, P., 2005. Ocular chlamydial infections of western barred bandicoots (*Perameles bougainville*) in Western Australia. *J Zoo Wildl Med.* 36, 100-2.
- Yang, J. M., Liu, H. X., Hao, Y. X., He, C., and Zhao, D. M., 2006. Development of a rapid real-time PCR assay for detection and quantification of four familiar species of *Chlamydiaceae*. *J Clin Virol.* 36, 79-81.
- Yousef Mohamad, K., Rekiki, A., Myers, G., Bavoil, P. M., and Rodolakis, A., 2008a. Identification and characterisation of coding tandem repeat variants in *incA* gene of *Chlamydia pecorum*. *Vet Res.* 39, 56.
- Yousef Mohamad, K., Roche, S. M., Myers, G., Bavoil, P. M., Laroucau, K., Magnino, S., Laurent, S., Rasschaert, D., and Rodolakis, A., 2008b. Preliminary phylogenetic identification of virulent *Chlamydia pecorum* strains. *Infect Genet Evol.* 8, 764-71.

Table 1: Chlamydial strains used in this study

Strain	Geographic origin	Host	Pathology	Reference
<i>C. pecorum</i> M14	Morocco	Goat	Abortion	(Rekiki et al., 2004)
<i>C. pecorum</i> AB10	France	Sheep	Abortion	(Rodolakis et al., 1989)
<i>C. pecorum</i> LW679	USA	Sheep	Arthritis	(Norton and Storz, 1967)
<i>C. pecorum</i> iB5	France	Sheep	No clinical sign (Faecal carriage)	(Rodolakis et al., 1989)
<i>C. abortus</i> AB7	France	Sheep	Abortion	(Faye et al., 1972)

Table 2: Signal intensity of the antigenic reaction of the 16 recombinants with the ovine anti-*C. pecorum* M14 serum sample.

Signal intensity	Clone
Strong (+++)	B1, B3, A10
Medium (++)	B2, A7, B14, B15, B17, A4
Weak (+)	A2, A1, B5, B7, B18, B19, B11

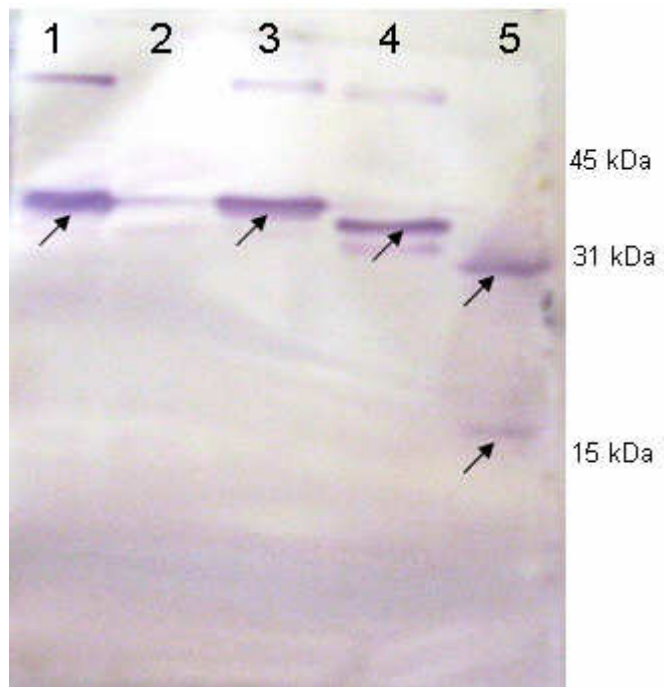


Fig. 1: Western Blot analysis of 5 clones using ovine anti-*C. pecorum* serum sample. Lane 1, clone B3 (33 kDa); lane 2, negative control; lane 3, clone A10 (33 kDa); lane 4, clone B15 (32 kDa); lane 5, clone B11 (30 and 18 kDa).

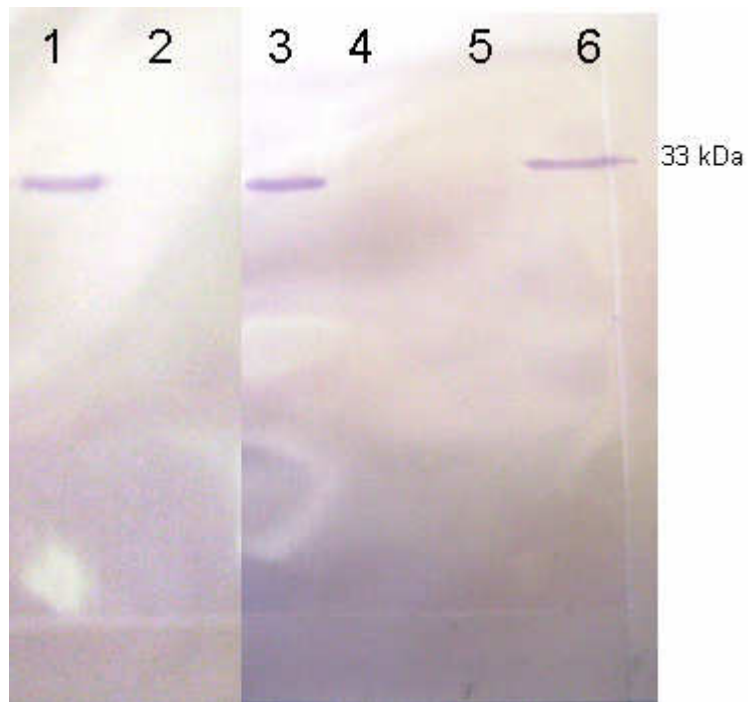


Fig. 2: Western Blot analysis of 6 clones using MAb PD3. Lane 1, clone B3; lane 2, clone B7; lane 3, clone B15; lane 4, clone B17; lane 5, clone B2; lane 6, clone A10. Three clones, B3, B15 and A10, reacted with the Mab PD3.

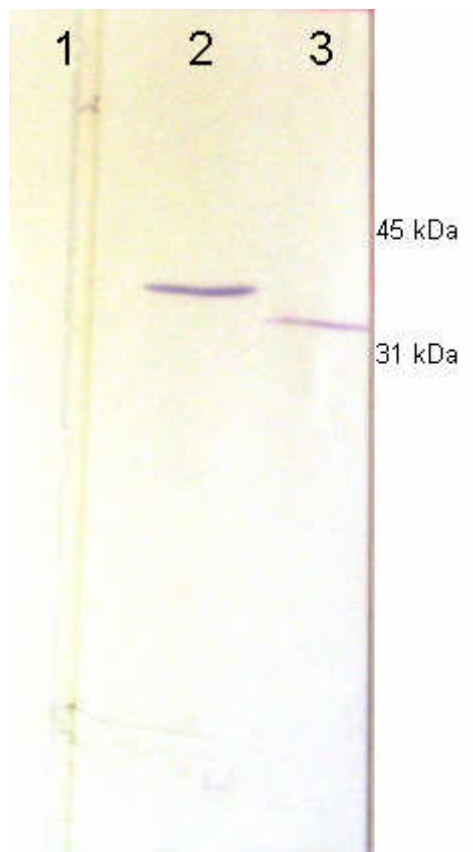


Fig. 3: Western Blot analysis of rIncA using MAb PD3. Lane 1, *E. coli* TG1 sample not induced by IPTG; lane 2, *E. coli* TG1 sample induced by IPTG (35 kDa); lane 3, clone B15 (33 kDa).

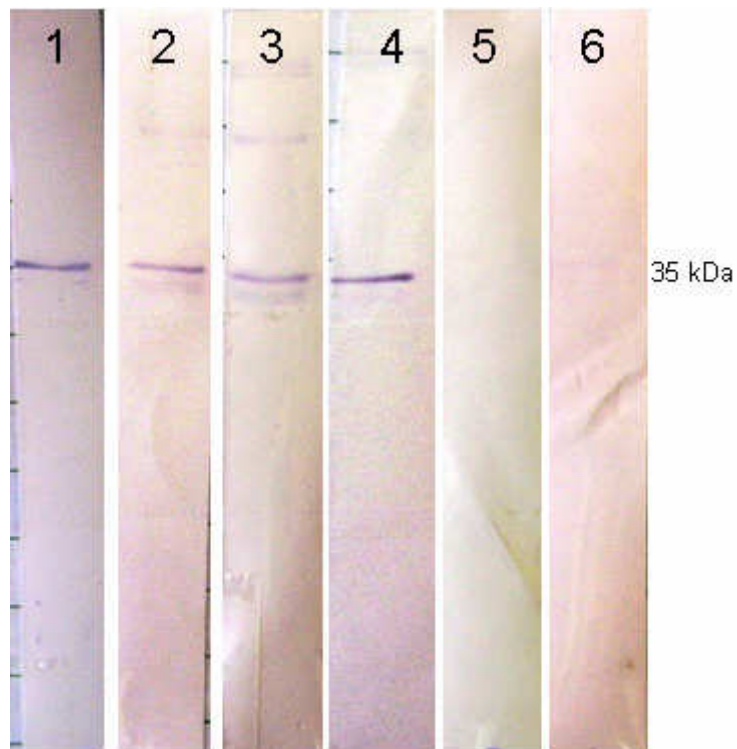


Fig. 4: Western Blot analysis of rIncA (35 kDa). Lane 1, ovine anti-*C. pecorum* M14 serum sample (positive control); lane 2, 3, 4, 5 and 6, bovine serum samples collected from healthy herd.

Article 2. Identification et caractérisation d'une séquence répétée codante variable du gène *incA* de *Chlamydophila pecorum*

L'étude de l'antigène recombinant IncA a permis de mettre en évidence la présence d'une séquence répétée codante (CTR) identifiée à l'extrémité 3' du gène *incA* de *C. pecorum*, 51 souches des différentes espèces de *Chlamydiae* ont été examinées.

La CTR a été trouvée dans 18 des 18 souches testées de *C. pecorum* isolées des animaux symptomatiques et asymptomatiques et de différentes origines géographiques. La CTR a été également trouvée dans les deux souches de *C. abortus* isolées des fèces de ruminant, appartenant à des troupeaux asymptomatiques qui ont été testées : la souche MO907 isolée d'une brebis aux USA et la souche iC1 isolée d'une chèvre en France. En revanche, elle n'a pas été trouvée chez les souches de *C. abortus* isolées des cas cliniques ni chez les souches examinées de *C. psittaci*, *C. caviae*, *C. felis* et *C. trachomatis*.

Le nombre de répétitions des CTR est variable et code pour plusieurs motifs qui sont riches en alanine et proline. La structure variable des CTR de *incA*, pourrait être impliquée dans l'adaptation de *C. pecorum* à son environnement en lui permettant de persister longtemps dans la cellule hôte.

Les résultats de cette étude sont rapportés dans l'article ci-joint

« Identification and characterisation of coding tandem repeat variants in *incA* gene of *Chlamydophila pecorum* »

qui a été publié dans Veterinary Research en 2008.

Identification and characterisation of coding tandem repeat variants in *incA* gene of *Chlamydophila pecorum*

Khalil YOUSEF MOHAMAD¹, Abdessalem REKIKI¹, Garry MYERS²,
Patrik M. BAVOIL³, Annie RODOLAKIS^{1*}

¹ INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, Centre de recherche de Tours,
F-37380 Nouzilly, France

² Institute for Genome Science, University of Maryland, Baltimore, MD, USA

³ Department of Biomedical Sciences, University of Maryland, Baltimore, MD, USA

(Received 5 March 2008; accepted 23 July 2008)

Abstract – Bacteria of the family Chlamydiaceae are obligate intracellular pathogens of human and animals. *Chlamydophila pecorum* is associated with different pathological conditions in ruminants, swine and koala. To characterize a coding tandem repeat (CTR) identified at the 3' end of *incA* gene of *C. pecorum*, 51 strains of different chlamydial species were examined. The CTR were observed in 18 of 18 tested *C. pecorum* isolates including symptomatic and asymptomatic animals from diverse geographical origins. The CTR were also found in two strains of *C. abortus* respectively isolated from faeces from a healthy ewe and from a goat belonging to asymptomatic herds, but were absent in *C. abortus* strains isolated from clinical disease specimens, and in tested strains of *C. psittaci*, *C. caviae*, *C. felis* and *C. trachomatis*. The number of CTR repeats is variable and encode several motifs that are rich in alanine and proline. The CTR-derived variable structure of *incA*, which encode the Chlamydiaceae-specific type III secreted inclusion membrane protein, IncA, may be involved in the adaptation of *C. pecorum* to its environment by allowing it to persist in the host cell.

Chlamydophila pecorum / *incA* gene / coding tandem repeats

1. INTRODUCTION

The family Chlamydiaceae is divided into two genera, *Chlamydia* and *Chlamydophila*. The *Chlamydia* genus includes three species: *C. trachomatis*, *C. muridarum* and *C. suis*. The *Chlamydophila* genus comprises six species: *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. felis*, *C. caviae*, *C. pneumoniae* and *C. pecorum* [11]. *C. abortus* strains, efficiently colonise the placenta inducing abortion and weak neonates in ruminants [35]. *C. pecorum* strains have been isolated from ruminants, koalas and swine [24, 26]. These bacteria are associated with abortion, conjunctivitis, encephalomyelitis, enteritis, pneumonia and

polyarthritis, but are commonly found in the intestines of animal without any clinical sign [36]. This species presents many genomic variations [9, 39].

Infection of host cells by all chlamydiae is mediated through a non-metabolically active form; the elementary body (EB), whereas intracellular multiplication progresses through the reticulate body (RB), a metabolically active, non-infectious form [28]. RB replication takes place entirely within an intracellular vacuole (the inclusion), whose membrane constitutes a barrier separating chlamydiae from the nutrient-rich cytoplasm. Modification of the inclusion membrane requires chlamydial protein synthesis, suggesting that the chlamydiae synthesize proteins engaged in interactions between the inclusion and cytosolic

* Corresponding author: rodolaki@tours.inra.fr

components [42]. To date, at least 11 distinct Inc proteins have been identified in the inclusion membrane of *C. trachomatis*-infected cells [4, 5, 43]. The first identified chlamydial Inc protein, termed IncA, involved a comparison of the serological response to *Chlamydia* in animals either infected with live organisms or immunized with killed chlamydial EB. Most Inc proteins have a unique bi-lobed hydrophobic domain of approximately 50–80 amino acids [34]. Microinjection studies [16] have provided direct evidence indicating that *C. trachomatis* IncA participates in the fusion of inclusions. In addition, inclusions containing mutant IncA do not fuse [47]. IncA also forms long fibers extending from the inclusion that are used as cytosolic tracks mediating the formation of secondary inclusions [48].

To date, coding tandem repeats (CTR) have not been described in chlamydial genomes including that of *Chlamydophila pecorum*, the subject of our study. Variable copy number tandem repeats have been observed in a number of prokaryotic genomes [1, 22]. The tandem repeats, which may be identical or partially degenerate, are usually classified among satellites: minisatellites (repeat units in the range 6–100 bp, spanning hundreds of base-pairs) and microsatellites (repeat units in the range 1–5 bp, spanning a few tens of nucleotides).

More recently, a number of studies have supported the notion that tandem repeats reminiscent of mini and microsatellites are useful as markers for the identification of pathogenic bacteria including those recently emerged from highly monomorphic species [2, 13, 19, 49]. Tandem repeats located within the promoter region of a gene may reveal an on/off switch of gene expression at the transcriptional level [50, 51]. CTR with a repeat unit length a multiple of three are contained within and contribute to a coding sequence, such that variations in the number of copies modify the gene product itself [53]. Tandem repeats within coding regions whose repeat unit length is not a multiple of three can induce a reversible premature end of translation when a mutation changes the number of repeats [17].

In this study, we describe, a coding tandem repeat identified in the *incA* gene via screening a genomic library of *C. pecorum*. The CTR is characterized and its existence in a large number of chlamydial strains belonging to several species is documented.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chlamydia isolates

Fifty one strains representing six species of the family Chlamydiaceae were used in this study: 19 strains of *C. pecorum*, 21 of *C. abortus*, 8 of *C. psittaci*, 1 of *C. caviae*, 1 of *C. felis* and 2 of *C. trachomatis* (Tab. I). All strains were propagated in the yolk sac of chicken embryos and stored at -70°C as previously described [35]. For library construction, EB of *C. pecorum* M14 were purified according to [8].

2.2. Genomic library construction

Genomic DNA was extracted from purified EB as described [7] of *C. pecorum* M14 (isolated from an aborted goat in Morocco), restriction digested with *Sau3A* (Promega, Charbonnières, France) enzyme and fragments (0.1–12 kb) in length were used to generate a lambda ZAP library (ZAP Express Predigested Vector Kit, Stratagene, Massy, France). The library was screened with anti-*C. pecorum* M14-specific serum from infected sheep (experimentation).

2.3. PCR

Genomic DNA was extracted from 15–50 μL of yolk sac fluid using the tissue protocol of the DNeasy Tissue Kit (QIAGEN S.A., Courtaboeuf, France). PCR was performed according to the GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) protocol. The primers used to generate a fragment (454 bp) which contained the tandem repeats were B15-F (5' CAAGAACAGTTGCGTCCTG) and IncA-S-R (5' GTGTGAGATGGCTCTTTATG). PCR (final volume, 25 μL) consisted of DNA denaturation at 94°C for 5 min followed by 30 cycles of amplification with Thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany). Each cycle consisted of a denaturation step at 94°C for 30 s, an annealing step at 63°C for 45 s, an extension step at 72°C for 1.5 min, and a chain elongation at 72°C for 10 min. Finally, 10 μL

Table I. Strains used in this study.

Strain	Geographic origin	Host	Pathology	Passage history (number)	Reference
<i>C. pecorum</i>					
M14	Morocco	Goat	Abortion	6	[32]
AKT	Tunis	Sheep	Abortion	2	^a
AB10	France	Sheep	Abortion	5	[30]
VB2	France	Sheep	Orchitis	1	^a
LW679	USA	Sheep	Arthritis	2*	[30]
SBE	England	Cattle	Encephalomyelitis	3*	^b
E58	USA	Cattle	Encephalomyelitis	unknown	[27]
824	Scotland	Sheep	Conjunctivitis	2*	[25]
BE53	England	Cattle	Healthy (Feaces)	2*	^b
iB1, iB2, iB3, iB4 and iB5	France	Sheep	Healthy (Feaces)	5, 3, 4, 3, 4	[40]
R69 and W73	Ireland	Sheep	Healthy (Feaces)	3*, 2*	[40]
iC2, iC3 and iC4	France	Goat	Healthy (Feaces)	3, 3, 5	[40]
<i>C. abortus</i>					
AB7	France	Sheep	Abortion	6*	[12]
H574	Scotland	Sheep	Abortion	4*	[25]
S26/3	Scotland	Sheep	Abortion	4*	[25]
AB1, AB2, AB13 and AB15	France	Sheep	Abortion	6, 4, 5, 2	[36]
AB16	France	Sheep	Abortion	3*	[6]
LLG and POS	Greece	Sheep	Abortion	3*, 3*	[45]
AV1	France	Cattle	Abortion	6	[9]
BA1	England	Cattle	Abortion	1*	[15]
AC1	France	Goat	Abortion	4	[9]
1H and 1B	France	Sheep	AB7 Mutant	2, 3	[38]
109–75	France	Sheep	Pneumonitis	2*	[9]
VB1	France	Sheep	Orchitis	1	[9]
OC1	France	Sheep	Conjunctivitis	6	[9]
1H/77	Scotland	Sheep	Arthritis	2*	[25]
MO907	USA	Sheep	Healthy (Feaces)	4*	[46]
iC1	France	Goat	Healthy (Feaces)	4	[9]
<i>C. psittaci</i>					
VS1	USA	Parrot	Psittacosis	1*	[3]
L2A	France	Bird	Ornithosis	1*	[40]
GR9	USA	Duck	Ornithosis	1*	^c
NJ1	USA	Turkey	Ornithosis	1*	[3]
VS225	USA	Psittacine	Psittacosis	1*	^c
9105983	France	Dinghy	Psittacosis	1	[10]
940673	France	Calopsitte	Psittacosis	1	[10]
9106568	France	Dove	Ornithosis	1	[10]
<i>C. caviae</i>					
GPIC	USA	Guinea- Pig	Conjunctivitis	2*	[44]

Table I. Continued.

Strain	Geographic origin	Host	Pathology	Passage history (number)	Reference
<i>C. felis</i>					
FePn	USA	Cat	Live vaccine	1*	[40]
<i>C. trachomatis</i>					
Serovar D strain D	Greece	Human	Conjunctivitis	2*	^d
Serovar E strain E	Greece	Human	Conjunctivitis	1*	^d

^a Isolated at INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, Centre de recherche de Tours, France.

^b Isolated by M. Dawson, Virology Department, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK.

^c Isolated by A. Andersen, National Animal Disease Center, USDA, USA.

^d From E. Vretou, Institute Pasteur Hellenique, Athens, Greece.

* Number of passages performed at INRA after receiving the strain.

of the PCR product was analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide stain.

2.4. *incA* gene sequencing

The nucleotide sequence of *incA* from *C. pecorum* strains and strains of *C. abortus* that tested positive by PCR, was determined by automated sequencing (Genome Express, Meylan, France). Primers used to amplify the 1.3 kb fragment including *incA*, were IncA-S-F: (3'TATCGTAATACCAAACCACT) and IncA-S-R: (3'GTGTGAGATGGCTCTTTATG) according to the GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) protocol with annealing temperature of 52 °C and other PCR conditions as reported above. Amplified DNA was purified with the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN S.A.). The primer pairs used in this study were derived from the genome sequence of *C. pecorum* E58 obtained by Myers and Bavoil (Genbank accession numbers are provided in Tab. II). Multiple alignments were performed using CLUSTAL W (1.83)¹ and the *C. pecorum* E58 sequence as reference.

3. RESULTS

3.1. Identification of a CTR in *incA*

The screening of the lambda ZAP library led to the isolation of a clone carrying a

1363 bp DNA fragment encoding an antigen of 35 kDa. Sequence analysis of this clone in pBK-CMV revealed two open reading frames (ORF). Comparison with the genome of *Chlamydomonas reinhardtii* E58 revealed that ORF1 is 97% identical with a segment of *incA* of *Chlamydomonas reinhardtii* E58 and only weak homology (< 25%) with other published chlamydial genomic sequence². Subsequent sequence analysis revealed that ORF1 of *C. pecorum* M14 contained CTR of nine nucleotides repeated 22 times. PCR amplification of the corresponding *incA* segment was then attempted from 51 strains from different species of the Chlamydiaceae (Tab. I) and the amplicons submitted to sequence analysis. Although an *incA* fragment of variable size (Fig. 1), was amplified from all tested *C. pecorum* strains and two *C. abortus* strains, (MO907 and iC1) isolated from the faeces of healthy animals, PCR amplification was negative for *C. abortus* strains isolated from clinical disease specimens, and for tested strains of *C. psittaci*, *C. caviae*, *C. felis* and *C. trachomatis*.

3.2. Characterization of the *incA* CTR

Several types of repeat motifs were observed in the 3' segment of *incA*. All

¹ Available online: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> [consulted 08/06/2007].

² Basic Local Alignment Search Tool [online]: <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/> [consulted 19/07/2007].

Table II. Summary table of the CTR motifs in *incA* sequences^a.

Strain	Gene bp	Protein aa	Motif 1 APA	Motif 2 APAPE	Motif 3 APEVPA	Motif 4 APE	Accession No.
M14	1071	356	22				EU340814
VB2	1008	335	15				EU340824
iB3	999	332	14				EU340827
SBE	981	326	12				EU340823
E58	981	326	12				EU837066
iB5	984	327	12				EU340817
LW679	969	322	11				EU340821
AB10	954	317	9				EU340815
MO907*	954	317	9				EU340812
iC1*	954	317	9				EU340813
AKT	945	314	8				EU340816
BE53	945	314	8				EU340808
iB4	1023	340	10	4			EU340826
iC2	1098	365	6	12			EU340818
iC3	1083	360	6	11			EU340820
iC4	1098	365	6	12			EU340819
R69	1005	334	2	8			EU340822
W73	1005	334	2	8			EU340825
824	1053	350	4		8		EU340809
iB2	1008	335	5		3	4	EU340810
iB1	999	332	5		3	3	EU340811

^a Gene and predicted protein size, number of the repeats for every motif and Genbank accession numbers are shown for 19 *C. pecorum* strains and 2 *C. abortus* strains (*).

sequenced strains presented a motif of nine nucleotides, GCTCCAGCG, (motif 1) encoding amino acids APA with 3 to 22 repetitions (Tab. II). A second motif of 15 nucleotides, GCTCCAGCTCCAGAG, encoding APAPE (motif 2) was present in six strains with 4–12 repetitions. A third motif of 18 nucleotides, GCTCCAGAGGTTCCAGCG, encoding APEVPA (motif 3) was found in three strains with three to eight repetitions. A fourth motif present in two strains was composed of nine nucleotides, GCTCCAGAG encoding APE (motif 4), which was repeated three or four times. These motifs allowed to classify the strains into three groups.

A first group of 11 strains harbouring motif 1 only, includes 10 *C. pecorum* strains (7 associated with different diseases and 3 isolated from faeces) and 2 *C. abortus* strains (Fig. 2). A second group includes seven *C. pecorum* strains presenting 2 motifs: 5 strains isolated from faeces containing motifs

1 and 2 in tandem (Fig. 3). Two variations on the theme were *C. pecorum* IB4, in which motif 2 is enclosed by two motifs 1 (Fig. 4), and 824 isolated from conjunctivitis which has motifs 1 and 3 (Fig. 5). A third groups included 2 intestinal *C. pecorum* strains iB1 and iB2 presenting three motifs (motif 1, 3 and 4) (Fig. 6).

4. DISCUSSION

The coding tandem repeat found in *incA* of all tested *C. pecorum* strains and two *C. abortus* strains isolated from the faeces of healthy animals was neither present in other *C. abortus* strains isolated from clinical disease specimens, nor from tested *C. psittaci*, *C. caviae*, *C. felis* and *C. trachomatis* strains. Seven out of eight *C. pecorum* strains isolated from animals with clinical symptoms including abortion (three strains) were classified in a single group (group 1). Although this grouping provides hints of a

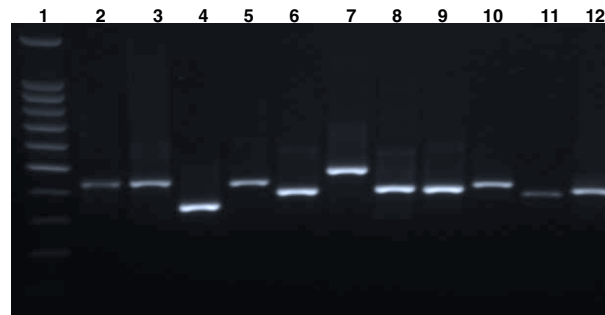


Figure 1. Amplification of *incA* sequence containing the coding tandem repeat (300-500 bp) on DNA extracts of *C. pecorum* strains. Lane 1: 100 bp ladder; Lanes 2-12: *C. pecorum* M14, 824, AB10, LW679, R69, iC2, VB2, W73, iB4, BE53, and iB3.

possible association with disease, additional *C. pecorum* strains from symptomatic or asymptomatic animals would need to be examined to establish an association of the motifs with virulence.

The motifs of IncA are rich in the amino acids alanine and proline and it is striking that many proline-rich sequences are repeated in proteins, e.g. (xP) or (xPy). Some of these sequences have unknown functions, but many of them appear to be involved in processes that increase bacterial virulence. Indeed, proteins with proline-rich CTR are often enhanced in their ability to interact with other proteins or to cross cell membranes.

Mutants of *Listeria monocytogenes* lacking proline-rich repeats domain of the ActA protein, a key factor in bacterium-host cell microfilaments interactions, moved two times slower than the wild type [21]. Attachment of *Mycobacterium avium* to the extracellular matrix protein fibronectin, a key to the virulence of several extracellular pathogenic bacteria binding to mucosal surfaces, is mediated by a fibronectin-attachment protein which contains CTR of AP [41]. However as the Chlamydiaceae are not free in the cytosol and as the IncA protein is not present on the extracellular form of chlamydiae, but only expressed after attachment to the host-cell [33], a similar role in attachment or intracellular mobility is not directly applicable to IncA CTR of *C. pecorum*.

The procyclin protein of *T. brucei* contains a long DP or EP repeat enabling the protein to

extend out from the cell membranes [52]. IncA is likewise translocated across the membrane of the inclusion to facilitate interaction with cytoplasmic components of the host cell [33]. However IncA translocation to the outer face of the inclusion membrane also occurs in *Chlamydia* species with IncA proteins lacking the AP repeats.

In other examples, the variation in copy number within coding tandem repeats has been shown to alter the ability of antibodies to bind to bacterial antigens: addition of tandem repeats in the PAc protein of *Streptococcus mutans*, which normally contains three long repeated regions, induces higher antibody production than the native peptide [18]. The IncA CTR present at the C-terminal end of the protein could therefore affect the conformation of the protein inducing changes in its antigenicity, as previously observed. Size variation in surface proteins Lmp1 and Lmp3 of *Mycoplasma hominis* has also been correlated to tandem repeats at the C-terminal end of the proteins [20].

All examples described above illustrate the importance of the CTR in enhancing specific properties of bacterial virulence factors. It is surprising therefore that CTR are observed in *C. pecorum* which is regarded as the least virulent species of Chlamydiaceae. However we note that 7 out of 8 strains isolated from symptomatic disease samples belong to a single group that has only one motif (APA) with a different number of repeats. In addition, the two encephalomyelitis *C. pecorum*

M14	272	QQAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAPENN	346
VB2		QQAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPADPA-----PENN	325
IB3		QQAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAPD-----PENN	322
SBE		QQAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAP-----PENN	316
E58		QQAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAP-----PENN	316
IB5		QQAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAP-----PENN	317
LW679		QQAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAPD-----PENN	312
IC1		QQAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAP-----PENN	307
MO907		QQAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAP-----PENN	307
AB10		QQAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAP-----PENN	307
AKT		QQAAPAAPAAPAAPAAPAAPAP-----PENN	304
BE53		VHAAAPAAPAAPAAPAAPAPAPEN-----NDNN	304
		*****	**

Figure 2. Alignment of predicted amino acid sequences of the *incA* CTR region in 10 *C. pecorum* strains and 2 *C. abortus* intestinal strains.

IC2	272	QQAAPAAPAAPAAPAAPAAPENN	355
IC4		QQAAAPAAPAAPAAPAAPAAPENN	355
IC3		QQAAPAAPAAPAAPAAPAAPENN	355
W73		QQAAPAAPA-----APENN	324
R69		QQAAPAAPA-----APENN	324
		***** *****	**

Figure 3. Alignment of predicted amino acid sequences of the *incA* CTR region in five *C. pecorum* intestinal strains.

IB4 272 QQAAAPAAPAVPAAPAPEAPAPEAPAPEAPAPEAPAAPAAPAAPAAPAAPDPENNDNNNDNAAS 340

Figure 4. Alignment of predicted amino acid sequences of the coding tandem repeat of the *incA* gene of *C. pecorum* IB4.

824 272 QQAAAPAAPAAPAEVPAAPEVPAAPEVPAAPEVPAAPEVPAAPEVSAAPDPENN 340

Figure 5. Alignment of predicted amino acid sequences of the *incA* CTR region in *C. pecorum* conjunctivitis strain 824.

IB2 272 QQAAAPAAPVAPAAPAPAVPEAPEVPAAPEVPAAPEAPEAPEAPEAPEAPEAPENDNNNDNDAAS 335
IB1 QQAAAPAAPVAPAAPAPAVPEAPEVPAAPEVPAAPEAPEAPEAPEAPEAPEAPENDNINDNDAAS 332

Figure 6. Alignment of predicted amino acid sequences of the *incA* CTR region in two *C. pecorum* intestinal strains.

(E58 and SBE) strains had the same number of repeats in spite of their different geographical origins. The same high level of homology was found for the two *C. abortus* strains (isolated from healthy animals) and abortive *C. pecorum* strains AB10 and AKT isolated in France and Tunisia respectively. The high sequence similarity of *incA* between the three intestinal *C. pecorum* isolates iC2, iC3 and iC4 (which were isolated from three animals belonging to the same herd) added to the previously observed similarity by typing with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence (MIF) [40], leading us to postulate that these are three different isolates of the same original strain. Passages in eggs or in the animal host may have played a role in the observed minor differences (± 1 repetition of CTR) as for the intestinal ovine *C. pecorum* iB1 and iB2 isolates.

CTR may play a role in the adaptation of chlamydiae to their environment. Variability in the number of repeats in various cell-surface genes of *Candida albicans* clinical isolates may allow rapid adaptation to a fluctuating environment and/or immune evasion [54, 55]. *C. pecorum* is often found in the intestines of healthy animals and it is able to adapt to and persist in the host cell without destroying it, owing to its slow growth rate [23, 29, 37]. Persistence also correlates to the non-fusogenic inclusions phenotype as predicted by bi-mathematic modelling [31] and confirmed by observation: indeed, non fusogenic strains of *C. trachomatis* are more frequently associated with sub-clinical infection than their fusogenic counterparts [14]. To further characterize the impact of the CTR on the structure/function of the inclusion in various strains of *C. pecorum*, future studies of in vivo IncA expression may allow to establish the full range of antigenic variability of this protein among different strains.

In conclusion, the function of the IncA AP-rich CTR variants of *C. pecorum*, a species which is less virulent than other *Chlamydophila* species such as *C. psittaci* and *C. abortus*, is unknown. However, it is tempting to speculate that it may be involved in the adaptation of the organism to

its environment and/or for immune evasion thereby allowing *C. pecorum* to persist in the host cell for extended periods of time.

Acknowledgements. We are grateful to Dr A. Cloeckaert for helpful advice and discussion. P.M. Bavoil and G.S.A. Myers were supported by NIH grant # RO1A151472.

REFERENCES

- [1] Achaz G., Rocha E.P., Netter P., Coissac E., Origin and fate of repeats in bacteria, *Nucleic Acids Res.* (2002) 30:2987–2994.
- [2] Adair D.M., Worsham P.L., Hill K.K., Klevytska A.M., Jackson P.J., Friedlander A.M., Keim P., Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*, *J. Clin. Microbiol.* (2000) 38:1516–1519.
- [3] Andersen A.A., Van Deusen R.A., Production and partial characterization of monoclonal antibodies to four *Chlamydia psittaci* isolates, *Infect. Immun.* (1988) 56:2075–2079.
- [4] Bannantine J.P., Griffiths R.S., Viratyosin W., Brown W.J., Rockey D.D., A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane, *Cell. Microbiol.* (2000) 2: 35–47.
- [5] Bannantine J.P., Stamm W.E., Suchland R.J., Rockey D.D., *Chlamydia trachomatis* IncA is localized to the inclusion membrane and is recognized by antisera from infected humans and primates, *Infect. Immun.* (1998) 66:6017–6021.
- [6] Bouakane A., Rekiki A., Rodolakis A., Protection of pregnant mice against placental and splenic infection by three strains of *Chlamydophila abortus* with a live 1B vaccine, *Vet. Rec.* (2005) 157:771–774.
- [7] Boumedine K.S., Rodolakis A., AFLP allows the identification of genomic markers of ruminant *Chlamydia psittaci* strains useful for typing and epidemiological studies, *Res. Microbiol.* (1998) 149:735–744.
- [8] Caldwell H.D., Kromhout J., Schachter J., Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*, *Infect. Immun.* (1981) 31:1161–1176.
- [9] Denamur E., Sayada C., Souriau A., Orfila J., Rodolakis A., Elion J., Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*, *J. Gen. Microbiol.* (1991) 137:2525–2530.
- [10] Duan Y.J., Souriau A., Mahe A.M., Trap D., Andersen A.A., Rodolakis A., Serotyping of chlamydial clinical isolates from birds with monoclonal antibodies, *Avian Dis.* (1999) 43:22–28.

- [11] Everett K.D., Bush R.M., Andersen A.A., Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms, Int. J. Syst. Bacteriol. (1999) 49:415–440.
- [12] Faye P., Charton L., Mage C., Bernard C., Le Layec C., Propriétés hémagglutinantes du virus de l'avortement enzootique des petits ruminants (souches de Rakeia d'origine ovine et caprine), Bull. Acad. Vet. Fr. (1972) 45:169–173.
- [13] Frothingham R., Meeker-O'Connell W.A., Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats, Microbiology (1998) 144:1189–1196.
- [14] Geisler W.M., Suchland R.J., Rockey D.D., Stamm W.E., Epidemiology and clinical manifestations of unique *Chlamydia trachomatis* isolates that occupy nonfusogenic inclusions, J. Infect. Dis. (2001) 184:879–884.
- [15] Griffiths P.C., Plater J.M., Martin T.C., Hughes S.L., Hughes K.J., Hewinson R.G., Dawson M., Epi-zootic bovine abortion in a dairy herd: characterization of a *Chlamydia psittaci* isolate and antibody response, Br. Vet. J. (1995) 151:683–693.
- [16] Hackstadt T., Scidmore-Carlson M.A., Shaw E.I., Fischer E.R., The *Chlamydia trachomatis* IncA protein is required for homotypic vesicle fusion, Cell. Microbiol. (1999) 1:119–130.
- [17] Henderson I.R., Owen P., Nataro J.P., Molecular switches—the ON and OFF of bacterial phase variation, Mol. Microbiol. (1999) 33:919–932.
- [18] Kato H., Takeuchi H., Oishi Y., Senpuku H., Shimura N., Hanada N., Nisizawa T., The immunogenicity of various peptide antigens inducing cross-reacting antibodies to a cell surface protein antigen of *Streptococcus mutans*, Oral Microbiol. Immunol. (1999) 14:213–219.
- [19] Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R., et al., Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*, J. Bacteriol. (2000) 182:2928–2936.
- [20] Ladefoged S.A., Molecular dissection of *Mycoplasma hominis*, APMIS Suppl. (2000) 97:1–45.
- [21] Lasa I., David V., Gouin E., Marchand J.B., Cossart P., The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator, Mol. Microbiol. (1995) 18:425–436.
- [22] Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramisse V., et al., A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*, BMC Microbiol. (2001) 1:2.
- [23] Lee C.K., Moulder J.W., Persistent infection of mouse fibroblasts (McCoy cells) with a trachoma strain of *Chlamydia trachomatis*, Infect. Immun. (1981) 32:822–829.
- [24] Longbottom D., Coulter L.J., Animal chlamydioses and zoonotic implications, J. Comp. Pathol. (2003) 128:217–244.
- [25] McClenaghan M., Herring A.J., Aitken I.D., Comparison of *Chlamydia psittaci* isolates by DNA restriction endonuclease analysis, Infect. Immun. (1984) 45:384–389.
- [26] McColl K.A., Martin R.W., Gleeson L.J., Handasyde K.A., Lee A.K., Chlamydia infection and infertility in the female koala (*Phascogaleos cinereus*), Vet. Rec. (1984) 115:655.
- [27] McNutt S.H., Waller E.F., Sporadic bovine encephalomyelitis (Buss disease), Cornell Vet. (1940) 30:437–448.
- [28] Moulder J.W., Interaction of chlamydiae and host cells in vitro, Microbiol. Rev. (1991) 55:143–190.
- [29] Moulder J.W., Levy N.J., Zeichner S.L., Lee C.K., Attachment defect in mouse fibroblasts (L cells) persistently infected with *Chlamydia psittaci*, Infect. Immun. (1981) 34:285–291.
- [30] Norton W.L., Storz J., Observations on sheep with polyarthritis produced by an agent of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group, Arthritis Rheum. (1967) 10:1–12.
- [31] Peters J., Wilson D.P., Myers G., Timms P., Bavoil P.M., Type III secretion à la Chlamydia, Trends Microbiol. (2007) 15:241–251.
- [32] Rekiki A., Bouakane A., Hammami S., El Idrissi A.H., Bernard F., Rodolakis A., Efficacy of live *Chlamydophila abortus* vaccine 1B in protecting mice placentas and fetuses against strains of *Chlamydophila pecorum* isolated from cases of abortion, Vet. Microbiol. (2004) 99:295–299.
- [33] Rockey D.D., Heinzen R.A., Hackstadt T., Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells, Mol. Microbiol. (1995) 15:617–626.
- [34] Rockey D.D., Rosquist J.L., Protein antigens of *Chlamydia psittaci* present in infected cells but not

- detected in the infectious elementary body, *Infect. Immun.* (1994) 62:106–112.
- [35] Rodolakis A., Abortive infection of mice inoculated intraperitoneally with *Chlamydia ovis*, *Ann. Rech. Vet.* (1976) 7:195–205.
- [36] Rodolakis A., Bernard F., Lantier F., Mouse models for evaluation of virulence of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants, *Res. Vet. Sci.* (1989) 46:34–39.
- [37] Rodolakis A., Bernard F., Souriau A., Layachi K., Buzoni-Gatel D., Relationship between virulence of *Chlamydia psittaci* strains and establishment of persistent infection of McCoy cells, *Vet. Microbiol.* (1989) 19:65–73.
- [38] Rodolakis A., Souriau A., Response of ewes to temperature-sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* (var ovis) obtained by NTG mutagenesis, *Ann. Rech. Vet.* (1983) 14:155–161.
- [39] Rodolakis A., Souriau A., Restriction endonuclease analysis of DNA from ruminant *Chlamydia psittaci* and its relation to mouse virulence, *Vet. Microbiol.* (1992) 31:263–271.
- [40] Salinas J., Souriau A., De Sa C., Andersen A.A., Rodolakis A., Serotype 2-specific antigens from ruminant strains of *Chlamydia pecorum* detected by monoclonal antibodies, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* (1996) 19:155–161.
- [41] Schorey J.S., Holsti M.A., Ratliff T.L., Allen P.M., Brown E.J., Characterization of the fibronectin-attachment protein of *Mycobacterium avium* reveals a fibronectin-binding motif conserved among mycobacteria, *Mol. Microbiol.* (1996) 21:321–329.
- [42] Scidmore M.A., Rockey D.D., Fischer E.R., Heinzen R.A., Hackstadt T., Vesicular interactions of the *Chlamydia trachomatis* inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry, *Infect. Immun.* (1996) 64:5366–5372.
- [43] Scidmore-Carlson M.A., Shaw E.I., Dooley C.A., Fischer E.R., Hackstadt T., Identification and characterization of a *Chlamydia trachomatis* early operon encoding four novel inclusion membrane proteins, *Mol. Microbiol.* (1999) 33:753–765.
- [44] Senyk G., Kerlan R., Stites D.P., Schanzlin D.J., Ostler H.B., Hanna L., et al., Cell-mediated and humoral immune responses to chlamydial antigens in guinea pigs infected ocularly with the agent of guinea pig inclusion conjunctivitis, *Infect. Immun.* (1981) 32:304–310.
- [45] Siarkou V., Lambropoulos A.F., Chrisafi S., Kotsis A., Papadopoulos O., Subspecies variation in Greek strains of *Chlamydia abortus*, *Vet. Microbiol.* (2002) 85:145–157.
- [46] Storz J., Superinfection of pregnant ewes latently infected with a psittacosis-lymphogranuloma agent, *Cornell Vet.* (1963) 53:469–480.
- [47] Suchland R.J., Rockey D.D., Bannantine J.P., Stamm W.E., Isolates of *Chlamydia trachomatis* that occupy nonfusogenic inclusions lack IncA, a protein localized to the inclusion membrane, *Infect. Immun.* (2000) 68:360–367.
- [48] Suchland R.J., Rockey D.D., Weeks S.K., Alzhanov D.T., Stamm W.E., Development of secondary inclusions in cells infected by *Chlamydia trachomatis*, *Infect. Immun.* (2005) 73:3954–3962.
- [49] van Belkum A., Scherer S., van Leeuwen W., Willemse D., van Alphen L., Verbrugh H., Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*, *Infect. Immun.* (1997) 65:5017–5027.
- [50] van Ham S.M., van Alphen L., Mooi F.R., van Putten J.P., Phase variation of *H. influenzae* fimbriae: transcriptional control of two divergent genes through a variable combined promoter region, *Cell* (1993) 73:1187–1196.
- [51] Weiser J.N., Love J.M., Moxon E.R., The molecular mechanism of phase variation of *H. influenzae* lipopolysaccharide, *Cell* (1989) 59:657–665.
- [52] Williamson M.P., The structure and function of proline-rich regions in proteins, *Biochem. J.* (1994) 297:249–260.
- [53] Wilton J.L., Scarman A.L., Walker M.J., Djordjevic S.P., Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Microbiology* (1998) 144:1931–1943.
- [54] Zhang N., Harrex A.L., Holland B.R., Fenton L.E., Cannon R.D., Schmid J., Sixty alleles of the ALS7 open reading frame in *Candida albicans*: ALS7 is a hypermutable contingency locus, *Genome Res.* (2003) 13:2005–2017.
- [55] Zhao X., Pujol C., Soll D.R., Hoyer L.L., Allelic variation in the contiguous loci encoding *Candida albicans* ALS5, ALS1 and ALS9, *Microbiology* (2003) 149:2947–2960.

Article 3. Identification phylogénétique préliminaire des souches virulentes de *Chlamydophila pecorum*

L'existence des différents motifs de la CTR dans *incA* a permis de classer 7 des 8 souches pathogènes de *C. pecorum*, isolées des différents cas cliniques, dans le même groupe. Dans le but d'identifier d'autres marqueurs liés à la virulence, un système de MVLST (multi virulence locus sequence typing) a été développé en utilisant 19 souches de *C. pecorum*.

Douze gènes ont été analysés : 6 gènes de virulence (*ompA*, *incA*, *incB*, *incC*, *mip* et *copN*), 5 gènes de ménage (*recA*, *hemD*, *aroC*, *efp* et *gap*), et un ORF663 codant une protéine hypothétique qui inclut une séquence répétée codante (CTR) de 15 nucléotides.

Le système MVLST a permis de regrouper 6 des 8 souches pathogènes dans un même groupe. Il est en général plus discriminant pour *C. pecorum* que le système MLST qui est basé seulement sur des gènes de ménage.

Le gène *ompA* était le gène le plus polymorphe et l'arbre phylogénétique basé seulement sur ses séquences a classé les souches en 4 groupes avec des valeurs de bootstrap élevées.

Le nombre de CTRs (riche en sérine, proline et lysine) de l'ORF663 des souches pathogènes était généralement inférieur à celui trouvé dans les souches intestinales non-pathogènes. Le système MVLST semble être une méthode performante pour identifier les souches virulentes de *C. pecorum*. Les gènes *ompA*, *incA* et l'ORF663 semblent être des bons marqueurs moléculaires pour les études épidémiologiques de *C. pecorum*.

Les résultats de cette étude sont rapportés dans l'article ci-joint

« Preliminary phylogenetic identification of virulent *Chlamydophila pecorum* strains »

qui a été publié dans *Infection, Genetic and Evolution* en 2008.



Preliminary phylogenetic identification of virulent *Chlamydomophila pecorum* strains

Khalil Yousef Mohamad^a, Sylvie M. Roche^a, Garry Myers^b, Patrik M. Bavoil^c, Karine Laroucau^d, Simone Magnino^e, Sylvie Laurent^a, Denis Rasschaert^a, Annie Rodolakis^{a,*}

^a INRA, UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France

^b University of Maryland, Institute for Genome Sciences, Baltimore, MD 21201, USA

^c University of Maryland, Department of Biomedical Sciences, 650 West Baltimore Street, Baltimore, MD 21201, USA

^d Bacterial Zoonoses Unit, French Food Safety Agency (AFSSA), 94706 Maisons-Alfort Cedex, France

^e Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", National Reference Laboratory for Animal Chlamydioses, Sezione Diagnostica di Pavia, Strada Campeggi 61, 27100 Pavia, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2008

Received in revised form 18 June 2008

Accepted 19 June 2008

Available online 29 July 2008

Keywords:

Chlamydomophila pecorum

Pathogenic and non-pathogenic strains

MVLT

ORF663

Typing

Phylogenesis

ABSTRACT

Chlamydomophila pecorum is an obligate intracellular bacterium associated with different pathological conditions in ruminants, swine and koala, which is also found in the intestine of asymptomatic animals. A multi-virulence locus sequence typing (MVLT) system was developed using 19 *C. pecorum* strains (8 pathogenic and 11 non-pathogenic intestinal strains) isolated from ruminants of different geographical origins. To evaluate the ability of MVLT to distinguish the pathogenic from the non-pathogenic strains of *C. pecorum*, the sequences of 12 genes were analysed: 6 potential virulence genes (*ompA*, *incA*, *incB*, *incC*, *mip* and *copN*), 5 housekeeping genes (*recA*, *hemD*, *aroC*, *efp*, *gap*), and the ORF663 gene encoding a hypothetical protein (HP) that includes a variant 15-nucleotides coding tandem repeat (CTR). MVLT provided high discriminatory power (100%) in allowing to distinguish 6 of 8 pathogenic strains in a single group, and overall more discriminatory than MLST targeting housekeeping genes. *ompA* was the most polymorphic gene and the phylogenetic tree based only on its sequence differentiated 4 groups with high bootstrap values. The number of CTRs (rich in serine, proline and lysine) in ORF663 detected in the pathogenic strains was generally lower than that found in the intestinal strains. MVLT appears to be a promising method for the differential identification of virulent *C. pecorum* strains, and the *ompA*, *incA* and ORF663 genes appear to be good molecular markers for further epidemiological investigation of *C. pecorum*.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chlamydiae are obligate intracellular organisms that develop inside eukaryotic cells within membrane-bound vacuoles termed inclusions with a unique biphasic developmental cycle alternating between an extracellular metabolically inert form (elementary body, EB), and an intracellular metabolically active replicating form (reticulate body, RB) (Moulder, 1991).

The family Chlamydiaceae is divided into two genera, *Chlamydia* and *Chlamydomophila*. The genus *Chlamydia* includes 3 species: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum* and *Chlamydia suis*. The genus *Chlamydomophila* comprises 6 species: *Chlamydomophila psittaci*, *Chlamydomophila abortus*, *Chlamydomophila felis*, *Chlamydomophila caviae*, *Chlamydomophila pneumoniae* and *Chlamydomophila pecorum* (Everett et al., 1999).

Chlamydial strains such as *C. trachomatis* strains (Stephens et al., 1982) have been classified by serological typing using monoclonal antibodies that recognize epitope differences on the surface-exposed major outer membrane protein (MOMP) and, later, by nucleotide sequence analysis of *ompA* (outer membrane protein A), the MOMP coding gene (Kaltenboeck et al., 1993; Stephens et al., 1987). However, the classification schemes are not congruent with groupings based on tissue tropisms and pathobiological profiles (Stothard et al., 1998). With full genome sequences for Chlamydial species now available, it has become possible to investigate several aspects of the Chlamydial biology, including the evolutionary basis of its pathobiology by MultiLocus Sequence Typing (MLST) (Brunelle and Sensabaugh, 2006; Klint et al., 2007; Pannekoek et al., 2008). MLST is based on the sequence analysis of selected housekeeping (HK) genes and is becoming the method of choice for determining the global epidemiology of bacterial pathogens (Maiden, 2006). As an example, the combined analysis of housekeeping genes with virulent genes may allow a good discrimination among *Salmonella* strains (Tankouo-Sandjong et al., 2007).

* Corresponding author. Tel.: +33 2 47 42 76 34; fax: +33 2 47 42 77 79.
E-mail address: khalilyoussef@hotmail.com (A. Rodolakis).

MLST data have been exploited in epidemiological investigations and in studies of the population biology, the pathogenicity, and the evolution of bacteria (Maiden, 2006). MLST studies have also led to a better understanding of the genetic relatedness of strains within a bacterial species and have identified the relative evolutionary importance of mutations and lateral transfer events (Guttman and Dykhuizen, 1994).

C. pecorum strains have been isolated in several countries from ruminants, swine and koala. This Chlamydial species is associated with conjunctivitis, encephalomyelitis, enteritis, pneumonia, polyarthritis, abortion, reproductive and urinary tract diseases (Jackson et al., 1999; Longbottom and Coulter, 2003; McColl et al., 1984), but is also commonly found in the intestine of animals without any clinical symptoms (non-pathogenic intestinal strains) (Rodolakis et al., 1989a; Spears and Storz, 1979). *C. pecorum* may include many antigenic and genomic variants (Denamur et al., 1991; Rodolakis and Souriau, 1992; Salinas et al., 1996). Unfortunately, a typing method that differentiates pathogenic from non-pathogenic strains of *C. pecorum* has not been available to date. We therefore hypothesized that a multi-virulence locus sequence typing (MVLST) system would allow to discriminate between pathogenic and non-pathogenic strains of *C. pecorum*.

2. Materials and methods

2.1. Chlamydial strains

Nineteen strains of *C. pecorum* from ruminants were used in this study (see list in Table 1). All strains were propagated in the yolk sac of chicken embryos and stored at -70°C until examination, as previously described (Rodolakis, 1976).

2.2. Selection of target genes

In total, 12 genes were selected for analysis. Six of these are potential virulence genes and one encodes a hypothetical protein. Details are given hereafter:

- *ompA* is one of the most polymorphic Chlamydial genes: it encodes the major outer membrane protein (MOMP) which is the main target of the host immune response against chlamydiae (Fitch et al., 1993);
- *incA*, *incB* and *incC* genes encode inclusion membrane proteins. These proteins are engaged in interactions between the Chlamydial inclusion and cytosolic components (Scidmore et al., 1996). *incA* gene was sequenced previously in the course of this study (Yousef Mohamad et al., 2008);

- *copN* encodes a type III secretion effector protein. As in other Gram-negative pathogens, the type III secretion mechanism is used to target virulence factors directly to the host cell cytoplasm and is essential for full virulence (Fields and Hackstadt, 2000);
- *mip* encodes a macrophage infectivity potentiator (Mip) lipoprotein. Mip is a virulence factor necessary for optimal initiation of intracellular *Legionella* infections (Cianciotto et al., 1990). Mip of *C. trachomatis* has also been shown to have peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase (PPIase) activity that is inhibitable upon binding to the immunosuppressive drug FK506 or rapamycin protein. Mip may be important for optimal initiation of Chlamydial infections (Lundemose et al., 1993a,b);
- ORF663 including a 15-nucleotide variant coding tandem repeat (CTR) encodes a hypothetical protein (HP). This type of CTR appears to be involved in the virulence of bacteria (Lasa et al., 1995; Schorey et al., 1996).

In addition, 5 housekeeping genes (*gap*, *hemD*, *aroC*, *recA* and *efp*) were selected for representing the whole genome of *C. pecorum* (Fig. 1). Such genes are generally used for subtyping bacterial strains by MLST. *gap* was previously used for *C. trachomatis* (Brunelle and Sensabaugh, 2006), while *hemD* and *aroC* were used for *Salmonella enterica* (Harbottle et al., 2006), and *recA* and *efp* for *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mayor et al., 2008).

2.3. PCR conditions and sequencing

Genomic DNA was extracted from the *Chlamydia* strains using the tissue protocol of the DNeasy Tissue Kit (QIAGEN S.A., Courtaboeuf, France). PCR was performed according to the GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, France) protocol in a final volume of 50 μL , and consisted of DNA denaturation at 94°C for 5 min followed by 30 cycles of amplification in a Biometra UNO II thermoblock. Each cycle consisted of a denaturation step at 94°C for 30 s, an annealing step at 55°C for 45 s, an extension step at 72°C for 1 min, followed by a final chain elongation at 72°C for 7 min. The primer pairs derived from the sequence of *C. pecorum* E58 (unpublished) yielded amplified genomic regions between 420 and 1182 bp.

The PCR products were sequenced by automated sequencing (Genome Express) for all genes (see list in Table 2).

2.4. Sequence alignment and analysis

The freeware sequence tool BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) was used to construct sequence alignments. The software package DnaSP 4.0 (Rozas et al., 2003)

Table 1
Strains used in this study

<i>C. pecorum</i>	Geographic origin	Host	Pathology	Reference
M14	Morocco	Goat	Abortion	Rekiki et al. (2004)
AKT	Tunisia	Sheep	Abortion	^a
AB10	France	Sheep	Abortion	Rodolakis et al. (1989a)
VB2	France	Sheep	Orchitis	^a
LW679	USA	Sheep	Arthritis	Norton and Storz (1967)
SBE	England	Cattle	Encephalomyelitis	^b
E58	USA	Cattle	Encephalomyelitis	McNutt and Waller (1940)
824	Scotland	Sheep	Conjunctivitis	McClenaghan et al. (1984)
BE53	England	Cattle	No clinical signs (faecal carriage)	^b
iB1, iB2, iB3, iB4, iB5	France	Sheep	No clinical signs (faecal carriage)	Rodolakis et al. (1989a)
R69, W73	Ireland	Sheep	No clinical signs (faecal carriage)	^c
iC2, iC3, iC4	France	Goat	No clinical signs (faecal carriage)	Rodolakis et al. (1989a)

^a Isolated at INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, Centre de Recherche de Tours, France.

^b Isolated by M. Dawson, Virology Department, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK.

^c Isolated by M.S. McNulty, Veterinary Research laboratory, Stormont, Belfast, Ulster.

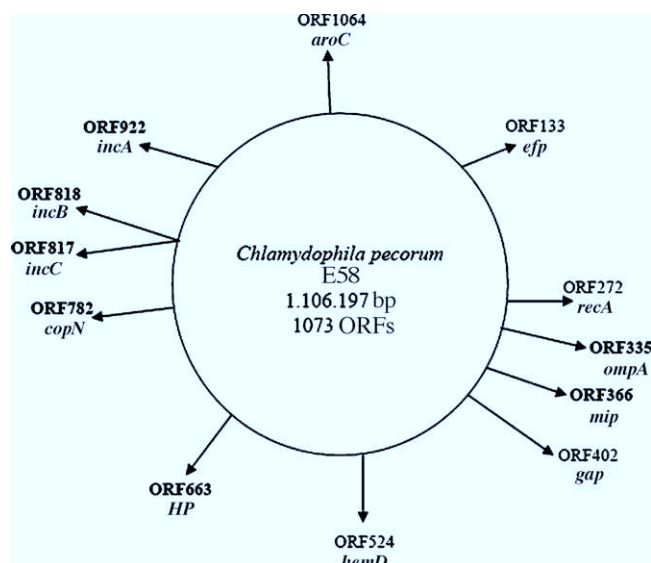


Fig. 1. Approximate genomic location of the 12 genes used for MVLST.

was used to analyse the data and to calculate the number of polymorphic sites and the minimum number of recombination events (Rm). The number of synonymous and non-synonymous mutations and the dN/dS ratio of non-synonymous to synonymous sites were calculated using DnaSP 4.0 software and the Nei-Gojobori method using the known codon usage of *C. pecorum* genes (Nei and Gojobori, 1986). A phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) method with the software MEGA4 (Tamura et al., 2007) including *C. abortus* S26/3 as out-group (genome available in the GenBank database at <http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=ntca04>). In order to compare the discriminatory power for each individual gene, the discrimination index (D.I.) was calculated based on the number of allelic types [j], the number of strains belonging to each type [n_j],

and the total number of strains analyzed [N], as previously described (Hunter and Gaston, 1988), with the following equation which implies that higher D.I. values indicate higher discriminatory power:

$$D.I. = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

2.5. Nucleotide sequence accession numbers

DNA sequences of the gene fragments were deposited in GenBank under accession numbers from EU684754 to EU684951.

3. Results

3.1. Subtyping by MVLST

The 12 genes chosen for MVLST are well distributed across the *C. pecorum* genome and represent various genomic regions (Fig. 1). Allele numbers and sequence types (ST) based on the combination of allele numbers are listed in Table 3. A total of 6401–7379 bp were analysed for each strain. Overall, 18 ST were obtained from the 19 samples analysed, since the 2 encephalomyelitis strains (SBE and E58) from different geographic origins were characterized by the same MVLST sequence type (ST 1). Interestingly, 16 ST were obtained when using only the *incA* and ORF663 sequences for analysis. These two genes also showed the highest numbers of alleles.

The D.I. values for the 12 genes varied from 0 for *aroC* to 0.98 for *incA* and ORF663 (Table 4).

The gene with the most polymorphic sites was *ompA* with 310 sites, which was more than the sum of the sites of all the other genes taken together (243 sites). *mip* was the least polymorphic among the virulence genes. On the other hand, *hemD* had more polymorphic sites than the other four housekeeping genes. Generally, ORF663 and the two virulence genes *ompA* and *incA*

Table 2
Genome regions sequenced

Gene	Annotation	Primer	Sequence (5'–3')
Potential virulence genes			
<i>ompA</i>	Outer membrane protein (MOMP)	ompA-F ompA-R	CTTGAACGTAAGTGCCGCCAGA AGAAACCAGAACATTCTGTCTCT
<i>incA</i> ^a	Inclusion membrane protein A	inca-s-F inca-s-R	TATCGTAATACCAACCACT GTGTGAGATGGCTCTTTATG
<i>incB</i>	Inclusion membrane protein B	incb-F incb-R	TGGTTACCCCTTTTCCGAAC GGACGTCCAGAACTCACTACAA
<i>incC</i>	Inclusion membrane protein C	incc-F incc-R	TGGTATCTTCTGGGAGTGGT TAATATCAAGGAAGCTGGGCCT
<i>copN</i>	<i>Chlamydia</i> outer protein N	copn-F copn-R	GCAAGTAAATTAACGATCCTGC GGCCTTCAGTTTAAAGCTGTC
<i>mip</i>	Macrophage infectivity potentiator lipoprotein	mip-F mip-R	TGGTCATTACTTGCCAGACA ATAGGCAAGATCAGGGTGGA
ORF663	Hypothetical protein (HP)	663-F 663-R	AAACAACTGCACCGCTCTCT GAAGGACTTTCTGGGGGAAG
Housekeeping genes			
<i>efp</i>	Translation elongation factor P	efp-F efp-R	GACAGCTCCCCCTATGAAAA ATAGCTGCGGAGGCAATC
<i>recA</i>	Recombinase A	reca-F reca-R	ACCACATTAGCGACCCACAT GGGCGAGTTTGTITTTAGCA
<i>gap</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	gap-F gap-R	TGGAAAGAGCTCGGTGTAGA TTTGCTAACCTCACGTAAGA
<i>hemD</i>	Uroporphyrinogen-III synthase	hemd-F hemd-R	CTTCAGCTTGTTCCCTTTGC TCTGGGGAAGCTGAGGAAAT
<i>aroC</i>	Chorismate synthase	aroc-F aroc-R	GACAGCTCCCCCTATGAAAA ATAGCTGCGGAGGCAATC

^a (Yousef Mohamad et al., 2008).

Table 3

Sequence types (ST) and corresponding allele numbers

Strain	ST	<i>incA</i>	<i>incB</i>	<i>incC</i>	<i>copN</i>	<i>mip</i>	<i>ompA</i>	ORF 663	<i>hemD</i>	<i>gap</i>	<i>recA</i>	<i>efp</i>	<i>aroC</i>
E58	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SBE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
AKT	3	2	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1
VB2	4	3	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1
M14	5	4	2	1	2	1	2	5	2	2	2	1	1
LW679	6	5	3	1	3	1	1	6	2	3	3	1	1
824	7	6	4	2	4	2	3	7	3	4	1	1	1
BE53	8	7	5	3	5	3	4	8	3	3	1	1	1
IB1	9	8	3	4	6	2	5	9	4	3	1	2	1
IB2	10	9	6	1	7	1	6	10	2	3	1	3	1
IB3	11	10	7	1	2	4	7	11	5	3	1	1	1
IB4	12	11	8	5	4	1	8	12	6	3	4	1	1
IB5	13	12	4	1	8	1	9	13	3	3	4	1	1
W73	14	13	4	2	9	1	10	14	2	3	1	1	1
R69	15	14	4	2	9	1	10	14	2	3	1	1	1
IC2	16	15	3	1	6	1	11	15	4	3	1	1	1
IC3	17	16	3	1	6	1	11	16	4	3	1	1	1
IC4	18	15	3	1	6	1	12	16	4	3	1	1	1

Table 4

Descriptive analysis of the nucleotide sequence for the 12 selected genes

Gene	Size analysed	Allele number	Number of polymorphic sites	D.I. ^a	Number of synonymous mutations	Number of non-synonymous mutations	dN/dS ratio ^b	Rm ^c
<i>incA</i>	945–1098	16	121	0.98	16	89	2.333	12
<i>incB</i>	453	8	17	0.85	2	15	2.167	2
<i>incC</i>	507	5	6	0.54	4	2	0.096	0
<i>copN</i>	420	9	9	0.89	4	5	0.289	2
<i>mip</i>	435	4	5	0.38	0	5		0
<i>ompA</i>	1167–1182	12	310	0.90	181	63	0.150	64
ORF 663	244–1054	16	71	0.98	29	38	0.330	15
<i>hemD</i>	450	6	5	0.83	2	3	0.750	0
<i>gap</i>	424	4	4	0.56	1	3	1.584	0
<i>recA</i>	459	4	3	0.38	3	0		0
<i>efp</i>	462	3	2	0.20	1	1	0.000	0
<i>aroC</i>	435	1	0	0.00	0	0		0

^a D.I., Discrimination index.^b dN/dS, Ratio of the number of non-synonymous (dN) to synonymous (dS) substitutions per site. This was not calculated when the number of either synonymous or non-synonymous mutations was zero.^c Rm, Minimum number of recombination events.

showed a higher level of discriminatory power than the other virulence genes and all five housekeeping genes (Table 4).

There were more non-synonymous than synonymous mutations in 7 of the genes, and this was very clear with *incA* and *incB* genes, where the number of non-synonymous mutations was about 6 times higher than that of synonymous mutations. By contrast, *incC* and *ompA* had 2 or nearly 3 times fewer non-synonymous than synonymous mutations, respectively (Table 4).

No recombination event was observed in any housekeeping genes nor in the *incC* and *mip* genes. However, evidence for 64 recombination events was obtained for *ompA* with fewer obtained for ORF663, *incA*, *incB* and *copN* (Table 4).

3.2. Phylogenetic tree

The phylogenetic tree based on the 12 MVLST gene fragments, revealed three groups (G1, G2 and G3) with high bootstrap values of 100, 77 and 97%, respectively (Fig. 2). Group 1 consisted of 6 pathogenic strains, namely 2 encephalomyelitis strains isolated in the US (E58) and UK (SBE), 2 abortive strains from France (AB10) and Tunisia (AKT), 1 orchitis strain (VB2) from France and 1 arthritis strain (LW679) from the US. Group 2 consisted of 3 ovine intestinal strains, 2 from Ireland (W73, R69) and 1 from France

(iB5). Group 3 consisted of 3 caprine intestinal strains from France (iC2, iC3, iC4).

The phylogenetic tree based only on the sequence of the *ompA* gene allowed to distinguish 4 groups, three of which were the same as in the previous analysis but with higher bootstrap values of 100, 88 and 100% for G1, G2 and G3, respectively (Fig. 3). In addition, the fourth group G4 with bootstrap value of 95% consisted of 2 ovine intestinal strains from France (iB1, iB2), one bovine intestinal strain from the UK (BE53) and one ovine conjunctivitis strain from Scotland (824). The remaining strains could not be grouped in spite of the high homology between the caprine abortive strain from Morocco (M14) and the ovine intestinal strain from France (iB3).

3.3. Characterization of ORF663 CTRs

The CTR was found in all examined *C. pecorum* strains, but was not found in the genome of any other Chlamydial species previously sequenced (<http://tigrblast.tigr.org/cmr-blast/>). The number of repetitions was lower for the pathogenic *C. pecorum* strains (14–45 repeats) than that for the intestinal strains (53–68 repeats), except for the bovine intestinal strain BE53 from the UK (20 repeats) (Table 5). The CTRs were generally rich in serine (S) (30%), proline (P) (20%) and lysine (K) (20%); in addition, glutamic

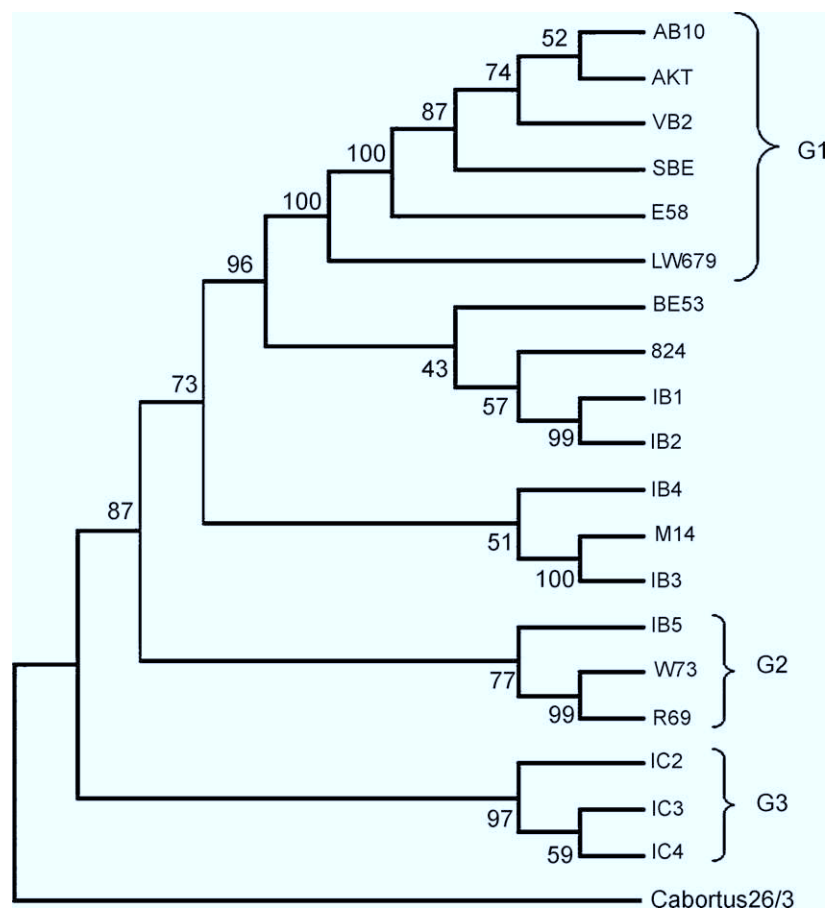


Fig. 2. Neighbor-joining tree of 19 *C. pecorum* strains based on the number of nucleotide differences in the 12 MVLST gene fragments analysed. Bootstrap values (500 replications) are indicated at the interior branches. The bar represents 5% evolutionary sequence divergence. Grouping (G1, G2 and G3) for each strain is included.

acid (E) and leucin (L) were also represented. The repeated motifs observed were generally of the type KELSP, KESSP, KEPLP, KESSS, KEPSS and KKPSP.

4. Discussion

In order to evaluate the ability of MVLST to distinguish the pathogenic from the non-pathogenic strains, 12 genes of 19 *C. pecorum* strains (8 pathogenic and 11 intestinal) isolated from ruminants in different countries were selected for analysis. Six out of 8 pathogenic strains of different clinical and geographical origins were found to cluster in a single group. These results were not obtained in other studies where typing of *C. pecorum* strains was carried out using monoclonal antibodies in indirect MIF (Salinas et al., 1996) or by analysing AluI restriction patterns of the *ompA* gene (Denamur et al., 1991). The present multilocus analysis of virulence-associated genes was found to be more discriminating than a MLST analysis of housekeeping genes, as previously described for other bacteria such as *Clostridium* (Lemee et al., 2005) and *Salmonella* (Tankouo-Sandjong et al., 2007), and allowed to discriminate between pathogenic and intestinal strains of *C. pecorum*.

In this MVLST scheme, 18 sequence types (ST) were identified and most of these (17) were represented by a single strain, suggesting a high level of genetic diversity among the strains, especially among ovine intestinal strains isolated in France. This clearly appeared in the phylogenetic tree based on the analysis of all genes. The phylogenetic trees based only on virulence gene sequences or on all genes with a discriminatory power above 0.5

were also examined but results of these analyses did not show a significant difference with the analysis of all genes (not shown). Four ovine intestinal strains isolated from France (iB1, iB2, iB3 and iB4) could not be classified in spite of the high homology found between iB1 and iB2. Moreover, BE53 was the only bovine intestinal strain, M14 the only caprine abortive strain and 824 the only ovine conjunctivitis strain used in this study. Thus, this MVLST scheme would benefit from analysis of additional isolates. This may be difficult for species with low virulence strains such as *C. pecorum* for which isolation is a lower priority than for other Chlamydial species such as *C. psittaci* and *C. abortus*.

A phylogenetic tree based on *ompA* showed a higher level of resolution than that obtained using the sequence of all genes. This result is not surprising because the number of polymorphic sites in the *ompA* gene (310 sites) was much higher than the total number of polymorphic sites of all the other genes combined (243 sites). This result has been previously reported also for *C. trachomatis* (Brunelle and Sensabaugh, 2006). In addition, no recombination event was observed in any of the selected housekeeping gene as previously described for *C. trachomatis* (Brunelle and Sensabaugh, 2006). However, evidence for 64 recombination events was obtained for *ompA*, 15 for ORF663 and 12 for *incA*, which means that sequences from these genes can be exchanged between *C. pecorum* strains, as previously observed for *ompA* of *C. trachomatis* (Brunelle and Sensabaugh, 2006; Brunham et al., 1994). Our data are also consistent with a number of studies that have shown that recombination plays an important role in the diversification of genes encoding surface proteins in several pathogens, including *Listeria monocytogenes* (Tsai et al., 2006) and *Neisseria meningitidis*

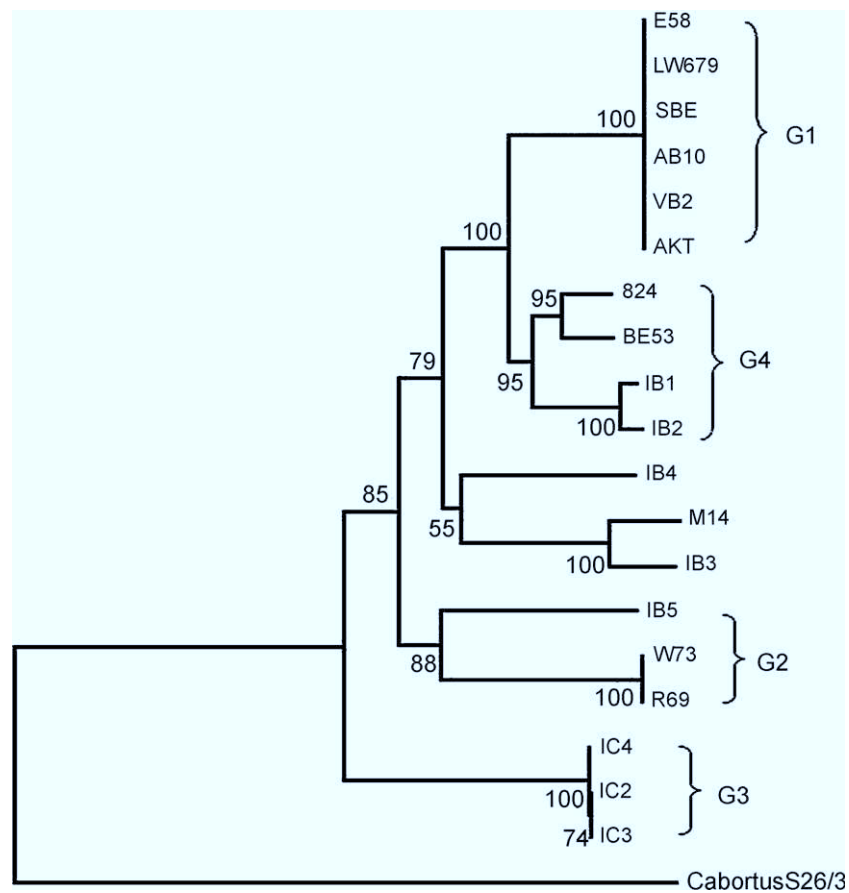


Fig. 3. Neighbor-joining tree of 19 *C. pecorum* isolates based on the number of nucleotide differences in the *ompA* gene. Bootstrap values (500 replications) are indicated at the interior branches. The bar represents 5% evolutionary sequence divergence. Grouping (G1, G2, G3 and G4) for each strain is included.

Table 5

Number of CTRs in ORF663 for 19 *C. pecorum* strains

Strain	M14	BE53	E58	SBE	AB10	AKT	VB2	824	LW679	IC2
Number of repetitions	14	20	22	22	22	24	24	41	45	52
Strain	IB3	IB4	W73	R69	IC3	IC4	IB5	IB1	IB2	
Number of repetitions	53	53	58	58	59	60	62	65	68	

(Andrews and Gojobori, 2004). The number of polymorphic sites for the housekeeping genes was small as already found in *C. trachomatis* (Brunelle and Sensabaugh, 2006), except for *ompA*, *incA* and ORF663, that all displayed highly polymorphic sites. This suggests that the hypothetical protein corresponding to ORF663 is important in the biology of *C. pecorum*, as previously described for MOMP (Fitch et al., 1993) and the IncA protein (Rockey et al., 1995). For *C. pecorum*, it seems that analysis of *ompA* (the most polymorphic gene) would be initially sufficient to discriminate among strains. The combination of the analysis of *ompA* with *incA* and ORF663 (the 2 genes with variant CTRs) would be more informative and relatively inexpensive.

The number of synonymous mutations for 3 genes exceeded the number of non-synonymous mutations, as already shown by the low dN/dS ratios found in different bacteria, such as *C. trachomatis* (Brunelle and Sensabaugh, 2006; Pannekoek et al., 2008), *Bacillus cereus* (Helgason et al., 2004) and *L. monocytogenes* (Chen et al., 2007). This is remarkable in the case of the *ompA* sequence investigated in this study, in that most of the observed variability

was selectively neutral at the protein level (Helgason et al., 2004). On the other hand, the number of non-synonymous mutations for *incA* and *incB* was about 6 times higher than the number of synonymous mutations. This can be explained by selective pressure on variability due to immune evasion in host cell. *C. pecorum* is indeed often found in the intestine of healthy animals where it is able to adapt and persist in the host cell without destroying it, owing to its slow growth rate (Lee and Moulder, 1981; Moulder et al., 1981; Rodolakis et al., 1989b).

During the course of these studies it became apparent that the number of CTRs in ORF663 was clearly different in the pathogenic and non-pathogenic strains except for the bovine intestinal strains from UK (BE53). There were fewer CTRs for the pathogenic strains than for the intestinal strains. However, in order to confirm this correlation, it will be necessary to examine a higher number of samples. A correlation between the number of CTR and pathogenicity was previously described in *Streptococcus* sp., where deletion in the repeat region of the exposed surface alpha C protein enhanced the pathogenicity of group B Streptococci by decreasing

the antigen's size (conformational) and consequent loss of antibody binding to the surface of the bacteria (Gravekamp et al., 1998). The CTR of ORF663 is the second to be discovered among *C. pecorum* strains. The first was discovered in *incA* encoding inclusion membrane protein A (Yousef Mohamad et al., 2008), involved in the interaction between the inclusion and components of the host cell (Scidmore et al., 1996). The CTR of ORF663 was not found in the previously sequenced genomes of other Chlamydial species, suggesting it is specific to *C. pecorum*. The CTR of ORF663 is rich in serine (>30%), proline and lysine. Serine-rich repeat (Srr) proteins in *Staphylococcus* are known to localize on the bacterial surface and to have adhesive functions (Seifert et al., 2006). Thus, the CTR of ORF663 may also have a role in adherence for *C. pecorum*. These characteristics suggest that ORF663 may be involved in the virulence of *C. pecorum*.

In conclusion, MVLST appears to be a promising method for the differential identification of virulent *C. pecorum* strains. Application of this MVLST scheme to additional *C. pecorum* strains will allow to profile the molecular epidemiology and evolution of this bacterial species. In particular, the *ompA*, *incA* and ORF663 genes appear to be good molecular markers for future epidemiological investigations of *C. pecorum*.

Acknowledgement

This work was supported by AIP 297 AFSSA/INRA grant. PM Bavoil and GSA Myers were supported by NIH grant # RO1 A151472. We thank Olivier Grepinet from INRA-Tours, France, for helpful advice.

References

- Andrews, T.D., Gojobori, T., 2004. Strong positive selection and recombination drive the antigenic variation of the Pile protein of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Genetics* 166, 25–32.
- Brunelle, B.W., Sensabaugh, G.F., 2006. The *ompA* gene in *Chlamydia trachomatis* differs in phylogeny and rate of evolution from other regions of the genome. *Infect. Immun.* 74, 578–585.
- Brunham, R., Yang, C., Maclean, I., Kimani, J., Maitha, G., Plummer, F., 1994. *Chlamydia trachomatis* from individuals in a sexually transmitted disease core group exhibit frequent sequence variation in the major outer membrane protein (*omp1*) gene. *J. Clin. Invest.* 94, 458–463.
- Chen, Y., Zhang, W., Knabel, S.J., 2007. Multi-virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 835–846.
- Cianciotto, N.P., Eisenstein, B.I., Mody, C.H., Engleberg, N.C., 1990. A mutation in the *mip* gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *J. Infect. Dis.* 162, 121–126.
- Denamur, E., Sayada, C., Souriau, A., Orfila, J., Rodolakis, A., Elion, J., 1991. Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2525–2530.
- Everett, K.D., Bush, R.M., Andersen, A.A., 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (Pt 2), 415–440.
- Fields, K.A., Hackstadt, T., 2000. Evidence for the secretion of *Chlamydia trachomatis* *CopN* by a type III secretion mechanism. *Mol. Microbiol.* 38, 1048–1060.
- Fitch, W.M., Peterson, E.M., de la Maza, L.M., 1993. Phylogenetic analysis of the outer-membrane-protein genes of *Chlamydiae*, and its implication for vaccine development. *Mol. Biol. Evol.* 10, 892–913.
- Gravekamp, C., Rosner, B., Madoff, L.C., 1998. Deletion of repeats in the alpha C protein enhances the pathogenicity of group B *Streptococci* in immune mice. *Infect. Immun.* 66, 4347–4354.
- Guttman, D.S., Dykhuizen, D.E., 1994. Clonal divergence in *Escherichia coli* as a result of recombination, not mutation. *Science* 266, 1380–1383.
- Harbottle, H., White, D.G., McDermott, P.F., Walker, R.D., Zhao, S., 2006. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2449–2457.
- Helgason, E., Tourasse, N.J., Meisal, R., Caugant, D.A., Kolsto, A.B., 2004. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 191–201.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–2466.
- Jackson, M., White, N., Giffard, P., Timms, P., 1999. Epizootiology of *Chlamydia* infections in two free-range koala populations. *Vet. Microbiol.* 65, 255–264.
- Kaltenboeck, B., Kousoulas, K.G., Storz, J., 1993. Structures of and allelic diversity among the major outer membrane protein (*ompA*) genes of the four *Chlamydial* species. *J. Bacteriol.* 175, 487–502.
- Klint, M., Fuxelius, H.H., Goldkuhl, R.R., Skarin, H., Rutemark, C., Andersson, S.G., Persson, K., Herrmann, B., 2007. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.*
- Lasa, I., David, V., Gouin, E., Marchand, J.B., Cossart, P., 1995. The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator. *Mol. Microbiol.* 18, 425–436.
- Lee, C.K., Moulder, J.W., 1981. Persistent infection of mouse fibroblasts (McCoy cells) with a trachoma strain of *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 32, 822–829.
- Lemee, L., Bourgeois, I., Ruffin, E., Collignon, A., Lemeland, J.F., Pons, J.L., 2005. Multilocus sequence analysis and comparative evolution of virulence-associated genes and housekeeping genes of *Clostridium difficile*. *Microbiology* 151, 3171–3180.
- Longbottom, D., Coulter, L.J., 2003. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J. Comp. Pathol.* 128, 217–244.
- Lundemose, A.G., Kay, J.E., Pearce, J.H., 1993a. *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein has peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity that is inhibited by FK506 and rapamycin and is implicated in initiation of *Chlamydial* infection. *Mol. Microbiol.* 7, 777–783.
- Lundemose, A.G., Rouch, D.A., Penn, C.W., Pearce, J.H., 1993b. The *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein is a lipoprotein. *J. Bacteriol.* 175, 3669–3671.
- Maiden, M.C., 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 561–588.
- Mayor, D., Jores, J., Korczak, B.M., Kuhnert, P., 2008. Multilocus sequence typing (MLST) of *Mycoplasma hyopneumoniae*: a diverse pathogen with limited clonality. *Vet. Microbiol.* 127, 63–72.
- McClenaghan, M., Herring, A.J., Aitken, I.D., 1984. Comparison of *Chlamydia psittaci* isolates by DNA restriction endonuclease analysis. *Infect. Immun.* 45, 384–389.
- McColl, K.A., Martin, R.W., Gleeson, L.J., Handasyde, K.A., Lee, A.K., 1984. *Chlamydia* infection and infertility in the female koala (*Phascogale cinereus*). *Vet. Rec.* 115, 655.
- McNutt, S.H., Waller, E.F., 1940. Sporadic bovine encephalomyelitis (Buss disease). *Cornell. Vet.* 30, 437–448.
- Moulder, J.W., 1991. Interaction of *chlamydiae* and host cells in vitro. *Microbiol. Rev.* 55, 143–190.
- Moulder, J.W., Levy, N.J., Zeichner, S.L., Lee, C.K., 1981. Attachment defect in mouse fibroblasts (L cells) persistently infected with *Chlamydia psittaci*. *Infect. Immun.* 34, 285–291.
- Nei, M., Gojobori, T., 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3, 418–426.
- Norton, W.L., Storz, J., 1967. Observations on sheep with polyarthritis produced by an agent of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group. *Arthritis Rheum.* 10, 1–12.
- Pannekoek, Y., Morelli, G., Kusecek, B., Morre, S.A., Ossewaarde, J.M., Langerak, A.A., van der Ende, A., 2008. Multi locus sequence typing of *Chlamydiales*: clonal groupings within the obligate intracellular bacteria *Chlamydia trachomatis*. *BMC Microbiol.* 8, 42.
- Rekiki, A., Bouakane, A., Hammami, S., El Idrissi, A.H., Bernard, F., Rodolakis, A., 2004. Efficacy of live *Chlamydomydia abortus* vaccine 1B in protecting mice placentas and foetuses against strains of *Chlamydomydia pecorum* isolated from cases of abortion. *Vet. Microbiol.* 99, 295–299.
- Rockey, D.D., Heinzen, R.A., Hackstadt, T., 1995. Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Mol. Microbiol.* 15, 617–626.
- Rodolakis, A., 1976. Abortive infection of mice inoculated intraperitoneally with *Chlamydia ovis*. *Ann. Rech. Vet.* 7, 195–205.
- Rodolakis, A., Souriau, A., 1992. Restriction endonuclease analysis of DNA from ruminant *Chlamydia psittaci* and its relation to mouse virulence. *Vet. Microbiol.* 31, 263–271.
- Rodolakis, A., Bernard, F., Lantier, F., 1989a. Mouse models for evaluation of virulence of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants. *Res. Vet. Sci.* 46, 34–39.
- Rodolakis, A., Bernard, F., Souriau, A., Layachi, K., Buzoni-Gatel, D., 1989b. Relationship between virulence of *Chlamydia psittaci* strains and establishment of persistent infection of McCoy cells. *Vet. Microbiol.* 19, 65–73.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messegue, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497.
- Salinas, J., Souriau, A., De Sa, C., Andersen, A.A., Rodolakis, A., 1996. Serotype 2-specific antigens from ruminant strains of *Chlamydia pecorum* detected by monoclonal antibodies. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 155–161.
- Schorey, J.S., Holsti, M.A., Ratliff, T.L., Allen, P.M., Brown, E.J., 1996. Characterization of the fibronectin-attachment protein of *Mycobacterium avium* reveals a fibronectin-binding motif conserved among mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 21, 321–329.
- Scidmore, M.A., Rockey, D.D., Fischer, E.R., Heinzen, R.A., Hackstadt, T., 1996. Vesicular interactions of the *Chlamydia trachomatis* inclusion are determined

- by Chlamydial early protein synthesis rather than route of entry. *Infect. Immun.* 64, 5366–5372.
- Seifert, K.N., Adderson, E.E., Whiting, A.A., Bohnsack, J.F., Crowley, P.J., Brady, L.J., 2006. A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen (epsilon) associated with a virulent lineage of serotype III *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology* 152, 1029–1040.
- Spears, P., Storz, J., 1979. *Chlamydia psittaci*: growth characteristics and enumeration of serotypes 1 and 2 in cultured cells. *J. Infect. Dis.* 140, 959–967.
- Stephens, R.S., Tam, M.R., Kuo, C.C., Nowinski, R.C., 1982. Monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis*: antibody specificities and antigen characterization. *J. Immunol.* 128, 1083–1089.
- Stephens, R.S., Sanchez-Pescador, R., Wagar, E.A., Inouye, C., Urdea, M.S., 1987. Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *J. Bacteriol.* 169, 3879–3885.
- Stothard, D.R., Boguslawski, G., Jones, R.B., 1998. Phylogenetic analysis of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein and examination of potential pathogenic determinants. *Infect. Immun.* 66, 3618–3625.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Tankouo-Sandjong, B., Sessitsch, A., Liebana, E., Kornschöber, C., Allerberger, F., Hachler, H., Bodrossy, L., 2007. MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence genes, for molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars. *J. Microbiol. Methods* 69, 23–36.
- Tsai, Y.H., Orsi, R.H., Nightingale, K.K., Wiedmann, M., 2006. *Listeria monocytogenes* internalins are highly diverse and evolved by recombination and positive selection. *Infect. Genet. Evol.* 6, 378–389.
- Yousef Mohamad, K., Rekiki, A., Myers, G., Bavoi, P.M., Rodolakis, A., 2008. Identification and characterisation of coding tandem repeat variants in IncA gene of *Chlamydomydia pecorum*. *Vet Res.* 39, 56.

Article 4. Les gènes *ompA*, *incA* et ORF663 sont des marqueurs moléculaires épidémiologiques potentiels de *Chlamydophila pecorum*

Les études précédentes réalisées dans notre laboratoire sur 19 souches isolées des ruminant, ont montré que les souches pathogènes de *C. pecorum* sont génétiquement différentes des souches intestinales non- pathogènes. Pour vérifier si ces résultats étaient généralisables, 31 souches additionnelles, y compris 11 souches isolées des porcs, ont été utilisées dans cette étude pour comparer les séquences des gènes *ompA*, *incA* et ORF663. Nos résultats ont confirmé qu'une bonne corrélation a été observée entre le nombre de répétitions de CTR de l'ORF663 et la pathogénicité de *C. pecorum*.

Un nouveau motif composé d'alanine et de glycine (AGA) a été trouvé dans la CTR du gène *incA* de souches isolées de bovins : une souche isolées de fèces de bovin asymptomatique aux USA, une souche isolée d'endométrite en Italie et une souche isolée de pneumonie en Allemagne.

L'arbre phylogénétique basé sur la séquence du gène *ompA* a permis de distinguer 2 groupes additionnels avec une valeur de bootstrap élevée. La plupart des souches pathogènes ont été incluses dans trois groupes (1, 4 et 5). De plus, les souches pathogènes porcines sont différentes des souches pathogènes isolées des ruminants.

Les résultats de RT- PCR ont révélé l'expression de *incA* et de l'ORF663 au cours de l'infection des cellules McCoy par *C. pecorum*.

En conclusion, nos résultats ont confirmé :

- I) que les souches pathogènes de *C. pecorum* sont différentes des souches non-pathogènes
- II) que les gènes *ompA*, *incA* et ORF663 sont des marqueurs moléculaires potentiels pour les études épidémiologiques de *C. pecorum*.

Les résultats de cette étude sont rapportés dans l'article ci-joint

« *ompA*, *incA* and ORF663 genes can be used as epidemiological markers of *Chlamydophila pecorum* to assess strain pathogenicity »

qui a été soumis pour publication dans Infection Genetic and Evolution, (juillet, 2009).

***ompA*, *incA* and ORF663 genes can be used as epidemiological markers of *Chlamydophila pecorum* to assess strain pathogenicity**

Khalil Yousef Mohamad^a, Bernhard Kaltenboeck^b, Simone Magnino^c, Konrad Sachse^d and Annie Rodolakis^a

^aINRA, UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France

^bDepartment of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Auburn University, Auburn, AL 36849, United States

^cIstituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", National Reference Laboratory for Animal Chlamydioses, Sezione Diagnostica di Pavia, Strada Campeggi 61, 27100 Pavia, Italy

^dFriedrich-Loeffler-Institut Jena, OIE Reference Laboratory for Chlamydiosis and National Reference Laboratory for Psittacosis, 07743 Jena, Germany

Corresponding author:

Annie Rodolakis

INRA, UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France

Tel.: +33 2 47 42 76 34; fax: +33 2 47 42 77 79

E- Mail address: rodolaki@tours.inra.fr

ABSTRACT

Chlamydophila (C.) pecorum is an obligate intracellular bacterium that has been associated with different pathological condition in ruminants, swine and koala, and has also been found in the intestine and vaginal mucus of asymptomatic ruminants. Recent studies carried out in our laboratory on 19 *C. pecorum* strains isolated from ruminants allowed to detect genetic differences between pathogenic strains and non-pathogenic intestinal strains. An additional 32 strains (including 11 porcine isolates) were used in the present study to conduct comparative sequence analysis of *ompA*, *incA* and ORF663 genes. Our results confirmed that a valid correlation was observed between the number of repetitions of coding tandem repeats (CTR) in ORF663 and the pathogenicity of the strains. A new tandem repeat motif of alanine and glycine (AGA) of CTR in *incA* gene was found. The phylogenetic tree based on the sequence of the *ompA* gene allowed distinction of two additional groups with high bootstrap value. Most of the pathogenic strains were included in three groups (1, 4 and 5). Our results also revealed genetic differences between the pathogenic strains isolated from pigs and ruminants. The results of reverse-transcription PCR indicated a possible function of *incA* and ORF663 during *C. pecorum* infection. In conclusion, our findings confirmed that (a) the pathogenic *C. pecorum* strains were genetically different from non-pathogenic strains and (b) *ompA*, *incA* and ORF663 genes can be used as molecular markers for epidemiological studies on this pathogen.

Keywords: *Chlamydophila pecorum*, pathogenesis, epidemiological marker, *ompA*, *incA*, ORF663,

1. INTRODUCTION

Chlamydophila (*C.*) *pecorum*, a Gram-negative obligate intracellular bacterium, is a species of the genus *Chlamydophila* belonging to of the family *Chlamydiaceae* (Everett et al., 1999). *C. pecorum* strains have been isolated worldwide from ruminants, swine and koalas, where they may be associated with conjunctivitis, encephalomyelitis, enteritis, pneumonia, polyarthritis, abortion, reproductive and urinary tract diseases (Jackson et al., 1999; Longbottom and Coulter, 2003; McColl et al., 1984), and are also found in the intestine and vaginal mucus of clinically healthy ruminants (Godin et al., 2008; Longbottom, 2004; Rodolakis et al., 1998; Spears and Storz, 1979). In addition, recent studies showed that also some wild animals may be infected with *C. pecorum* strains, e.g. leading to conjunctivitis in western barred bandicoot (Warren et al., 2005) and abortion in water buffalo (Greco et al., 2008).

For several decades, serotyping using monoclonal antibodies (MAbs) in a micro-immunofluorescence (MIF) assay was used to characterize and classify individual chlamydial strains. Meanwhile, genotyping based on PCR and sequencing of *ompA* has gradually replaced serotyping. Indeed, several new methods were proposed, such as DNA microarray testing (Sachse et al., 2008), multi-locus sequence typing (MLST) (Pannekoek et al., 2008) and typing based on variable number tandem repeats (VNTR) (Laroucau et al., 2008). All these methods are not congruent with the virulence of the isolates, although some parameters were correlated with clinical manifestations and serotyping. For *C. trachomatis*, in a study including 175 men and 135 women attending a sexually transmitted disease (STD) clinic, a correlation was reported between urethral discharge in men and serotypes H and J, and between lower abdominal pain in women and serotypes F and G (van Duynhoven et al., 1998). Furthermore, 47.5% of asymptomatic patients were infected with serovar E among 1,770 STD infected women in China (Gao et al., 2007). As to *C. psittaci*, serovar D strains induced the most severe disease in turkeys (Vanrompay et al., 1995).

C. pecorum strains present many genetic and antigenic variations (Denamur et al., 1991; Salinas et al., 1996). When analyzing 19 *C. pecorum* strains isolated from ruminants, genetic differences between pathogenic strains and non-pathogenic intestinal strains were found. By comparing the different motifs of the variant coding tandem repeats (CTR) in *incA* gene, 7 out of 8 pathogenic strains belonged to the same group (Yousef Mohamad et al., 2008a), and by comparing the number of repetitions of the CTR in ORF663 gene, pathogenic strains were characterized by fewer repetitions than non-pathogenic intestinal strains. By analyzing the

ompA sequences, 6 out of 8 pathogenic strains were found to cluster in a single group (Yousef Mohamad et al., 2008b). These data suggest that these 3 genes might be related to the pathogenesis of *C. pecorum* infections. An additional 32 strains including 11 strains isolated from swine, were used to validate this hypothesis in the present study. In addition, the expression profiles of the three genes were monitored using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. PCR conditions and sequencing

DNA extracts of 32 *C. pecorum* strains were used in this study (Table 1). PCR was performed according to the GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, Charbonnieres, France) protocol in a final volume of 50 µL, and consisted of DNA denaturation at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of amplification in a UNO II thermoblock (Biometra, Goettingen, Germany). Each cycle consisted of a denaturation step at 94°C for 30 sec, an annealing step at 55°C (for *ompA* and ORF663 genes) or at 63°C (for *incA* gene) for 45 sec, an extension step at 72°C for 1 min, followed by a final chain elongation at 72°C for 7 min. The primer pairs used in this study are listed in Table 2. The PCR products were sequenced by automated sequencing (Genome Express, Meylan, France).

2.2. Sequence alignment and analysis

The freeware sequence tool BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) was used to construct sequence alignments. The number of repetition of CTR of ORF663 was identified using Tandem repeat finder software (<http://tandem.bu.edu>). The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) method in the software MEGA4 (Tamura et al., 2007) including *C. abortus* S26/3 as out-group (genome available in the GenBank database at (<http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=ntca04>)). The Discrimination Index (D.I.) was calculated based on the number of allelic types [*j*], the number of strains belonging to each type [*n_j*], and the total number of strains analyzed [*N*], as previously described (Hunter and Gaston, 1988), with the following equation which implies that higher D.I. values indicate higher discriminatory power:

$$D.I. = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

2.3. Nucleotide sequence accession numbers

The complete DNA sequences of *ompA* gene and partial sequence of *incA* and ORF663 genes were deposited in GenBank under accession numbers: for ORF663 from GQ228106 to GQ228136; for *incA* from GQ228137 to GQ228165; for *ompA* from GQ228166 to GQ228197.

2.4. RNA extraction and reverse-transcription PCR analysis

C. pecorum VB2 strain was grown in McCoy cells in Minimum Essential Medium with 10% FBS at 37°C with 5% CO₂ as previously described (Rodolakis et al., 1989b). Cultures were then lysed 3, 6, 12, 24, 32 and 48 h after infection in RP1 buffer (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Total RNA from infected McCoy cells was prepared using the Kit NucleoSpin RNA/Protein according to the user's manual (Macherey-Nagel) and processed for RT-PCR. Uninfected McCoy cells (as a negative control) were treated similarly. One to two µg of RNA samples were treated with RQ1 DNase (Promega) as described in the manufacturer's protocol. Then, RNA sample was reverse transcribed for 50 min at 37°C by using oligo(dT)₁₅ and random primers, AMV reverse transcriptase and recombinant RNasin ribonuclease inhibitor as described in the user's manual (Promega). Following cDNA synthesis, 3 µl of cDNA was amplified using specific primers (Table 2) and according to the GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) protocol in a final volume of 25 µL. PCR consisted of DNA denaturation at 94°C for 5 min followed by 35 cycles of amplification in a Biometra UNO II thermoblock. Each cycle consisted of a denaturation step at 94°C for 30 sec, an annealing step at 55°C for 45 sec, an extension step at 72°C for 1 min, followed by a final chain elongation at 72°C for 7 min. PCR amplicons were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide.

3. RESULTS

3.1. Comparative sequence analysis of *ompA*, *incA* and ORF663

To evaluate the potential of *ompA*, *incA* and ORF663 to distinguish pathogenic from non-pathogenic strains of *C. pecorum*, sequences of these genes of 51 strains isolated from ruminants and pigs were analyzed. All strains yielded the expected amplification product of the *ompA* gene, whereas two bovine strains (DC49 and DC55) failed to give *incA* gene amplicons. One porcine strain (R106) gave a double PCR band for ORF663. Sequence analysis of the *incA* gene for the new 32 strains revealed a new motif of 9 nucleotides (GCTGGAGCC) encoding amino acids alanine and glycine AGA (Motif 5). This motif was

detected only in 3 bovine strains (2 pathogenic 2047 and DC13, and 1 intestinal non-pathogenic 66P130). For the new strains (including the porcine strains), sequence analysis of ORF663 confirmed that the pathogenic strains possessed fewer repetitions of CTR than non-pathogenic intestinal strains (Table 1). Furthermore, sequence analysis of *ompA*, *incA* and ORF663 genes of 51 strains showed that the three genes had a high discriminatory power (>94%). The total number of variants for each gene was 25- 30, in which at least half of these variants were represented by a single strain (Table 3). At least one of those genes was different for two otherwise identical strains, except for 4 cases, namely the two bovine arthritis LW613 and LW623 isolated in US, the two bovine endometritis 3638/3 and 4283/3 isolated in Italy, the two porcine pneumonia L71 and L39 isolated in Austria, and the two bovine encephalomyelitis E58 and SBE isolated in US and UK, respectively (Table 1).

As to the pathogenic strains (n=31), the number of repetitions in CTR of ORF663 (15 nucleotides) was less than 45 repeats, except for one ovine conjunctivitis 824 strain. Most (18 out of 31) of the pathogenic strains had less than 31 repeats. The non-pathogenic intestinal strains (n=15) had more than 50 repeats, except for 2 bovine intestinal BE53 and 66P130 strains and one ovine intestinal JP1751 strain isolated from UK and US, respectively. The three bovine strains isolated from vagina or eye of healthy animal were found to have 15, 16 and 23 repetitions, respectively (Table 1).

The majority (34 out of 49) of strains contained only the APA (alanine and proline) motif in CTR of IncA protein with a variable number of repetitions (from 2 to 22). This group included all pathogenic strains except 3 strains, i.e. one ovine conjunctivitis strain (824), one bovine pneumonia strain (DC13) and one bovine endometritis strain (2047) strain. Distinct motifs, such as APAPE, APE, and APEVPA were found only in 12 strains, 11 of which were non-pathogenic intestinal strains (Table 1).

The stability over time of the CTR of *incA* and ORF663 was investigated using two strains, i.e. non-pathogenic ovine intestinal strain iB3 (at egg passages 2 and 5) and ovine abortion strain AB10 (at egg passages 2 and 7). The two strains were isolated in France in 1981 and 1983, respectively, they were propagated in the yolk sac of chicken embryos and stored at -70°C before analysis. The second egg passage of both strains was performed in the year of isolation, but the last egg passage was carried out in 2005. The results showed identical sequences for 2 and for 5 and 7 egg passages, respectively, as to the number of repetitions and the motifs of amino acid for *incA* and ORF663.

The results of RT-PCR indicated that *ompA* gene was expressed early and continuously during the developmental cycle, with strong expression at 24 to 48 h after infection. The *incA*

gene was expressed weakly at 6 h and strongly at 32 h after infection, whereas, ORF663 was weakly expressed at 12 h and strongly at 24 to 48 h after infection (Figure 1).

3.2. Phylogenetic tree

The phylogenetic tree based on the complete *ompA* gene sequence of 51 strains (including the new 32 strains) allowed the identification of an additional 2 groups, i.e. Group 5 and 6 other than the ones already described, with high bootstrap value of 100 and 79%, respectively. Group 5 consisted only of 6 pathogenic porcine strains, whereas group 6 was composed of 7 ruminant strains, 5 strains isolated from healthy animal (faeces or vaginal swabs) and 2 from caprine aborted fetuses. In addition, most of the pathogenic strains (21/31) were grouped into three groups (1, 4 and 5), while most of the non-pathogenic strains (13/ 15) were classified into three other groups (2, 3 and 6) (Figure 2).

Group 1 included 10 pathogenic strains (6 bovine and 4 ovine) and one ovine non-pathogenic intestinal strain. Group 2 was composed of 5 non-pathogenic intestinal strains (4 ovine and 1 bovine) and 1 bovine endometritis strains. Group 3 consisted of 3 caprine intestinal strains and 2 bovine endometritis strains. Group 4 included 4 pathogenic porcine strains, 3 bovine strains (2 isolated from healthy animals) and 1 ovine conjunctivitis strain. Eight strains could not be classified in the present study (2 from ovine intestine, 3 bovine endometritis, 1 from bovine pneumonia, 1 isolated from healthy bovine, and 1 porcine pneumonia strain). A significant similarity was detected between porcine pneumonia L17 and bovine pneumonia DC13 strains, as well as between the two bovine endometritis PV5 and 2047 strains and the two ovine intestinal iB1 and iB2 strains (Figure 2).

4. DISCUSSION

In addition to our data from a previous study (Yousef Mohamad et al., 2008b), the analysis of 32 *C. pecorum* strains in the present study corroborated the genetic difference between the pathogenic and non-pathogenic strains and suggested the utilization of *ompA*, *incA* and ORF663 as molecular markers for epidemiological studies. Based on these three markers, field isolates of *C. pecorum* can be characterized and their pathogenicity can be predicted. Our results also highlighted the differences between the pathogenic strains isolated from swine and from ruminants. Indeed, a high level of genetic diversity was found among the *C. pecorum* strains. However, the stability over time (in the number of repeats and the type of motifs) of the CTR of *incA* and ORF663 was also found to be very high, which makes them suitable for the epidemiological studies.

A valid correlation was observed between the number of repetitions of CTR in ORF663 and the pathogenicity of the *C. pecorum* strains. In fact, 30 out of 31 pathogenic strains (97%) had 45 or less repetitive units, whereas 12 out of 15 non-pathogenic intestinal strains had more than 50 repeats. This finding is in agreement with a study that showed differences between environmental and clinical *Legionella pneumophila* strains in the repeat copy numbers of four genes (Coil et al., 2008). In addition, the correlation between the number of CTR of proteins exposed at the bacterial surface and the pathogenicity was previously shown for the alpha C protein of group B *streptococci* (GBS) (Madoff et al., 1996). The mutants of GBS expressing one-repeat alpha C protein were 100-fold more pathogenic than GBS expressing wild-type 9-repeat alpha C protein in neonatal mice (Gravekamp et al., 1998). Apparently, the small number of CTR reduces the size of the antigen and, consequently, limits antibody binding to the bacterial surface.

Two bovine non-pathogenic intestinal strains were found to have less than 45 repeats. A recent study demonstrated the role of such strains in sub-clinical intestinal infections in cattle, which affects long-term animal health (Reinhold et al., 2008). The repetitive region of the ORF663 sequence did not show similarity with gene sequences of other chlamydial species, whereas it was found to have 46% similarity with the repetitive region of the trans-sialidase protein of *Trypanosoma cruzi*. This similarity could be explained by lateral gene transfer between chlamydiae and other organisms, in this case *Trypanosoma* (Gupta and Griffiths, 2006). The trans-sialidase protein belongs to the Sialidase super-family whose function is to bind and hydrolyze terminal sialic acid residues from various glycoconjugates, as well as play a role in pathogenesis. Interestingly, the addition of *T. cruzi* trans-sialidase to cells infected with *Chlamydia* and *Mycoplasma*, reduced bacterial adhesion to host cells by removing sialic acid residues and preventing oxidation of the cells (de Lourdes Higuchi, 2004).

Generally, the CTR in *incA* have only APA or AGA motif with variable repetitive number in the pathogenic strains, while the other different motifs (APAPE, APE, or APEVPA) are found especially in the non-pathogenic intestinal strains. Many parasitic organisms, eukaryotes as well as bacteria, have proteins with amino acid repeats. These repeats can be involved in the evolution of genes, gene regulation, adaptation, resistance to environmental stress and evasion of the immune system. The changes in the repetitive coding regions (loss or gain) have been shown to cause phase variation in bacteria, which confer a great defensive capability to the pathogen in order to escape from an aggressive host environment (Hood et al., 1996). The ability of *C. pecorum* strains, especially the intestinal strains, to generate successive allelic variants of the *incA* gene under selective immune pressure may allow rapid adaptation to the

environment and/or evasion of the host immune system. However, the general function is likely not to be affected by these variable number of CTR repetitions, as recently shown for *Mycobacterium tuberculosis*, in which the deletion of coding repeats had no detectable effect on the *leuA* gene (alpha-isopropylmalate synthase) expression level, nor on the general properties of the enzyme product (Chanchaem and Palittapongarnpim, 2008).

Our data generating the phylogenetic tree based on the full-length *ompA* sequences (1167-1182 bp) showed that *ompA* was a highly polymorphic gene presenting 358 polymorphic sites in the 51 strains analyzed. Based on this polymorphism, we were able to study the phylogenetic relationship among the *C. pecorum* strains. Six bovine and four ovine pathogenic strains were found in one group, while the porcine pathogenic strains clustered into two groups and were found different from the ovine and bovine pathogenic strains. The classification of the porcine strains into 2 groups is in agreement with a previous study which based their differentiation on their biological properties, including the morphology of the inclusion and the reticulate body (Kaltenboeck and Storz, 1992). However, it should be noted that all porcine strains were isolated from the same geographical region (Austria).

The high similarity between the different porcine strains and the bovine non-pathogenic strain in group 2, led us to assume that the non-pathogenic strains from cattle could be infective and pathogenic for swine. The similarity between some intestinal strains and the strains isolated from the vagina, such as the ovine intestinal strain C4 and the bovine endometritis strain 3257, suggests the adaptation of *C. pecorum* strains to different epithelial cells. On the other hand, the dissimilarity of *ompA* genes among biologically related strains, e.g. bovine endometritis strains, could be explained by the high frequency of recombination events that were shown in several recent studies (Brunelle and Sensabaugh, 2006; Kaltenboeck et al., 2009; Yousef Mohamad et al., 2008b). This difference was also clearly found among strains isolated from faeces and vagina of healthy ruminants, thus suggesting the high level of genetic variability of non-pathogenic strains in comparison with pathogenic strains (porcine and ovine). This result differs from what was reported in another study on human *C. trachomatis* strains, where recombinant variants of *ompA* from different strains were especially frequent in persons with high rates of infection (Peeling and Brunham, 1996).

To evaluate the possible function of *incA* and ORF663 genes in *C. pecorum* infections, the expression profiles of both genes were monitored by RT-PCR of total RNA extracted from infected McCoy cells, and the results were compared with the expression profiles of *ompA* gene. An mRNA expression signal of the *ompA* gene was detected at all times and in significant amounts beginning at 24 h after infection. This result is in agreement with the *ompA* expression profiles of another chlamydial species, such as *C. pneumoniae* (Ouellette et al., 2005) or *C. trachomatis* (Gomes et al., 2005). The *incA* gene was expressed weakly at 6 h and strongly at 32 h. This result was different from other chlamydial species, where *incA* was expressed early during the developmental cycle, namely at maximal level at 5 min and at 10 h after infection for *C. psittaci* (Beeckman et al., 2008), while at 2 h after infection for *C. pneumoniae* (Lugert et al., 2004). The message of ORF663 was detected at 12h after infection and with maximal expression between 24-48 h after infection. It would now be interesting to perform (a) further functional analysis of ORF663 and IncA for the pathogenic and non-pathogenic *C. pecorum* strains, and (b) a mutagenesis study for the role of CTR of *incA* or ORF663 gene (deletion of repeats) for testing the biological consequences for the infectivity of *C. pecorum*. However, the mutagenesis is not yet applicable for obligate intracellular bacteria such as chlamydiae.

In conclusion, our results confirm that *ompA*, *incA* and ORF663 genes could be candidate molecular markers for epidemiological studies of *C. pecorum* infection since the present approach provides a simple and efficient typing tool which can be helpful for understanding the pathogenesis of *C. pecorum* infections.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mustafa Berri from INRA- Tours, France for helpful advice.

REFERENCES

- Beeckman, D. S., Geens, T., Timmermans, J. P., Van Oostveldt, P., and Vanrompay, D. C., 2008. Identification and characterization of a type III secretion system in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Vet Res.* 39, 27.
- Brunelle, B. W., and Sensabaugh, G. F., 2006. The *ompA* gene in *Chlamydia trachomatis* differs in phylogeny and rate of evolution from other regions of the genome. *Infect Immun.* 74, 578-85.
- Chanchaem, W., and Palittapongarnpim, P., 2008. The significance and effect of tandem repeats within the *Mycobacterium tuberculosis* leuA gene on alpha-isopropylmalate synthase. *FEMS Microbiol Lett.* 286, 166-70.
- Coil, D. A., Vandersmissen, L., Ginevra, C., Jarraud, S., Lammertyn, E., and Anne, J., 2008. Intragenic tandem repeat variation between *Legionella pneumophila* strains. *BMC Microbiol.* 8, 218.
- de Lourdes Higuchi, M., 2004. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a new therapeutic tool in the treatment of chronic inflammatory diseases: possible action against mycoplasma and chlamydia. *Med Hypotheses.* 63, 616-23.

- Denamur, E., Sayada, C., Souriau, A., Orfila, J., Rodolakis, A., and Elion, J., 1991. Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*. *J Gen Microbiol.* 137, 2525-30.
- Everett, K. D., Bush, R. M., and Andersen, A. A., 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol.* 49 Pt 2, 415-40.
- Gao, X., Chen, X. S., Yin, Y. P., Zhong, M. Y., Shi, M. Q., Wei, W. H., Chen, Q., Peeling, R. W., and Mabey, D., 2007. Distribution study of *Chlamydia trachomatis* serovars among high-risk women in China performed using PCR-restriction fragment length polymorphism genotyping. *J Clin Microbiol.* 45, 1185-9.
- Godin, A. C., Bjorkman, C., Englund, S., Johansson, K. E., Niskanen, R., and Alenius, S., 2008. Investigation of *Chlamydophila* spp. in dairy cows with reproductive disorders. *Acta Vet Scand.* 50, 39.
- Gomes, J. P., Hsia, R. C., Mead, S., Borrego, M. J., and Dean, D., 2005. Immunoreactivity and differential developmental expression of known and putative *Chlamydia trachomatis* membrane proteins for biologically variant serovars representing distinct disease groups. *Microbes Infect.* 7, 410-20.
- Gravekamp, C., Rosner, B., and Madoff, L. C., 1998. Deletion of repeats in the alpha C protein enhances the pathogenicity of group B streptococci in immune mice. *Infect Immun.* 66, 4347-54.
- Greco, G., Corrente, M., Buonavoglia, D., Campanile, G., Di Palo, R., Martella, V., Bellacicco, A. L., D'Abramo, M., and Buonavoglia, C., 2008. Epizootic abortion related to infections by *Chlamydophila abortus* and *Chlamydophila pecorum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology.* 69, 1061-9.
- Gupta, R. S., and Griffiths, E., 2006. Chlamydiae-specific proteins and indels: novel tools for studies. *Trends Microbiol.* 14, 527-35.
- Hood, D. W., Deadman, M. E., Jennings, M. P., Bisercic, M., Fleischmann, R. D., Venter, J. C., and Moxon, E. R., 1996. DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 11121-5.
- Hunter, P. R., and Gaston, M. A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 26, 2465-6.
- Jackson, M., White, N., Giffard, P., and Timms, P., 1999. Epizootiology of *Chlamydia* infections in two free-range koala populations. *Vet Microbiol.* 65, 255-64.
- Kaltenboeck, B., Heinen, E., Schneider, R., Wittenbrink, M. M., and Schmeer, N., 2009. OmpA and antigenic diversity of bovine *Chlamydophila pecorum* strains. *Vet Microbiol.* 135, 175-80.
- Kaltenboeck, B., and Storz, J., 1992. Biological properties and genetic analysis of the ompA locus in chlamydiae isolated from swine. *Am J Vet Res.* 53, 1482-7.
- Laroucau, K., Thierry, S., Vorimore, F., Blanco, K., Kaleta, E., Hoop, R., Magnino, S., Vanrompay, D., Sachse, K., Myers, G. S., Bavoil, P. M., Vergnaud, G., and Pourcel, C., 2008. High resolution typing of *Chlamydophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). *Infect Genet Evol.* 8, 171-81.
- Longbottom, D., 2004. Chlamydial infections of domestic ruminants and swine: new nomenclature and new knowledge. *Vet J.* 168, 9-11.
- Longbottom, D., and Coulter, L. J., 2003. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J Comp Pathol.* 128, 217-44.
- Lugert, R., Kuhns, M., Polch, T., and Gross, U., 2004. Expression and localization of type III secretion-related proteins of *Chlamydia pneumoniae*. *Med Microbiol Immunol.* 193, 163-71.
- Madoff, L. C., Michel, J. L., Gong, E. W., Kling, D. E., and Kasper, D. L., 1996. Group B streptococci escape host immunity by deletion of tandem repeat elements of the alpha C protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 4131-6.
- McClenaghan, M., Herring, A. J., and Aitken, I. D., 1984. Comparison of *Chlamydia psittaci* isolates by DNA restriction endonuclease analysis. *Infect Immun.* 45, 384-9.
- McColl, K. A., Martin, R. W., Gleeson, L. J., Handasyde, K. A., and Lee, A. K., 1984. Chlamydia infection and infertility in the female koala (*Phascogale cinereus*). *Vet Rec.* 115, 655.
- McNutt, S. H., and Waller, E. F., 1940. Sporadic bovine encephalomyelitis (Buss disease). *Cornell Vet.* 30, 437-448.
- Norton, W. L., and Storz, J., 1967. Observations on sheep with polyarthritis produced by an agent of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group. *Arthritis Rheum.* 10, 1-12.
- Ouellette, S. P., Abdelrahman, Y. M., Belland, R. J., and Byrne, G. I., 2005. The *Chlamydia pneumoniae* type III secretion-related lcrH gene clusters are developmentally expressed operons. *J Bacteriol.* 187, 7853-6.
- Pannekoek, Y., Morelli, G., Kusecek, B., Morre, S. A., Ossewaarde, J. M., Langerak, A. A., and van der Ende, A., 2008. Multi locus sequence typing of Chlamydiales: clonal groupings within the obligate intracellular bacteria *Chlamydia trachomatis*. *BMC Microbiol.* 8, 42.

- Peeling, R. W., and Brunham, R. C., 1996. Chlamydiae as pathogens: new species and new issues. *Emerg Infect Dis.* 2, 307-19.
- Perez-Martinez, J. A., and Storz, J., 1985. Antigenic diversity of *Chlamydia psittaci* of mammalian origin determined by microimmunofluorescence. *Infect Immun.* 50, 905-10.
- Reinhold, P., Jaeger, J., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Bachmann, R., Schubert, E., Melzer, F., Elschner, M., and Sachse, K., 2008. Impact of latent infections with *Chlamydophila* species in young cattle. *Vet J.* 175, 202-11.
- Rodolakis, A., Bernard, F., and Lantier, F., 1989a. Mouse models for evaluation of virulence of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants. *Res Vet Sci.* 46, 34-9.
- Rodolakis, A., Bernard, F., Souriau, A., Layachi, K., and Buzoni-Gatel, D., 1989b. Relationship between virulence of *Chlamydia psittaci* strains and establishment of persistent infection of McCoy cells. *Vet Microbiol.* 19, 65-73.
- Rodolakis, A., Salinas, J., and Papp, J., 1998. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet Res.* 29, 275-88.
- Sachse, K., Laroucau, K., Vorimore, F., Magnino, S., Feige, J., Muller, W., Kube, S., Hotzel, H., Schubert, E., Slickers, P., and Ehrlich, R., 2008. DNA microarray-based genotyping of *Chlamydophila psittaci* strains from culture and clinical samples. *Vet Microbiol.*
- Salinas, J., Souriau, A., De Sa, C., Andersen, A. A., and Rodolakis, A., 1996. Serotype 2-specific antigens from ruminant strains of *Chlamydia pecorum* detected by monoclonal antibodies. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 19, 155-61.
- Spears, P., and Storz, J., 1979. *Chlamydia psittaci*: growth characteristics and enumeration of serotypes 1 and 2 in cultured cells. *J Infect Dis.* 140, 959-67.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24, 1596-9.
- van Duynhoven, Y. T., Ossewaarde, J. M., Derksen-Nawrocki, R. P., van der Meijden, W. I., and van de Laar, M. J., 1998. *Chlamydia trachomatis* genotypes: correlation with clinical manifestations of infection and patients' characteristics. *Clin Infect Dis.* 26, 314-22.
- Vanrompay, D., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F., 1995. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet Microbiol.* 45, 93-119.
- Warren, K., Swan, R., Bodetti, T., Friend, T., Hill, S., and Timms, P., 2005. Ocular chlamydial infections of western barred bandicoots (*Perameles bougainville*) in Western Australia. *J Zoo Wildl Med.* 36, 100-2.
- Yousef Mohamad, K., Rekiki, A., Myers, G., Bavoil, P. M., and Rodolakis, A., 2008a. Identification and characterisation of coding tandem repeat variants in *incA* gene of *Chlamydophila pecorum*. *Vet Res.* 39, 56.
- Yousef Mohamad, K., Roche, S. M., Myers, G., Bavoil, P. M., Laroucau, K., Magnino, S., Laurent, S., Rasschaert, D., and Rodolakis, A., 2008b. Preliminary phylogenetic identification of virulent *Chlamydophila pecorum* strains. *Infect Genet Evol.* 8, 764-71.

Table 1: General information and sequence parameters for *C. pecorum* strains examined in this study. (19 strains printed in bold were part of the antecedent study (Yousef Mohamad et al., 2008b)).

General informations				Sequence parameters		
Strain	Geographical origin	Host	Pathology (type of sample)	No. of CTR repeats in ORF663	Group no. of <i>ompA</i> from Fig. 2	No. of repeats and motif types of CTR in <i>incA</i>
iB2^a	France	Sheep	Healthy animal (faeces)	68	nd	5 APA + 3 APEVPA + 4 APE
iB1^a	France	Sheep	Healthy animal (faeces)	65	nd	5 APA + 3 APEVPA + 3 APE
iB5^a	France	Sheep	Healthy animal (faeces)	62	2	12 APA
iC4^a	France	Goat	Healthy animal (faeces)	60	3	6 APA + 12 APAPE
iC3^a	France	Goat	Healthy animal (faeces)	59	3	6 APA + 11 APAPE
R69^b	Ireland	Sheep	Healthy animal (faeces)	58	2	2 APA + 8 APAPE
W73^b	Ireland	Sheep	Healthy animal (faeces)	58	2	2 APA + 8 APAPE
5184/4 ^c	Italy	Goat	Healthy animal (faeces)	56	6	5 APA + 3 APEVPA + 6 APE
C4 ^d	Germany	Sheep	Healthy animal (faeces)	54	2	3 APA + 2 APAVPA
iB3^a	France	Sheep	Healthy animal (faeces)	53	6	14 APA
iB4^a	France	Sheep	Healthy animal	53	6	10 APA + 4 APAPE

			(faeces)			
iC2^a	France	Goat	Healthy animal (faeces)	52	3	6 APA + 12 APAPE
FC-Stra ^e	USA	Cattle	Conjunctivitis	50	1	7 APA
C14^d	England	Cattle	Unknown	46	4	3 APA + 8 APEVPA
LW679^f	USA	Sheep	Arthritis	45	1	11 APA
LW613 ^e	USA	Cattle	Athrititis	45	1	9 APA
LW623 ^e	USA	Cattle	Athrititis	45	1	9 APA
JP1751 ^e	USA	Sheep	Healthy animal (faeces)	45	1	10 APA
1920BRZ ^g	Austria	Swine	Pneumonia	42	5	7 APA
L1 ^g	Austria	Swine	Pneumonia	42	5	8 APA
1710S ^e	Austria	Swine	Abortion	42	5	11 APA
824^h	Scotland	Sheep	Conjunctivitis	41	4	4 APA+8 APEVPA
3257 ^c	Italy	Cattle	Endometritis	41	2	2 APA
L14 ^e	USA	Cattle	Pneumonia	35	1	11 APA
748/4 ^c	Italy	Cattle	Endometritis	34	nd	3 APA
PV5 ^c	Italy	Cattle	Endometritis	31	nd	11 APA
L17 ^g	Austria	Swine	Pneumonia	28	nd	14 APA
DC13 ^d	Germany	Cattle	Pneumonia	25	nd	12 AGA
AKTⁱ	Tunisia	Sheep	Abortion	24	1	8 APA
VB2ⁱ	France	Sheep	Orchitis	24	1	15 APA
DC49 ^d	Germany	Cattle	Healthy animal (eye)	23	4	-
E58^j	USA	Cattle	Encephalomyelitis	22	1	12 APA
SBE^k	England	Cattle	Encephalomyelitis	22	1	12 APA
AB10^a	France	Sheep	Abortion	22	1	9 APA
66P130 ^e	USA	Cattle	Healthy animal (faeces)	21	2	10 AGA
1886 ^g	Austria	Swine	Enteritis	21	5	10 APA
3638/3 ^c	Italy	Cattle	Endometritis	21	3	3 APA
4283/3 ^c	Italy	Cattle	Endometritis	21	3	3 APA
BE53^k	England	Cattle	Healthy animal	20	4	8 APA

			(faeces)			
2047 ^c	Italy	Cattle	Endometritis	16	nd	12 AGA
DC55 ^d	Germany	Cattle	Healthy animal (vagina)	16	6	-
DC52 ^d	Germany	Cattle	Healthy animal (vagina)	15	6	12 APA
1708 ^e	Austria	Swine	pneumonia	15	5	10 APA
M14 ⁱ	Morocco	Goat	Abortion	14	6	22 APA
L71 ^e	Austria	Swine	polyarthrititis	10	4	13 APA
HsLuRz ^g	Austria	Swine	pneumonia	10	4	12 APA
L39 ^g	Austria	Swine	pneumonia	10	4	13 APA
L40 ^g	Austria	Swine	pneumonia	10	4	10 APA
DC47 ^d	Germany	Cattle	Healthy animal (nose)	7	nd	10 APA
29531/1 ^c	Italy	Goat	Abortion	5	6	9 APA
R106 ^g	Austria	Swine	pneumonia	-	5	14 APA

a) (Rodolakis et al., 1989a). **b)** Isolated by M.S. McNulty, Veterinary Research laboratory, Stormont, Belfast, Ulster. **c)** Supplied by Simone Magnino, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", National Reference Laboratory for Animal Chlamydioses, Sezione Diagnostica di Pavia, Strada Campeggi 61, 27100 Pavia, Italy. **d)** Supplied by Konrad Sachse, Friedrich-Loeffler-Institut Jena, Nationales Referenzlabor für Psittakose, 07743 Jena, Germany. **e)** (Perez-Martinez and Storz, 1985). **f)** (Norton and Storz, 1967). **g)** (Kaltenboeck and Storz, 1992). **h)** (McClenaghan et al., 1984). **i)** Isolated at INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, Centre de Recherche de Tours, France. **j)** (McNutt and Waller, 1940). **k)** Isolated by M. Dawson, Virology Department, Central Veterinary Laboratory, Weybridge UK.

nd = not determined (strain could not be classified)

- = not amplified by PCR

Table 2: Primers used in this study

Gene	Primer use	Primer name	Sequence (5' to 3')
<i>ompA</i>	Sequencing	ompA-F	CTTGAACGTAAGTGCCGCCAGA
		ompA-R	AGAAACCAGAACATTCTGTCCT
	RT-PCR	MOPM-F	TGTGATCCTTGCGCTACTTG
		MOMP-R	CCCCGAGGTTTGTGTACAGT
<i>inca</i>	Sequencing	b15-F	CAAGAACAGTTGCGTCCTG
		inca-s-R	GTGTGAGATGGCTCTTTATG
	RT-PCR	inca-RT-F	CCCCTACGAACTCAAGCATC
		inca-RT-R2	TCGCCTAGAGAGGAAAGTGC
ORF663	Sequencing	663-F	AAACAACCTGCACCGCTCTCT
		663-R	GAAGGACTTTCTGGGGGAAG
	RT-PCR	ORF-RT-F	AGGTAGAAGATTTTTCCCCA
		ORF-RT-R	AGAGAGAGCGGTGCAGTTGT

Table 3: Comparison of number of variants and discriminatory power between *ompA*, *incA* and ORF663 genes

Gene	Number of analyzed strains	Number of variants (total)	Number of variants represented by a single strain	Discrimination Index (D.I.)
<i>ompA</i>	51	26	13	94.0%
<i>incA</i>	49	25	13	96.8%
ORF663	50	30	20	97.4%

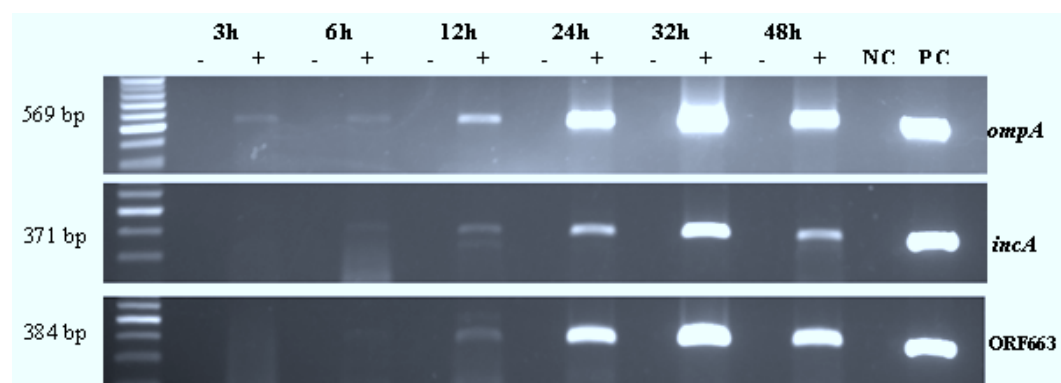


Figure 1: Analysis of gene expression using RT-PCR. Specific messages for *ompA*, *incA* and ORF663 were detected from whole McCoy culture RNA isolated 3, 6, 12, 24, 32 and 48 h after infection in the presence (+) and the absence (-) of reverse transcriptase. *C. pecorum* VB2 genomic DNA was used as positive control (PC) and the cDNA of uninfected McCoy cells was used as negative control (NC). Amplification product were resolved in 1.5% (w/v) agarose gels and visualized by staining with ethidium bromide.

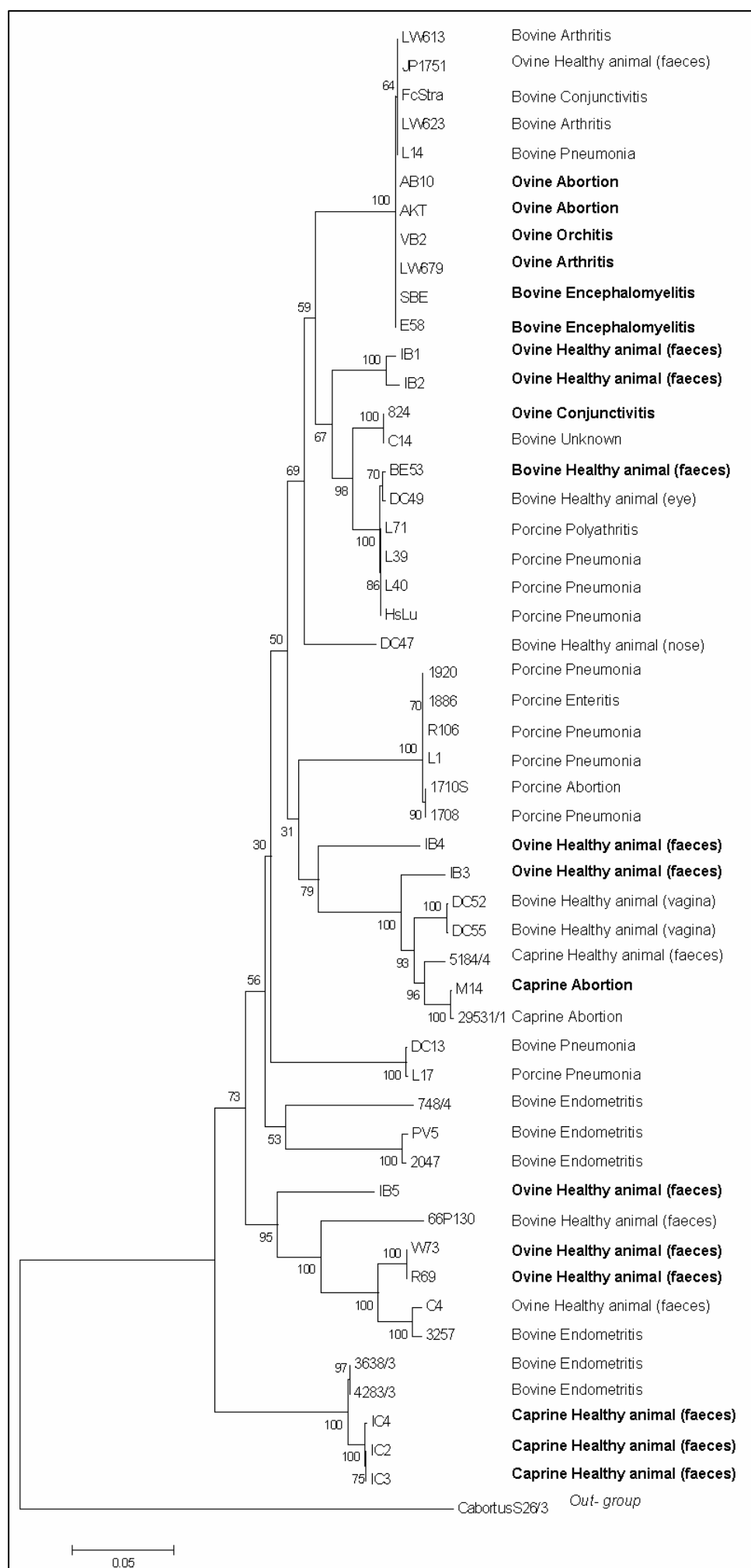


Figure 2: Neighbor-joining tree of 51 *C. pecorum* strains based on the number of nucleotide differences in the *ompA* gene. Bootstrap values (500 replications) are indicated at the interior branches. The bar represents 5% evolutionary sequence divergence. Animal host, pathology and grouping (group 1, 2, 3, 4, 5 and 6) for each strain is included. (19 strains printed in bold were part of the antecedent study (Yousef Mohamad et al., 2008b)).

Discussion générale

Discussion générale

Le premier objectif de notre étude a été de rechercher des antigènes spécifiques qui peuvent être utilisés dans un test ELISA pour distinguer les animaux infectés par *C. pecorum* des animaux infectés par les autres espèces de *Chlamydiae*. Ceci pourrait contribuer également à améliorer le diagnostic de la chlamydiose abortive chez les ruminants.

Le clonage et l'expression moléculaire de la banque génomique de *C. pecorum* dans le vecteur phagique d'expression (lambda Zap) nous ont permis d'identifier la protéine IncA comme un candidat potentiel. L'analyse par western blot a montré que la protéine IncA recombinante réagit avec des sérums collectés chez des brebis et des souris immunisées expérimentalement avec différentes souches de *C. pecorum* et n'a pas réagi avec un sérum murin dirigé contre *C. abortus*. Elle a réagi également avec un anticorps monoclonal (PD3) spécifique de *C. pecorum*. Ces résultats ajoutés au fait que 3 des 16 clones recombinants obtenus contenaient le gène *incA* suggèrent que IncA pourrait être un antigène majeur, commun et spécifique pour détecter l'infection par *C. pecorum*.

IncA est une des protéines du groupe Inc. Elles sont localisées sur la membrane de l'inclusion des *Chlamydiae* et réagissent avec des protéines cytoplasmiques de la cellule hôte (Rockey et al., 1997). Bien que les propriétés biochimiques de la protéine IncA (structures multi-mères) soient bien conservées entre les différentes espèces de *Chlamydiae*, il y a peu d'homologie entre les séquences du gène *incA* parmi les différentes espèces de *Chlamydiae* (Delevoye et al., 2004). De plus, les anticorps dirigés contre IncA de différentes espèces de *Chlamydiae* ne croisent pas entre eux (Bannantine et al., 1998b). La protéine IncA a déjà été proposée comme antigène spécifique de *C. trachomatis* et de *C. pneumoniae* (Park et al., 2009; Tsai et al., 2007). Des amorces établies à partir de la séquence d'*incA*, ont permis de détecter spécifiquement *C. psittaci* en PCR quantitative (Menard et al., 2006). Ces études suggèrent qu'IncA pourrait être utilisée pour le diagnostic spécifique des différentes espèces de *Chlamydiae*.

La spécificité de l'antigène IncA recombinant identifié au cours de cette étude, souligne son intérêt pour le diagnostic de *C. pecorum*. Cependant, il est encore nécessaire d'évaluer cet antigène dans un test ELISA pour les ruminants avec d'autres sérums d'animaux de statut sanitaire connu.

Par ailleurs, le séquençage du gène *incA* de toutes les souches de *C. pecorum* testées (19 souches) ainsi que deux souches de *C. abortus* isolées à partir de fèces d'animaux sains (chèvre et brebis), a permis d'identifier une séquence répétée codante (CTR) présentant un

nombre de répétition variable. Cette CTR n'a pas été détectée chez les autres souches de *C. abortus* isolées à partir de cas cliniques et chez les souches de *C. psittaci*, *C. caviae*, *C. felis* et *C. trachomatis* testées.

Quatre motifs différents d'acides aminés ont été identifiés à l'extrémité C-terminal du gène *incA*; APA (motif 1), APAPE (motif 2), APEVPA (motif 3) et APE (motif 4). Le nombre de motifs dans le gène *incA*, nous a permis de classer les souches de *C. pecorum* étudiées en 3 groupes. Sept des 8 souches pathogènes de *C. pecorum* qui ont été isolées chez des animaux ayant différents signes cliniques dont 3 isolées d'avortement, 2 d'encéphalomyélites, 1 d'arthrite et 1 d'épididymite, ont été classées dans le même groupe (groupe 1) composé des souches contenant uniquement le motif 1 (APA).

Les motifs de IncA sont en général riches en alanine et proline. Le séquençage des génomes bactériens révèle que de nombreuses séquences riches en proline sont répétées et codantes (CTR) (par exemple xP ou xPy). Certaines de ces séquences n'ont pas de fonction connue, mais la majorité semble être impliquée dans des processus qui augmentent la virulence bactérienne. En effet, des protéines avec des CTR riches en proline ont souvent la capacité de réagir avec d'autres protéines.

Les souches mutantes de *Listeria monocytogenes* dépourvues d'un domaine de répétitions riche en proline dans la protéine ActA, se déplacent deux fois plus lentement que le type sauvage. La protéine ActA recrute l'actine à la surface de la bactérie au cours de l'infection ce qui permet la mobilité de la bactérie dans le cytoplasme de la cellule hôte (Lasa et al., 1995). L'attachement à la fibronectine extracellulaire, de la protéine Fap de *Mycobacterium avium* qui contient une CTR avec un motif AP permet à la bactérie de se lier sur les muqueuses de l'animal hôte (Schorey et al., 1996). Cependant, *Chlamydiae* n'est pas mobile dans le cytoplasme de la cellule hôte et la protéine IncA n'est exprimée qu'après l'attachement à la cellule hôte. Ainsi, un rôle éventuel dans l'attachement ou la mobilité intracellulaire ne semblerait pas applicable à la CTR de la protéine IncA de *C. pecorum*. En revanche les inclusions contenant des souches de *Chlamydiae* et présentant une protéine IncA mutante sont incapables de fusionner dans le cytoplasme de la cellule hôte. La CTR de la protéine IncA de *C. pecorum* pourrait jouer un rôle dans la mobilité des inclusions dans le cytoplasme qu'il serait intéressant de vérifier.

La variabilité du nombre de répétitions dans des gènes qui codent pour des protéines exposées à la surface de *Candida albicans* permettrait l'adaptation rapide à un environnement et/ou à l'évasion de la réponse immunitaire de l'hôte (Zhang et al., 2003; Zhao et al., 2003). Les souches de *C. pecorum*, souvent trouvées dans les intestins des animaux sains, devrait pouvoir

s'adapter et persister dans la cellule hôte. La CTR de IncA pourrait ainsi être impliquée dans l'adaptation de la bactérie à son environnement et/ou dans l'évasion immunitaire permettant à *C. pecorum* de persister dans la cellule hôte pendant longtemps.

Le gène *incA* de *C. pecorum* permettrait en fonction du nombre de motifs de CTR de distinguer les souches pathogènes (souches isolées de cas cliniques) des souches non-pathogènes (souches isolées chez des animaux sains). Ce dernier résultat nous a conduit à rechercher d'autres gènes qui pourraient être liés à la pathogénicité de *C. pecorum*.

L'analyse des séquences de 12 gènes de *C. pecorum* a été réalisée pour caractériser 19 souches isolées des ruminants dont 8 souches pathogènes et 11 souches intestinales non-pathogènes.

Nos résultats ont montré que les gènes de ménage sont moins discriminants que les gènes de virulence avec un nombre très faible de sites polymorphes (moins de 5 sites). De plus, aucun événement de recombinaison n'a été observé pour tous les gènes de ménage utilisés dans cette étude ce qui avait déjà été constaté pour *C. trachomatis* (Brunelle and Sensabaugh, 2006). De faibles nombres de sites polymorphes et d'événements de recombinaisons ont été également vus pour certains gènes de virulence de *C. pecorum* comme *incB*, *incC*, *mip* et *copN*. En revanche, les gènes *ompA*, *incA* et l'ORF663 ont le grand nombre de sites polymorphes avec 310, 121, 71 sites pour chaque gène respectivement. De plus, 64 événements de recombinaison ont été obtenus pour *ompA*, 15 pour ORF663 et 12 pour *incA*. Ceci souligne la possibilité d'échange de séquences de gènes parmi les souches de *C. pecorum* comme cela a déjà été observé pour le gène *ompA* de *C. trachomatis* (Brunham et al., 1994). Nos résultats sont en accord avec plusieurs études démontrant que la recombinaison joue un rôle important dans la diversification des gènes codant pour les protéines de la membrane externe des bactéries pathogènes, telles que *Listeria monocytogenes* (Tsai et al., 2006) ou *Neisseria meningitidis* (Andrews and Gojobori, 2004).

Nos résultats ont aussi montré que seul ces 3 gènes permettent de distinguer les souches pathogènes ce qui n'avait jamais été obtenu avec d'autres méthodes de typages des souches de *C. pecorum*, utilisant des anticorps monoclonaux en MIF (Salinas et al., 1996) ou en analysant les profils de restriction par *AluI* du gène *ompA* (Denamur et al., 1991).

Ce dernier résultat a été testé en utilisant un nombre plus important de souches, 32 souches y compris 11 souches isolées de porc. Dans cette étude, nous avons montré que la combinaison des 3 marqueurs a permis d'identifier et caractériser toutes les souches de *C. pecorum* étudiées et de repérer les souches pathogènes. La stabilité dans le temps du nombre de répétitions de CTR dans les gènes *incA* et l'ORF663 a été également vérifiée sur une souche

pathogène et une souches non-pathogène de *C. pecorum* en utilisant deux passages sur œuf réalisés à 25 ans d'intervalle (isolement en 1980 et dernier passage sur œuf en 2005). Les CTR de *incA* et de l'ORF663 sont donc bien adaptées pour des études épidémiologiques de *C. pecorum*.

Une bonne corrélation a été observée entre le nombre de répétitions des CTR de l'ORF663 et la pathogénicité des souches de *C. pecorum*. Trente souches pathogènes sur 31 (97%) ont un nombre de CTR égale ou inférieur à 45 répétitions, alors que 12 souches intestinales non-pathogènes sur 15 (80%) ont plus de 50 répétitions. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de Coil et ses collaborateurs (2008) qui ont pu distinguer les souches environnementales des souches cliniques de *Legionella pneumophila* d'après la variabilité des CTR de 4 gènes (Coil et al., 2008). Une corrélation entre le nombre de CTR des protéines exposées à la surface de la bactérie et sa pathogénicité a été démontrée pour la protéine alpha C du groupe B de *streptococcus* (GBS) (Madoff et al., 1996). La souche mutante de GBS qui exprime la protéine alpha C avec une seule répétition était 100 fois plus pathogène que celle de type sauvage exprimant la protéine avec 9 répétitions (Gravekamp et al., 1998). Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'un petit nombre de CTR diminue la taille de l'antigène, et par conséquence moins d'anticorps se liants à la surface des bactéries.

La CTR de l'ORF663 est riche en serine, proline et lysine (KELSP, KESSP, KEPLP, KESSS, KEPSS et KKPSP). Cette région n'a aucune similarité avec la séquence du génome des autres espèces de *Chlamydiae* publiée tandis que 46% d'homologie ont été trouvés avec une région répétitive de la protéine trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi*. Une similarité semblable entre des gènes de *Chlamydiae* et les gènes d'autres organismes a été précédemment étudiée, elle serait due aux transferts latéraux de gènes entre les organismes (Gupta and Griffiths, 2006). La protéine trans-sialidase appartient à la grande famille de Sialidase dont la fonction est de se lier et hydrolyser les résidus terminaux des acides sialiques de différents glycoconjugués à la surface des cellules. L'ORF663 de *C. pecorum* pourrait donc être impliqué dans l'attachement des bactéries aux cellules hôtes. L'ORF663 de *C. pecorum* pourrait donc être impliqué dans l'attachement des bactéries aux cellules hôtes. L'expression de l'ORF663 commence 12 h après l'infection des cellules McCoy par *C. pecorum* VB2 (souche isolée d'épididymite ovine en France) tandis que les gènes *ompA* et *incA* sont exprimés 2 et 6 h après l'infection respectivement. Cependant, les fonctions des gènes ne peuvent être déterminés par la seule expression de l'ARN messager, une étude fonctionnelle de l'ORF663 de *C. pecorum* serait nécessaire pour connaître son rôle dans la virulence de *C. pecorum*.

L'analyse de la séquence du gène *incA* chez 32 souches de *C. pecorum* nous a permis d'identifier un autre motif dans la CTR, le motif 5 qui est composé d'alanine et de glycine (AGA). En général, la majorité des souches pathogènes présentent un seul motif APA ou AGA dans la CTR du gène *incA*, alors que, les autres motifs ont été trouvés chez la plupart des souches intestinales non-pathogènes. La capacité des souches de *C. pecorum* (en particulier les souches intestinales) à produire des allèles du gène *incA* variants sous la pression de sélection, permettraient à *Chlamydiae* de s'adapter rapidement à l'environnement.

L'arbre phylogénétique établi à partir de la séquence génomique complète du gène *ompA* des 51 souches de *C. pecorum*, a permis de classer les souches en 6 groupes. Dix souches pathogènes (ovines et bovines) ont été affiliées dans un seul groupe (groupe 1 qui contient également une souche intestinale bovine) tandis que, les souches pathogènes porcines ont été séparées en deux groupes 4 et 5. Le groupe 4 se compose de 4 souches porcines, de 3 souches non-pathogènes bovines et d'une souche de conjonctivite ovine, tandis que le groupe 5 se compose uniquement de 6 souches porcines. La subdivision des souches porcines en 2 groupes a été démontrée en utilisant les propriétés biologiques sur des cultures cellulaires (Kaltenboeck and Storz, 1992). Cependant, toutes les souches porcines utilisées sont de la même origine géographique (Autriche). Une similarité importante entre les souches pathogènes porcines et les souches non-pathogènes bovines dans le groupe 4, nous a mené à penser que les souches non-pathogènes bovines pourraient être contagieuses et pathogènes pour les porcs.

Une similarité importante entre des souches intestinales et des souches isolées du mucus vaginal comme la souche C4 (intestinale ovine isolée en Allemagne) et la souche 3257 (endométrite bovine isolée en Italie), pourrait démontrer que les souches de *C. pecorum* peuvent s'adapter à différentes cellules épithéliales de l'animal. En revanche, la variabilité génétique de la séquence *ompA* pour les souches biologiquement proches comme par exemple les souches d'endométrite bovine, pourrait être due au niveau élevé d'événements de recombinaison qui a déjà été observé pour ce gène (Brunelle and Sensabaugh, 2006; Kaltenboeck et al., 2009; Yousef Mohamad et al., 2008).

Parmi les 51 souches de *C. pecorum*, 8 souches dont 5 souches pathogènes et 3 souches non-pathogènes n'ont pu être classées. L'utilisation d'un nombre plus important de souches améliorerait sûrement la puissance discriminante de l'arbre phylogénétique. Cependant, la collecte de nouvelles souches de *C. pecorum* n'est pas été facile, car *C. pecorum* est difficile à cultiver et son isolement n'est pas prioritaire par rapport aux autres espèces plus virulentes de

Chlamydophila telles que *C. psittaci* et *C. abortus* qui entraînent des conséquences économiques plus graves.

Conclusion et perspectives

Nos résultats ont montré que les souches pathogènes sont génétiquement différentes des souches non-pathogènes de *C. pecorum* et que les gènes *ompA*, *incA* et ORF663 sont des marqueurs moléculaires applicables pour des études épidémiologiques de *C. pecorum*. Il serait intéressant de compléter cette étude en recherchant d'autres marqueurs de virulence de *C. pecorum* par ; 1) l'analyse comparative des séquences du génome de différentes souches de *C. pecorum* pathogènes et non- pathogènes ; et/ou

2) l'analyse de l'expression des ARN messagers des différents gènes en utilisant des microarrays pour comparer les souches pathogènes et non- pathogènes de *C. pecorum*.

Nous avons également montré que la protéine IncA est une candidate potentielle pour le sérodiagnostic permettant de détecter spécifiquement l'infection par *C. pecorum* chez les ruminants. Il serait intéressant de valider un test ELISA utilisant cet antigène puis de le tester pour d'autres animaux en particulier les koalas pour qui les souches de *C. pecorum* ont des conséquences pathologiques importantes. De plus, différents motifs dans la séquence d'*incA* nous a permis de distinguer les souches pathogènes de *C. pecorum*, il serait intéressant de savoir si ces motifs ont des rôles dans la conformation de différents épitopes de la protéine IncA puis de synthétiser de peptides antigéniques à partir de ces motifs pour distinguer les animaux infectés par des souches pathogènes des animaux porteurs sains de souches non-pathogènes de *C. pecorum*.

Il semblerait que les séquences répétées codantes dans les gènes *incA* et l'ORF663 qui nous ont permis de distinguer les souches pathogènes des souches non-pathogènes, ont un rôle important dans la virulence de *C. pecorum*. Il serait intéressant de réaliser une étude de mutagenèse sur la CTR de *incA* ou l'ORF663 en délétant des répétitions pour rechercher les conséquences biologiques de ces délétions au cours de l'infection de *C. pecorum*. Cependant, la mutagenèse dirigée n'est pas encore applicable pour les *Chlamydiae*.

Références bibliographiques

- Adair, D. M., Worsham, P. L., Hill, K. K., Klevytska, A. M., Jackson, P. J., Friedlander, A. M., and Keim, P., 2000. Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol.* 38, 1516-9.
- Airenne, S., Surcel, H. M., Alakarppa, H., Laitinen, K., Paavonen, J., Saikku, P., and Laurila, A., 1999. *Chlamydia pneumoniae* infection in human monocytes. *Infect Immun.* 67, 1445-9.
- Allen, J. E., and Stephens, R. S., 1993. An intermolecular mechanism of T cell help for the production of antibodies to the bacterial pathogen, *Chlamydia trachomatis*. *Eur J Immunol.* 23, 1169-72.
- Andersen, A. A., 1991a. Comparison of avian *Chlamydia psittaci* isolates by restriction endonuclease analysis and serovar-specific monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 29, 244-9.
- Andersen, A. A., 1991b. Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. *J Clin Microbiol.* 29, 707-11.
- Anderson, I. E., 1986. Comparison of the virulence in mice of some ovine isolates of *Chlamydia psittaci*. *Vet Microbiol.* 12, 213-20.
- Anderson, I. E., Herring, A. J., Jones, G. E., Low, J. C., and Greig, A., 1995. Development and evaluation of an indirect ELISA to detect antibodies to abortion strains of *Chlamydia psittaci* in sheep sera. *Vet Microbiol.* 43, 1-12.
- Andrews, T. D., and Gojobori, T., 2004. Strong positive selection and recombination drive the antigenic variation of the P1E protein of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Genetics.* 166, 25-32.
- Bannantine, J. P., Rockey, D. D., and Hackstadt, T., 1998a. Tandem genes of *Chlamydia psittaci* that encode proteins localized to the inclusion membrane. *Mol Microbiol.* 28, 1017-26.
- Bannantine, J. P., Stamm, W. E., Suchland, R. J., and Rockey, D. D., 1998b. *Chlamydia trachomatis* IncA is localized to the inclusion membrane and is recognized by antisera from infected humans and primates. *Infect Immun.* 66, 6017-21.
- Bas, S., Muzzin, P., and Vischer, T. L., 2001. *Chlamydia trachomatis* serology: diagnostic value of outer membrane protein 2 compared with that of other antigens. *J Clin Microbiol.* 39, 4082-5.
- Bas, S., Neff, L., Vuillet, M., Spenato, U., Seya, T., Matsumoto, M., and Gabay, C., 2008. The proinflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies

- in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14. *J Immunol.* 180, 1158-68.
- Batteiger, B. E., Lin, P. M., Jones, R. B., and Van Der Pol, B. J., 1996. Species-, serogroup-, and serovar-specific epitopes are juxtaposed in variable sequence region 4 of the major outer membrane proteins of some *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infect Immun.* 64, 2839-41.
- Bavoil, P., Ohlin, A., and Schachter, J., 1984. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 44, 479-85.
- Bavoil, P., Stephens, R. S., and Falkow, S., 1990. A soluble 60 kiloDalton antigen of *Chlamydia* spp. is a homologue of *Escherichia coli* GroEL. *Mol Microbiol.* 4, 461-9.
- Bavoil, P. M., Hsia, R., and Ojcius, D. M., 2000. Closing in on *Chlamydia* and its intracellular bag of tricks. *Microbiology.* 146 (Pt 11), 2723-31.
- Bavoil, P. M., and Hsia, R. C., 1998. Type III secretion in *Chlamydia*: a case of déjà vu? *Mol Microbiol.* 28, 860-2.
- Bedson, S. P., Western, G. T., and Simpson, S. L., 1930. Observations on the ethiology of psittacosis. *Lancet* 1. 235-236.
- Beeckman, D. S., Geens, T., Timmermans, J. P., Van Oostveldt, P., and Vanrompay, D. C., 2008. Identification and characterization of a type III secretion system in *Chlamydophila psittaci*. *Vet Res.* 39, 27.
- Beeckman, D. S., and Vanrompay, D. C., 2009. Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect.* 15, 11-7.
- Berger, L., Volp, K., Mathews, S., Speare, R., and Timms, P., 1999. *Chlamydia pneumoniae* in a free-ranging giant barred frog (*Mixophyes iteratus*) from Australia. *J Clin Microbiol.* 37, 2378-80.
- Betsou, F., Sueur, J. M., and Orfila, J., 1999. Serological investigation of *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 10. *Infect Immun.* 67, 5243-6.
- Birkelund, S., Lundemose, A. G., and Christiansen, G., 1988. Chemical cross-linking of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 56, 654-9.
- Birkelund, S., Mygind, P., Holm, A., Larsen, B., Beck, F., and Christiansen, G., 1996. Characterization of two conformational epitopes of the *Chlamydia trachomatis* serovar L2 DnaK immunogen. *Infect Immun.* 64, 810-7.
- Birkelund, S., and Stephens, R. S., 1992. Construction of physical and genetic maps of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 by pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 174, 2742-7.

- Blanchard, J. F., Armenian, H. K., Peeling, R., Friesen, P. P., Shen, C., and Brunham, R. C., 2000. The relation between *Chlamydia pneumoniae* infection and abdominal aortic aneurysm: case-control study. *Clin Infect Dis.* 30, 946-7.
- Bodetti, T. J., Johnston, S., Pospischil, A., Knox, C., and Timms, P., 2002. Screening semen from koalas (*Phascolarctos cinereus*) for *Chlamydia* species by PCR. *Vet Rec.* 151, 147-9.
- Bogarda, M., Ameziane, N., and Lamorilc, J., 2008. Microarray d'ADN et profils d'expression des gènes. Première partie: concept, fabrication et mise en oeuvre. *Immuno-analyse et biologie spécialisée.* 23, 71-88.
- Boumedine, K. S., and Rodolakis, A., 1998. AFLP allows the identification of genomic markers of ruminant *Chlamydia psittaci* strains useful for typing and epidemiological studies. *Res Microbiol.* 149, 735-44.
- Brade, H., Brade, L., and Nano, F. E., 1987. Chemical and serological investigations on the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 2508-12.
- Brade, L., Schramek, S., Schade, U., and Brade, H., 1986. Chemical, biological, and immunochemical properties of the *Chlamydia psittaci* lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 54, 568-74.
- Brown, W. J., and Rockey, D. D., 2000. Identification of an antigen localized to an apparent septum within dividing chlamydiae. *Infect Immun.* 68, 708-15.
- Brunelle, B. W., and Sensabaugh, G. F., 2006. The *ompA* gene in *Chlamydia trachomatis* differs in phylogeny and rate of evolution from other regions of the genome. *Infect Immun.* 74, 578-85.
- Brunham, R., Yang, C., Maclean, I., Kimani, J., Maitha, G., and Plummer, F., 1994. *Chlamydia trachomatis* from individuals in a sexually transmitted disease core group exhibit frequent sequence variation in the major outer membrane protein (*omp1*) gene. *J Clin Invest.* 94, 458-63.
- Buendia, A. J., Cuello, F., Del Rio, L., Gallego, M. C., Caro, M. R., and Salinas, J., 2001. Field evaluation of a new commercially available ELISA based on a recombinant antigen for diagnosing *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. *Vet Microbiol.* 78, 229-39.
- Burnet, F. M., and Rountree, P. M., 1935. Psittacosis in the developing egg. *J. Pathol. Bacteriol.* 40, 471-481.

- Bush, R. M., and Everett, K. D., 2001. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51, 203-20.
- Byrne, G. I., and Moulder, J. W., 1978. Parasite-specified phagocytosis of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* by L and HeLa cells. *Infect Immun.* 19, 598-606.
- Caldwell, H. D., and Hitchcock, P. J., 1984. Monoclonal antibody against a genus-specific antigen of *Chlamydia* species: location of the epitope on chlamydial lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 44, 306-14.
- Caldwell, H. D., and Judd, R. C., 1982. Structural analysis of chlamydial major outer membrane proteins. *Infect Immun.* 38, 960-8.
- Caldwell, H. D., Kromhout, J., and Schachter, J., 1981. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 31, 1161-76.
- Call, D. R., Borucki, M. K., and Loge, F. J., 2003. Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *J Microbiol Methods.* 53, 235-43.
- Call, D. R., Brockman, F. J., and Chandler, D. P., 2001. Detecting and genotyping *Escherichia coli* O157:H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays. *Int J Food Microbiol.* 67, 71-80.
- Camenisch, U., Lu, Z. H., Vaughan, L., Corboz, L., Zimmermann, D. R., Wittenbrink, M. M., Pospischil, A., and Sydler, T., 2004. Diagnostic investigation into the role of Chlamydiae in cases of increased rates of return to oestrus in pigs. *Vet Rec.* 155, 593-6.
- Campbell, L. A., Kuo, C. C., and Grayston, J. T., 1987. Characterization of the new *Chlamydia* agent, TWAR, as a unique organism by restriction endonuclease analysis and DNA-DNA hybridization. *J Clin Microbiol.* 25, 1911-6.
- Campbell, S., Richmond, S. J., Yates, P. S., and Storey, C. C., 1994. Lipopolysaccharide in cells infected by *Chlamydia trachomatis*. *Microbiology.* 140 (Pt 8), 1995-2002.
- Carabeo, R. A., Grieshaber, S. S., Fischer, E., and Hackstadt, T., 2002. *Chlamydia trachomatis* induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells. *Infect Immun.* 70, 3793-803.
- Chang, G. T., and Moulder, J. W., 1978. Loss of inorganic ions from host cells infected with *Chlamydia psittaci*. *Infect Immun.* 19, 827-32.
- Chopra, I., Storey, C., Falla, T. J., and Pearce, J. H., 1998. Antibiotics, peptidoglycan synthesis and genomics: the chlamydial anomaly revisited. *Microbiology.* 144 (Pt 10), 2673-8.

- Christiansen, G., Ostergaard, L., and Birkelund, S., 1997. Molecular biology of the *Chlamydia pneumoniae* surface. *Scand J Infect Dis Suppl.* 104, 5-10.
- Clarkson, M. J., and Philips, H. L., 1997. Isolation of faecal chlamydia from sheep in Britain and their characterization by cultural properties. *Vet J.* 153, 307-10.
- Cles, L. D., and Stamm, W. E., 1990. Use of HL cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 28, 938-40.
- Clifton, D. R., Fields, K. A., Grieshaber, S. S., Dooley, C. A., Fischer, E. R., Mead, D. J., Carabeo, R. A., and Hackstadt, T., 2004. A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 10166-71.
- Cochrane, M., Walker, P., Gibbs, H., and Timms, P., 2005. Multiple genotypes of *Chlamydia pneumoniae* identified in human carotid plaque. *Microbiology.* 151, 2285-90.
- Cockram, F. A., and Jackson, A. R., 1974. Letter: Isolation of a *Chlamydia* from cases of keratoconjunctivitis in koalas. *Aust Vet J.* 50, 82-3.
- Coil, D. A., Vandersmissen, L., Ginevra, C., Jarraud, S., Lammertyn, E., and Anne, J., 2008. Intragenic tandem repeat variation between *Legionella pneumophila* strains. *BMC Microbiol.* 8, 218.
- Coles, A. M., Reynolds, D. J., Harper, A., Devitt, A., and Pearce, J. H., 1993. Low-nutrient induction of abnormal chlamydial development: a novel component of chlamydial pathogenesis? *FEMS Microbiol Lett.* 106, 193-200.
- Comanducci, M., Manetti, R., Bini, L., Santucci, A., Pallini, V., Cevenini, R., Sueur, J. M., Orfila, J., and Ratti, G., 1994. Humoral immune response to plasmid protein pgp3 in patients with *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun.* 62, 5491-7.
- Comanducci, M., Ricci, S., and Ratti, G., 1988. The structure of a plasmid of *Chlamydia trachomatis* believed to be required for growth within mammalian cells. *Mol Microbiol.* 2, 531-8.
- Cortes, C., Rzomp, K. A., Tvinnereim, A., Scidmore, M. A., and Wizel, B., 2007. *Chlamydia pneumoniae* inclusion membrane protein Cpn0585 interacts with multiple Rab GTPases. *Infect Immun.* 75, 5586-96.
- Costa, C. P., Kirschning, C. J., Busch, D., Durr, S., Jennen, L., Heinzmann, U., Prebeck, S., Wagner, H., and Miethke, T., 2002. Role of chlamydial heat shock protein 60 in the stimulation of innate immune cells by *Chlamydia pneumoniae*. *Eur J Immunol.* 32, 2460-70.

- Crane, D. D., Carlson, J. H., Fischer, E. R., Bavoil, P., Hsia, R. C., Tan, C., Kuo, C. C., and Caldwell, H. D., 2006. Chlamydia trachomatis polymorphic membrane protein D is a species-common pan-neutralizing antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 1894-9.
- Danilition, S. L., Maclean, I. W., Peeling, R., Winston, S., and Brunham, R. C., 1990. The 75-kilodalton protein of Chlamydia trachomatis: a member of the heat shock protein 70 family? *Infect Immun.* 58, 189-96.
- Davis, C. H., Raulston, J. E., and Wyrick, P. B., 2002. Protein disulfide isomerase, a component of the estrogen receptor complex, is associated with Chlamydia trachomatis serovar E attached to human endometrial epithelial cells. *Infect Immun.* 70, 3413-8.
- DeGraves, F. J., Gao, D., Hehnen, H. R., Schlapp, T., and Kaltenboeck, B., 2003. Quantitative detection of Chlamydia psittaci and C. pecorum by high-sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle. *J Clin Microbiol.* 41, 1726-9.
- Delevoe, C., Nilges, M., Dautry-Varsat, A., and Subtil, A., 2004. Conservation of the biochemical properties of IncA from Chlamydia trachomatis and Chlamydia caviae: oligomerization of IncA mediates interaction between facing membranes. *J Biol Chem.* 279, 46896-906.
- Denamur, E., Sayada, C., Souriau, A., Orfila, J., Rodolakis, A., and Elion, J., 1991. Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of Chlamydia psittaci. *J Gen Microbiol.* 137, 2525-30.
- Di Francesco, A., and Baldelli, R., 2002. Feline chlamydiosis in Italy: PCR amplification and analysis of the ompA and groEL-homolog genes. *New Microbiol.* 25, 341-4.
- Dill, B. D., Dessus-Babus, S., and Raulston, J. E., 2009. Identification of iron-responsive proteins expressed by Chlamydia trachomatis reticulate bodies during intracellular growth. *Microbiology.* 155, 210-9.
- Donati, M., Di Francesco, A., Baldelli, R., Magnino, S., Pignanelli, S., Shurdhi, A., Delucca, F., and Cevenini, R., 2009. In vitro detection of neutralising antibodies to Chlamydia suis in pig sera. *Vet Rec.* 164, 173-4.
- Donati, M., Sambri, V., Comanducci, M., Di Leo, K., Storni, E., Giacani, L., Ratti, G., and Cevenini, R., 2003. DNA immunization with pgp3 gene of Chlamydia trachomatis inhibits the spread of chlamydial infection from the lower to the upper genital tract in C3H/HeN mice. *Vaccine.* 21, 1089-93.

- Dong, F., Su, H., Huang, Y., Zhong, Y., and Zhong, G., 2004. Cleavage of host keratin 8 by a Chlamydia-secreted protease. *Infect Immun.* 72, 3863-8.
- Doughri, A. M., Storz, J., and Altera, K. P., 1972. Mode of entry and release of chlamydiae in infections of intestinal epithelial cells. *J Infect Dis.* 126, 652-7.
- Doughri, A. M., Yong, S., and Storz, J., 1974. Pathologic changes in intestinal chlamydial infection of newborn calves. *Am J Vet Res.* 35, 939-44.
- Eb, F., and Orfila, J., 1982. Serotyping of Chlamydia psittaci by the micro-immunofluorescence test: isolates of ovine origin. *Infect Immun.* 37, 1289-91.
- Eb, F., Orfila, J., Fuentes, V., Thomas, D., and Bissac, E., 1984. [Kinetic study of the antibodies in OF 1 and C57Bl mice infected with Chlamydia trachomatis and Chlamydia psittaci. Its application to the interpretation of the serological results in human chlamydioses]. *Virologie.* 35, 109-17.
- Eb, F., Orfila, J., Milon, A., and Geral, M. F., 1986. [Epidemiologic significance of the immunofluorescence typing of Chlamydia psittaci]. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 137B, 77-93.
- Ehricht, R., Slickers, P., Goellner, S., Hotzel, H., and Sachse, K., 2006. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol Cell Probes.* 20, 60-3.
- Everett, K. D., and Andersen, A. A., 1997. The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for Chlamydia spp. *Int J Syst Bacteriol.* 47, 461-73.
- Everett, K. D., and Andersen, A. A., 1999. Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP. *Int J Syst Bacteriol.* 49 Pt 2, 803-13.
- Everett, K. D., Bush, R. M., and Andersen, A. A., 1999a. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol.* 49 Pt 2, 415-40.
- Everett, K. D., Desiderio, D. M., and Hatch, T. P., 1994. Characterization of lipoprotein EnvA in Chlamydia psittaci 6BC. *J Bacteriol.* 176, 6082-7.
- Everett, K. D., and Hatch, T. P., 1991. Sequence analysis and lipid modification of the cysteine-rich envelope proteins of Chlamydia psittaci 6BC. *J Bacteriol.* 173, 3821-30.
- Everett, K. D., and Hatch, T. P., 1995. Architecture of the cell envelope of Chlamydia psittaci 6BC. *J Bacteriol.* 177, 877-82.

- Everett, K. D., Hornung, L. J., and Andersen, A. A., 1999b. Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests. *J Clin Microbiol.* 37, 575-80.
- Fadel, S., and Eley, A., 2007. Chlamydia trachomatis OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin. *J Med Microbiol.* 56, 15-22.
- Fadel, S., and Eley, A., 2008. Is lipopolysaccharide a factor in infectivity of Chlamydia trachomatis? *J Med Microbiol.* 57, 261-6.
- Faherty, C. S., and Maurelli, A. T., 2008. Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection. *Trends Microbiol.* 16, 173-80.
- Fan, J., and Stephens, R. S., 1997. Antigen conformation dependence of Chlamydia trachomatis infectivity neutralization. *J Infect Dis.* 176, 713-21.
- Fan, P., Dong, F., Huang, Y., and Zhong, G., 2002. Chlamydia pneumoniae secretion of a protease-like activity factor for degrading host cell transcription factors required for [correction of factors is required for] major histocompatibility complex antigen expression. *Infect Immun.* 70, 345-9.
- Fan, T., Lu, H., Hu, H., Shi, L., McClarty, G. A., Nance, D. M., Greenberg, A. H., and Zhong, G., 1998. Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med.* 187, 487-96.
- Fields, K. A., and Hackstadt, T., 2000. Evidence for the secretion of Chlamydia trachomatis CopN by a type III secretion mechanism. *Mol Microbiol.* 38, 1048-60.
- Flores, R., Luo, J., Chen, D., Sturgeon, G., Shivshankar, P., Zhong, Y., and Zhong, G., 2007. Characterization of the hypothetical protein Cpn1027, a newly identified inclusion membrane protein unique to Chlamydia pneumoniae. *Microbiology.* 153, 777-86.
- Fox, A., Rogers, J. C., Gilbert, J., Morgan, S., Davis, C. H., Knight, S., and Wyrick, P. B., 1990. Muramic acid is not detectable in Chlamydia psittaci or Chlamydia trachomatis by gas chromatography-mass spectrometry. *Infect Immun.* 58, 835-7.
- Frikha-Gargouri, O., Gdoura, R., Znazen, A., Gargouri, B., Gargouri, J., Rebai, A., and Hammami, A., 2008. Evaluation of an in silico predicted specific and immunogenic antigen from the OmcB protein for the serodiagnosis of Chlamydia trachomatis infections. *BMC Microbiol.* 8, 217.
- Frothingham, R., and Meeker-O'Connell, W. A., 1998. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology.* 144 (Pt 5), 1189-96.

- Frutos, R., Pages, M., Bellis, M., Roizes, G., and Bergoin, M., 1989. Pulsed-field gel electrophoresis determination of the genome size of obligate intracellular bacteria belonging to the genera *Chlamydia*, *Rickettsiella*, and *Parachlamydia*. *J Bacteriol.* 171, 4511-3.
- Fukushi, H., and Hirai, K., 1992. Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int J Syst Bacteriol.* 42, 306-8.
- Fukushi, H., and Hirai, K., 1993. *Chlamydia pecorum*--the fourth species of genus *Chlamydia*. *Microbiol Immunol.* 37, 516-22.
- Geens, T., Desplanques, A., Van Loock, M., Bonner, B. M., Kaleta, E. F., Magnino, S., Andersen, A. A., Everett, K. D., and Vanrompay, D., 2005. Sequencing of the *Chlamydophila psittaci* *ompA* gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. *J Clin Microbiol.* 43, 2456-61.
- Geisler, W. M., Suchland, R. J., Rockey, D. D., and Stamm, W. E., 2001. Epidemiology and clinical manifestations of unique *Chlamydia trachomatis* isolates that occupy nonfusogenic inclusions. *J Infect Dis.* 184, 879-84.
- Giles, D. K., and Wyrick, P. B., 2008. Trafficking of chlamydial antigens to the endoplasmic reticulum of infected epithelial cells. *Microbes Infect.* 10, 1494-503.
- Godin, A. C., Bjorkman, C., Englund, S., Johansson, K. E., Niskanen, R., and Alenius, S., 2008. Investigation of *Chlamydophila* spp. in dairy cows with reproductive disorders. *Acta Vet Scand.* 50, 39.
- Gomes, J. P., Nunes, A., Bruno, W. J., Borrego, M. J., Florindo, C., and Dean, D., 2006. Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* across all serovars: evidence for serovar Da recombination and correlation with tissue tropism. *J Bacteriol.* 188, 275-86.
- Gordon, F. B., and Quan, A. L., 1965a. Isolation of the Trachoma Agent in Cell Culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 118, 354-9.
- Gordon, F. B., and Quan, A. L., 1965b. Occurrence of Glycogen in Inclusions of the Psittacosis-Lymphogranuloma Venereum-Trachoma Agents. *J Infect Dis.* 115, 186-96.
- Gravekamp, C., Rosner, B., and Madoff, L. C., 1998. Deletion of repeats in the alpha C protein enhances the pathogenicity of group B streptococci in immune mice. *Infect Immun.* 66, 4347-54.
- Grayston, J. T., Wang, S. P., Kuo, C. C., and Campbell, L. A., 1989. Current knowledge on *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 8, 191-202.

- Greco, G., Corrente, M., Buonavoglia, D., Campanile, G., Di Palo, R., Martella, V., Bellacicco, A. L., D'Abramo, M., and Buonavoglia, C., 2008. Epizootic abortion related to infections by *Chlamydophila abortus* and *Chlamydophila pecorum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 69, 1061-9.
- Griffiths, P. C., Plater, J. M., Horigan, M. W., Rose, M. P., Venables, C., and Dawson, M., 1996. Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by comparative inclusion immunofluorescence assay, recombinant lipopolysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay, and complement fixation test. *J Clin Microbiol*. 34, 1512-8.
- Grimwood, J., Olinger, L., and Stephens, R. S., 2001. Expression of *Chlamydia pneumoniae* polymorphic membrane protein family genes. *Infect Immun*. 69, 2383-9.
- Grimwood, J., and Stephens, R. S., 1999. Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Comp Genomics*. 4, 187-201.
- Gupta, R. S., and Griffiths, E., 2006. Chlamydiae-specific proteins and indels: novel tools for studies. *Trends Microbiol*. 14, 527-35.
- Guttman, D. S., and Dykhuizen, D. E., 1994. Clonal divergence in *Escherichia coli* as a result of recombination, not mutation. *Science*. 266, 1380-3.
- Hackstadt, T., Brickman, T. J., Barry, C. E., 3rd, and Sager, J., 1993. Diversity in the *Chlamydia trachomatis* histone homologue Hc2. *Gene*. 132, 137-41.
- Hackstadt, T., Fischer, E. R., Scidmore, M. A., Rockey, D. D., and Heinzen, R. A., 1997. Origins and functions of the chlamydial inclusion. *Trends Microbiol*. 5, 288-93.
- Hackstadt, T., Scidmore-Carlson, M. A., Shaw, E. I., and Fischer, E. R., 1999. The *Chlamydia trachomatis* IncA protein is required for homotypic vesicle fusion. *Cell Microbiol*. 1, 119-30.
- Haferkamp, I., Schmitz-Esser, S., Wagner, M., Neigel, N., Horn, M., and Neuhaus, H. E., 2006. Tapping the nucleotide pool of the host: novel nucleotide carrier proteins of *Protochlamydia amoebophila*. *Mol Microbiol*. 60, 1534-45.
- Halberstadter, L., and von Prowazek, S., 1907. Über zellieinschlüsse parasitärer natur beim trachom. *Arb. Gesundheitsamt Berlin*. 26, 44-47.
- Hammerschlag, M. R., 2000. *Chlamydia pneumoniae* and the lung. *Eur Respir J*. 16, 1001-7.
- Hammerschlag, M. R., 2002. Effect of azithromycin on endothelial function of patients with coronary artery disease and evidence of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Circulation*. 106, e65-6; author reply e65-6.

- Hanuszkiewicz, A., Hubner, G., Vinogradov, E., Lindner, B., Brade, L., Brade, H., Debarry, J., Heine, H., and Holst, O., 2008. Structural and immunochemical analysis of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter lwoffii* F78 located outside Chlamydiaceae with a Chlamydia-specific lipopolysaccharide epitope. *Chemistry*. 14, 10251-8.
- Hartley, J. C., Stevenson, S., Robinson, A. J., Littlewood, J. D., Carder, C., Cartledge, J., Clark, C., and Ridgway, G. L., 2001. Conjunctivitis due to *Chlamydophila felis* (*Chlamydia psittaci* feline pneumonitis agent) acquired from a cat: case report with molecular characterization of isolates from the patient and cat. *J Infect*. 43, 7-11.
- Hatch, T. P., 1996. Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae? *J Bacteriol*. 178, 1-5.
- Hatch, T. P., Al-Hossainy, E., and Silverman, J. A., 1982. Adenine nucleotide and lysine transport in *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol*. 150, 662-70.
- Hatch, T. P., Miceli, M., and Sublett, J. E., 1986. Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during the developmental cycle of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol*. 165, 379-85.
- Hatch, T. P., Vance, D. W., Jr., and Al-Hossainy, E., 1981. Attachment of *Chlamydia psittaci* to formaldehyde-fixed and unfixed L cells. *J Gen Microbiol*. 125, 273-83.
- Hechard, C., Grepinet, O., and Rodolakis, A., 2003a. Evaluation of protection against *Chlamydophila abortus* challenge after DNA immunization with the major outer-membrane protein-encoding gene in pregnant and non-pregnant mice. *J Med Microbiol*. 52, 35-40.
- Hechard, C., Grepinet, O., and Rodolakis, A., 2003b. Proteic boost enhances humoral response induced by DNA vaccination with the *dnaK* gene of *Chlamydophila abortus* but fails to protect pregnant mice against a virulence challenge. *Vet Res*. 34, 119-25.
- Hechard, C., Grepinet, O., and Rodolakis, A., 2004. Molecular cloning of the *Chlamydophila abortus* *groEL* gene and evaluation of its protective efficacy in a murine model by genetic vaccination. *J Med Microbiol*. 53, 861-8.
- Heine, H., Gronow, S., Zamyatina, A., Kosma, P., and Brade, H., 2007. Investigation on the agonistic and antagonistic biological activities of synthetic *Chlamydia* lipid A and its use in in vitro enzymatic assays. *J Endotoxin Res*. 13, 126-32.
- Henderson, I. R., and Lam, A. C., 2001. Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp.--autotransporters beyond the Proteobacteria. *Trends Microbiol*. 9, 573-8.
- Henderson, I. R., Owen, P., and Nataro, J. P., 1999. Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol*. 33, 919-32.

- Hesse, L., Bostock, J., Dementin, S., Blanot, D., Mengin-Lecreulx, D., and Chopra, I., 2003. Functional and biochemical analysis of *Chlamydia trachomatis* MurC, an enzyme displaying UDP-N-acetylmuramate:amino acid ligase activity. *J Bacteriol.* 185, 6507-12.
- Hoare, A., Timms, P., Bavoil, P. M., and Wilson, D. P., 2008. Spatial constraints within the chlamydial host cell inclusion predict interrupted development and persistence. *BMC Microbiol.* 8, 5.
- Hodinka, R. L., Davis, C. H., Choong, J., and Wyrick, P. B., 1988. Ultrastructural study of endocytosis of *Chlamydia trachomatis* by McCoy cells. *Infect Immun.* 56, 1456-63.
- Hoelzle, L. E., Hoelzle, K., and Wittenbrink, M. M., 2003. Expression of the major outer membrane protein (MOMP) of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum*, and *Chlamydia suis* in *Escherichia coli* using an arabinose-inducible plasmid vector. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 50, 383-9.
- Hoelzle, L. E., Hoelzle, K., and Wittenbrink, M. M., 2004. Recombinant major outer membrane protein (MOMP) of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum*, and *Chlamydia suis* as antigens to distinguish chlamydial species-specific antibodies in animal sera. *Vet Microbiol.* 103, 85-90.
- Hogan, R. J., Mathews, S. A., Kutlin, A., Hammerschlag, M. R., and Timms, P., 2003. Differential expression of genes encoding membrane proteins between acute and continuous *Chlamydia pneumoniae* infections. *Microb Pathog.* 34, 11-6.
- Hogan, R. J., Mathews, S. A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J. T., and Timms, P., 2004. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun.* 72, 1843-55.
- Hsia, R., Ohayon, H., Gounon, P., Dautry-Varsat, A., and Bavoil, P. M., 2000. Phage infection of the obligate intracellular bacterium, *Chlamydia psittaci* strain guinea pig inclusion conjunctivitis. *Microbes Infect.* 2, 761-72.
- Huang, J., Lesser, C. F., and Lory, S., 2008. The essential role of the CopN protein in *Chlamydia pneumoniae* intracellular growth. *Nature.* 456, 112-5.
- Hueck, C. J., 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 379-433.
- Hunter, P. R., and Gaston, M. A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 26, 2465-6.
- Huston, W. M., Theodoropoulos, C., Mathews, S. A., and Timms, P., 2008. *Chlamydia trachomatis* responds to heat shock, penicillin induced persistence, and IFN-gamma

- persistence by altering levels of the extracytoplasmic stress response protease HtrA. *BMC Microbiol.* 8, 190.
- Ifere, G. O., He, Q., Igietseme, J. U., Ananaba, G. A., Lyn, D., Lubitz, W., Kellar, K. L., Black, C. M., and Eko, F. O., 2007. Immunogenicity and protection against genital Chlamydia infection and its complications by a multisubunit candidate vaccine. *J Microbiol Immunol Infect.* 40, 188-200.
- Iliffe-Lee, E. R., and McClarty, G., 1999. Glucose metabolism in *Chlamydia trachomatis*: the 'energy parasite' hypothesis revisited. *Mol Microbiol.* 33, 177-87.
- Jackson, M., White, N., Giffard, P., and Timms, P., 1999. Epizootiology of Chlamydia infections in two free-range koala populations. *Vet Microbiol.* 65, 255-64.
- Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M., and Kersters, K., 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology.* 142 (Pt 7), 1881-93.
- Jee, J., Degraives, F. J., Kim, T., and Kaltenboeck, B., 2004. High prevalence of natural *Chlamydophila* species infection in calves. *J Clin Microbiol.* 42, 5664-72.
- Jewett, T. J., Fischer, E. R., Mead, D. J., and Hackstadt, T., 2006. Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 15599-604.
- Jones, G. E., Low, J. C., Machell, J., and Armstrong, K., 1997. Comparison of five tests for the detection of antibodies against chlamydial (enzootic) abortion of ewes. *Vet Rec.* 141, 164-8.
- Jorgensen, I., and Valdivia, R. H., 2008. Pmp-like proteins Pls1 and Pls2 are secreted into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* inclusion. *Infect Immun.* 76, 3940-50.
- Joseph, T., Nano, F. E., Garon, C. F., and Caldwell, H. D., 1986. Molecular characterization of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* plasmids. *Infect Immun.* 51, 699-703.
- Joseph, T. D., and Bose, S. K., 1991. A heat-labile protein of *Chlamydia trachomatis* binds to HeLa cells and inhibits the adherence of chlamydiae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 4054-8.
- Joseph, T. D., and Bose, S. K., 1992. Surface components of HeLa cells that inhibit cytodherence of *Chlamydia trachomatis*. *FEMS Microbiol Lett.* 70, 177-80.
- Juul, N., Timmerman, E., Gevaert, K., Christiansen, G., and Birkelund, S., 2007. Proteolytic cleavage of the *Chlamydia pneumoniae* major outer membrane protein in the absence of Pmp10. *Proteomics.* 7, 4477-87.

- Kahane, S., and Friedman, M. G., 1992. Reversibility of heat shock in *Chlamydia trachomatis*. *FEMS Microbiol Lett.* 76, 25-30.
- Kaleta, E. F., and Taday, E. M., 2003. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.* 32, 435-61.
- Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Hyman, R. W., Olinger, L., Grimwood, J., Davis, R. W., and Stephens, R. S., 1999. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet.* 21, 385-9.
- Kaltenboeck, B., Heard, D., DeGraves, F. J., and Schmeer, N., 1997. Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies against abortigenic *Chlamydia psittaci* in ruminants. *J Clin Microbiol.* 35, 2293-8.
- Kaltenboeck, B., Hehnen, H. R., and Vaglenov, A., 2005. Bovine *Chlamydophila* spp. infection: do we underestimate the impact on fertility? *Vet Res Commun.* 29 Suppl 1, 1-15.
- Kaltenboeck, B., Heinen, E., Schneider, R., Wittenbrink, M. M., and Schmeer, N., 2009. *OmpA* and antigenic diversity of bovine *Chlamydophila pecorum* strains. *Vet Microbiol.* 135, 175-80.
- Kaltenboeck, B., Kousoulas, K. G., and Storz, J., 1992. Two-step polymerase chain reactions and restriction endonuclease analyses detect and differentiate *ompA* DNA of *Chlamydia* spp. *J Clin Microbiol.* 30, 1098-104.
- Kaltenboeck, B., Kousoulas, K. G., and Storz, J., 1993. Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (*ompA*) genes of the four chlamydial species. *J Bacteriol.* 175, 487-502.
- Kaltenboeck, B., and Storz, J., 1992. Biological properties and genetic analysis of the *ompA* locus in chlamydiae isolated from swine. *Am J Vet Res.* 53, 1482-7.
- Karimi, S. T., Schloemer, R. H., and Wilde, C. E., 3rd, 1989. Accumulation of chlamydial lipopolysaccharide antigen in the plasma membranes of infected cells. *Infect Immun.* 57, 1780-5.
- Kauffold, J., Henning, K., Bachmann, R., Hotzel, H., and Melzer, F., 2007. The prevalence of chlamydiae of bulls from six bull studs in Germany. *Anim Reprod Sci.* 102, 111-21.
- Kauffold, J., Melzer, F., Henning, K., Schulze, K., Leiding, C., and Sachse, K., 2006. Prevalence of chlamydiae in boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology.* 65, 1750-8.

- Kawa, D. E., and Stephens, R. S., 2002. Antigenic topology of chlamydial PorB protein and identification of targets for immune neutralization of infectivity. *J Immunol.* 168, 5184-91.
- Kawana, K., Quayle, A. J., Ficarra, M., Ibane, J. A., Shen, L., Kawana, Y., Yang, H., Marrero, L., Yavagal, S., Greene, S. J., Zhang, Y. X., Pyles, R. B., Blumberg, R. S., and Schust, D. J., 2007. CD1d degradation in *Chlamydia trachomatis*-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity. *J Biol Chem.* 282, 7368-75.
- Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J., and Hugh-Jones, M. E., 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.* 182, 2928-36.
- Kiselev, A. O., Stamm, W. E., Yates, J. R., and Lampe, M. F., 2007. Expression, processing, and localization of PmpD of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 during the chlamydial developmental cycle. *PLoS ONE.* 2, e568.
- Kleba, B., and Stephens, R. S., 2008. Chlamydial effector proteins localized to the host cell cytoplasmic compartment. *Infect Immun.* 76, 4842-50.
- Klint, M., Fuxelius, H. H., Goldkuhl, R. R., Skarin, H., Rutemark, C., Andersson, S. G., Persson, K., and Herrmann, B., 2007. High-Resolution Genotyping of *Chlamydia trachomatis* Strains by Multilocus Sequence Analysis. *J Clin Microbiol.*
- Klos, A., Thalmann, J., Peters, J., Gerard, H. C., and Hudson, A. P., 2009. The transcript profile of persistent *Chlamydia pneumoniae* in vitro depends on the means by which persistence is induced. *FEMS Microbiol Lett.* 291, 120-6.
- Koehler, L., Nettelbreker, E., Hudson, A. P., Ott, N., Gerard, H. C., Branigan, P. J., Schumacher, H. R., Drommer, W., and Zeidler, H., 1997. Ultrastructural and molecular analyses of the persistence of *Chlamydia trachomatis* (serovar K) in human monocytes. *Microb Pathog.* 22, 133-42.
- Korman, T. M., Turnidge, J. D., and Grayson, M. L., 1997. Neurological complications of chlamydial infections: case report and review. *Clin Infect Dis.* 25, 847-51.
- Kosma, P., 1999. Chlamydial lipopolysaccharide. *Biochim Biophys Acta.* 1455, 387-402.
- Kubo, A., and Stephens, R. S., 2000. Characterization and functional analysis of PorB, a *Chlamydia* porin and neutralizing target. *Mol Microbiol.* 38, 772-80.
- Kubo, A., and Stephens, R. S., 2001. Substrate-specific diffusion of select dicarboxylates through *Chlamydia trachomatis* PorB. *Microbiology.* 147, 3135-40.

- Kuo, C., Takahashi, N., Swanson, A. F., Ozeki, Y., and Hakomori, S., 1996. An N-linked high-mannose type oligosaccharide, expressed at the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*, mediates attachment and infectivity of the microorganism to HeLa cells. *J Clin Invest.* 98, 2813-8.
- Kuo, C. C., Jackson, L. A., Campbell, L. A., and Grayston, J. T., 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev.* 8, 451-61.
- Kutlin, A., Flegg, C., Stenzel, D., Reznik, T., Roblin, P. M., Mathews, S., Timms, P., and Hammerschlag, M. R., 2001. Ultrastructural study of *Chlamydia pneumoniae* in a continuous-infection model. *J Clin Microbiol.* 39, 3721-3.
- Kutlin, A., Roblin, P. M., Kumar, S., Kohlhoff, S., Bodetti, T., Timms, P., and Hammerschlag, M. R., 2007. Molecular characterization of *Chlamydophila pneumoniae* isolates from Western barred bandicoots. *J Med Microbiol.* 56, 407-17.
- Kyte, J., and Doolittle, R. F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 157, 105-32.
- Laroucau, K., Souriau, A., and Rodolakis, A., 2001. Improved sensitivity of PCR for *Chlamydophila* using *pmp* genes. *Vet Microbiol.* 82, 155-64.
- Laroucau, K., Thierry, S., Vorimore, F., Blanco, K., Kaleta, E., Hoop, R., Magnino, S., Vanrompay, D., Sachse, K., Myers, G. S., Bavoil, P. M., Vergnaud, G., and Pourcel, C., 2008. High resolution typing of *Chlamydophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). *Infect Genet Evol.* 8, 171-81.
- Laroucau, K., Vorimore, F., Bertin, C., Yousef Mohamad, K., Thierry, S., Hermann, W., Maingourd, C., Pourcel, C., Longbottom, D., Magnino, S., Sachse, K., Vretou, E., and Rodolakis, A., 2009. Genotyping of *Chlamydophila abortus* strains by multilocus VNTR analysis. *Vet Microbiol.*
- Larsen, B., Birkelund, S., Mordhorst, C. H., Ejstrup, L., Andersen, L. S., and Christiansen, G., 1994. The humoral immune response to *Chlamydia trachomatis* in patients with acute reactive arthritis. *Br J Rheumatol.* 33, 534-40.
- Lasa, I., David, V., Gouin, E., Marchand, J. B., and Cossart, P., 1995. The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator. *Mol Microbiol.* 18, 425-36.
- LaVerda, D., Albanese, L. N., Ruther, P. E., Morrison, S. G., Morrison, R. P., Ault, K. A., and Byrne, G. I., 2000. Seroreactivity to *Chlamydia trachomatis* Hsp10 correlates with severity of human genital tract disease. *Infect Immun.* 68, 303-9.

- LaVerda, D., Kalayoglu, M. V., and Byrne, G. I., 1999. Chlamydial heat shock proteins and disease pathology: new paradigms for old problems? *Infect Dis Obstet Gynecol.* 7, 64-71.
- Lepinay, A., Robineaux, R., Orfila, J., Orme-Rosselli, L., and Boutry, J. M., 1971. [Ultrastructure and cytochemistry of *Chlamydia Psittaci*]. *Arch Gesamte Virusforsch.* 33, 271-80.
- Levy, N. J., and Moulder, J. W., 1982. Attachment of cell walls of *Chlamydia psittaci* to mouse fibroblasts (L cells). *Infect Immun.* 37, 1059-65.
- Li, Z., Chen, C., Chen, D., Wu, Y., Zhong, Y., and Zhong, G., 2008. Characterization of fifty putative inclusion membrane proteins encoded in the *Chlamydia trachomatis* genome. *Infect Immun.* 76, 2746-57.
- Liu, Z., Rank, R., Kaltenboeck, B., Magnino, S., Dean, D., Burall, L., Plaut, R. D., Read, T. D., Myers, G., and Bavoil, P. M., 2007. Genomic plasticity of the *rrn-nqrF* intergenic segment in the *Chlamydiaceae*. *J Bacteriol.* 189, 2128-32.
- Longbottom, D., 2004. Chlamydial infections of domestic ruminants and swine: new nomenclature and new knowledge. *Vet J.* 168, 9-11.
- Longbottom, D., and Coulter, L. J., 2003. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J Comp Pathol.* 128, 217-44.
- Longbottom, D., Findlay, J., Vretou, E., and Dunbar, S. M., 1998. Immunoelectron microscopic localisation of the OMP90 family on the outer membrane surface of *Chlamydia psittaci*. *FEMS Microbiol Lett.* 164, 111-7.
- Longbottom, D., Russell, M., Jones, G. E., Lainson, F. A., and Herring, A. J., 1996. Identification of a multigene family coding for the 90 kDa proteins of the ovine abortion subtype of *Chlamydia psittaci*. *FEMS Microbiol Lett.* 142, 277-81.
- Lundemose, A. G., Birkelund, S., Fey, S. J., Larsen, P. M., and Christiansen, G., 1991. *Chlamydia trachomatis* contains a protein similar to the *Legionella pneumophila* mip gene product. *Mol Microbiol.* 5, 109-15.
- Lundemose, A. G., Kay, J. E., and Pearce, J. H., 1993a. *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein has peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity that is inhibited by FK506 and rapamycin and is implicated in initiation of chlamydial infection. *Mol Microbiol.* 7, 777-83.
- Lundemose, A. G., Rouch, D. A., Birkelund, S., Christiansen, G., and Pearce, J. H., 1992. *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein. *Mol Microbiol.* 6, 2539-48.

- Lundemose, A. G., Rouch, D. A., Penn, C. W., and Pearce, J. H., 1993b. The *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein is a lipoprotein. *J Bacteriol.* 175, 3669-71.
- Luo, J., Jia, T., Flores, R., Chen, D., and Zhong, G., 2007a. Hypothetical protein Cpn0308 is localized in the *Chlamydia pneumoniae* inclusion membrane. *Infect Immun.* 75, 497-503.
- Luo, J., Jia, T., Zhong, Y., Chen, D., Flores, R., and Zhong, G., 2007b. Localization of the hypothetical protein Cpn0585 in the inclusion membrane of *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. *Microb Pathog.* 42, 111-6.
- Luo, J., Liu, G., Zhong, Y., Jia, T., Liu, K., Chen, D., and Zhong, G., 2007c. Characterization of hypothetical proteins Cpn0146, 0147, 0284 & 0285 that are predicted to be in the *Chlamydia pneumoniae* inclusion membrane. *BMC Microbiol.* 7, 38.
- Macmillan, L., Ifere, G. O., He, Q., Igietseme, J. U., Kellar, K. L., Okenu, D. M., and Eko, F. O., 2007. A recombinant multivalent combination vaccine protects against *Chlamydia* and genital herpes. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 49, 46-55.
- Madoff, L. C., Michel, J. L., Gong, E. W., Kling, D. E., and Kasper, D. L., 1996. Group B streptococci escape host immunity by deletion of tandem repeat elements of the alpha C protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 4131-6.
- Magnino, S., Giovannini, S., Paoli, C., Ardenghi, P., and Sambri, V., 2005. Evaluation of an automated complement fixation test (Seramat) for the detection of chlamydial antibodies in sheep and goat sera. *Vet Res Commun.* 29 Suppl 1, 157-61.
- Magnino, S., Haag-Wackernagel, D., Geigenfeind, I., Helmecke, S., Dovc, A., Prukner-Radovic, E., Residbegovic, E., Ilieski, V., Laroucau, K., Donati, M., Martinov, S., and Kaleta, E. F., 2009. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. *Vet Microbiol.* 135, 54-67.
- Maiden, M. C., 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 60, 561-88.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., and Spratt, B. G., 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 3140-5.
- Markey, B. K., McNulty, M. S., and Todd, D., 1993. Comparison of serological tests for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection of sheep. *Vet Microbiol.* 36, 233-52.

- Mathews, S., George, C., Flegg, C., Stenzel, D., and Timms, P., 2001. Differential expression of *ompA*, *ompB*, *pyk*, *nlpD* and *Cpn0585* genes between normal and interferon-gamma treated cultures of *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Pathog.* 30, 337-45.
- Matsumoto, A., 1981. Electron microscopic observations of surface projections and related intracellular structures of *Chlamydia* organisms. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 30, 315-20.
- Matsumoto, A., 1982a. Electron microscopic observations of surface projections on *Chlamydia psittaci* reticulate bodies. *J Bacteriol.* 150, 358-64.
- Matsumoto, A., 1982b. Surface projections of *Chlamydia psittaci* elementary bodies as revealed by freeze-deep-etching. *J Bacteriol.* 151, 1040-2.
- Matsumoto, A., Fujiwara, E., and Higashi, N., 1976. Observations of the surface projections of infectious small cell of *Chlamydia psittaci* in thin sections. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 25, 169-70.
- Matsumoto, A., and Manire, G. P., 1970. Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol.* 101, 278-85.
- Maurer, A. P., Mehltitz, A., Mollenkopf, H. J., and Meyer, T. F., 2007. Gene expression profiles of *Chlamydia pneumoniae* during the developmental cycle and iron depletion-mediated persistence. *PLoS Pathog.* 3, e83.
- McCauley, L. M., Lancaster, M. J., Young, P., Butler, K. L., and Ainsworth, C. G., 2007. Comparison of ELISA and CFT assays for *Chlamydia abortus* antibodies in ovine sera. *Aust Vet J.* 85, 325-8.
- McClenaghan, M., Herring, A. J., and Aitken, I. D., 1984. Comparison of *Chlamydia psittaci* isolates by DNA restriction endonuclease analysis. *Infect Immun.* 45, 384-9.
- McColl, K. A., Martin, R. W., Gleeson, L. J., Handasyde, K. A., and Lee, A. K., 1984. *Chlamydia* infection and infertility in the female koala (*Phascolarctos cinereus*). *Vet Rec.* 115, 655.
- McCoy, A. J., Adams, N. E., Hudson, A. O., Gilvarg, C., Leustek, T., and Maurelli, A. T., 2006. L,L-diaminopimelate aminotransferase, a trans-kingdom enzyme shared by *Chlamydia* and plants for synthesis of diaminopimelate/lysine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 17909-14.
- McCoy, A. J., and Maurelli, A. T., 2005. Characterization of *Chlamydia* MurC-Ddl, a fusion protein exhibiting D-alanyl-D-alanine ligase activity involved in peptidoglycan synthesis and D-cycloserine sensitivity. *Mol Microbiol.* 57, 41-52.

- McCoy, A. J., Sandlin, R. C., and Maurelli, A. T., 2003. In vitro and in vivo functional activity of *Chlamydia* MurA, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase involved in peptidoglycan synthesis and fosfomycin resistance. *J Bacteriol.* 185, 1218-28.
- McNutt, S. H., and Waller, E. F., 1940. Sporadic bovine encephalomyelitis (Buss disease). *Cornell Vet.* 30, 437- 448.
- Meijer, A., Morre, S. A., van den Brule, A. J., Savelkoul, P. H., and Ossewaarde, J. M., 1999. Genomic relatedness of *Chlamydia* isolates determined by amplified fragment length polymorphism analysis. *J Bacteriol.* 181, 4469-75.
- Menard, A., Clerc, M., Subtil, A., Megraud, F., Bebear, C., and de Barbeyrac, B., 2006. Development of a real-time PCR for the detection of *Chlamydia psittaci*. *J Med Microbiol.* 55, 471-3.
- Mitchell, C. M., Mathews, S. A., Theodoropoulos, C., and Timms, P., 2009a. In vitro characterisation of koala *Chlamydia pneumoniae*: Morphology, inclusion development and doubling time. *Vet Microbiol.* 136, 91-9.
- Mitchell, S. L., Wolff, B. J., Thacker, W. L., Ciembor, P. G., Gregory, C. R., Everett, K. D., Ritchie, B. W., and Winchell, J. M., 2009b. Genotyping of *Chlamydia psittaci* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol.* 47, 175-81.
- Moelleken, K., and Hegemann, J. H., 2008. The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding. *Mol Microbiol.* 67, 403-19.
- Monecke, S., Helbig, J. H., and Jacobs, E., 2003. Phase variation of the multiple banded protein in *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. *Int J Med Microbiol.* 293, 203-11.
- Morange, A., 1895. De la psittacose, ou infection spéciale déterminée par les perruches. Thèse. Paris.
- Morre, S. A., Ossewaarde, J. M., Savelkoul, P. H., Stoof, J., Meijer, C. J., and van den Brule, A. J., 2000. Analysis of genetic heterogeneity in *Chlamydia trachomatis* clinical isolates of serovars D, E, and F by amplified fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 38, 3463-6.
- Moshkovsky, S. D., 1945. The cytotropic agents of infections and the position of the rickettsiae in the system of Chlamydozoa. *Uspekhi Souremennoi Biologii (Advances in Modern Biology).* 19, 1-44.

- Moulder, J. W., 1966. The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses. *Annu Rev Microbiol.* 20, 107-30.
- Moulder, J. W., 1982. The relation of basic biology to pathogenic potential in the genus Chlamydia. *Infection.* 10 Suppl 1, S10-8.
- Moulder, J. W., 1983. Inhibition of onset of overt multiplication of Chlamydia psittaci in persistently infected mouse fibroblasts (L cells). *Infect Immun.* 39, 898-907.
- Moulder, J. W., 1991. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev.* 55, 143-90.
- Mpiga, P., and Ravaoarinoro, M., 2006. Chlamydia trachomatis persistence: an update. *Microbiol Res.* 161, 9-19.
- Mukhopadhyay, S., Miller, R. D., Sullivan, E. D., Theodoropoulos, C., Mathews, S. A., Timms, P., and Summersgill, J. T., 2006. Protein expression profiles of Chlamydia pneumoniae in models of persistence versus those of heat shock stress response. *Infect Immun.* 74, 3853-63.
- Muller-Loennies, S., Gronow, S., Brade, L., MacKenzie, R., Kosma, P., and Brade, H., 2006. A monoclonal antibody against a carbohydrate epitope in lipopolysaccharide differentiates Chlamydophila psittaci from Chlamydophila pecorum, Chlamydophila pneumoniae, and Chlamydia trachomatis. *Glycobiology.* 16, 184-96.
- Mygind, P., Christiansen, G., and Birkelund, S., 1998a. Topological analysis of Chlamydia trachomatis L2 outer membrane protein 2. *J Bacteriol.* 180, 5784-7.
- Mygind, P., Christiansen, G., Persson, K., and Birkelund, S., 1998b. Analysis of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 5, 313-8.
- Mygind, T., Vandahl, B., Pedersen, A. S., Christiansen, G., Hollsberg, P., and Birkelund, S., 2004. Identification of an in vivo CD4+ T cell-mediated response to polymorphic membrane proteins of Chlamydia pneumoniae during experimental infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 40, 129-37.
- Neff, L., Daher, S., Muzzin, P., Spenato, U., Gulacar, F., Gabay, C., and Bas, S., 2007. Molecular characterization and subcellular localization of macrophage infectivity potentiator, a Chlamydia trachomatis lipoprotein. *J Bacteriol.* 189, 4739-48.
- Newhall, W. J. t., 1987. Biosynthesis and disulfide cross-linking of outer membrane components during the growth cycle of Chlamydia trachomatis. *Infect Immun.* 55, 162-8.

- Niessner, A., Kaun, C., Zorn, G., Speidl, W., Turel, Z., Christiansen, G., Pedersen, A. S., Birkelund, S., Simon, S., Georgopoulos, A., Graninger, W., de Martin, R., Lipp, J., Binder, B. R., Maurer, G., Huber, K., and Wojta, J., 2003. Polymorphic membrane protein (PMP) 20 and PMP 21 of *Chlamydia pneumoniae* induce proinflammatory mediators in human endothelial cells in vitro by activation of the nuclear factor-kappaB pathway. *J Infect Dis.* 188, 108-13.
- Nietfeld, J. C., 2001. Chlamydial infections in small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 17, 301-14, vi.
- Nunes, A., Gomes, J. P., Mead, S., Florindo, C., Correia, H., Borrego, M. J., and Dean, D., 2007. Comparative expression profiling of the *Chlamydia trachomatis* pmp gene family for clinical and reference strains. *PLoS ONE.* 2, e878.
- Nurminen, M., Rietschel, E. T., and Brade, H., 1985. Chemical characterization of *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 48, 573-5.
- Ohya, K., Takahara, Y., Kuroda, E., Koyasu, S., Hagiwara, S., Sakamoto, M., Hisaka, M., Morizane, K., Ishiguro, S., Yamaguchi, T., and Fukushi, H., 2008. *Chlamydophila felis* CF0218 is a novel TMH family protein with potential as a diagnostic antigen for diagnosis of *C. felis* infection. *Clin Vaccine Immunol.* 15, 1606-15.
- Ojcius, D. M., Degani, H., Mispelter, J., and Dautry-Varsat, A., 1998. Enhancement of ATP levels and glucose metabolism during an infection by *Chlamydia*. NMR studies of living cells. *J Biol Chem.* 273, 7052-8.
- Orfila, J., 1982. [General characteristics of *Chlamydia*]. *Rev Int Trach Pathol Ocul Trop Subtrop Sante Publique.* 25-9.
- Page, L. A., 1966. Interspecies transfer of psittacosis-LGV-trachoma agents: pathogenicity of two avian and two mammalian strains for eight species of birds and mammals. *Am J Vet Res.* 27, 397-407.
- Pannekoek, Y., Morelli, G., Kusecek, B., Morre, S. A., Ossewaarde, J. M., Langerak, A. A., and van der Ende, A., 2008. Multi locus sequence typing of *Chlamydiales*: clonal groupings within the obligate intracellular bacteria *Chlamydia trachomatis*. *BMC Microbiol.* 8, 42.
- Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., and Sachse, K., 2008. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *Vet J.*

- Pantoja, L. G., Miller, R. D., Ramirez, J. A., Molestina, R. E., and Summersgill, J. T., 2001. Characterization of *Chlamydia pneumoniae* persistence in HEp-2 cells treated with gamma interferon. *Infect Immun.* 69, 7927-32.
- Park, S. H., Kwon, S. J., Lee, S. J., Kim, Y. C., Hwang, K. Y., Kang, Y. H., and Lee, K. J., 2009. Identification of immunogenic antigen candidate for *Chlamydia pneumoniae* diagnosis. *J Proteome Res.*
- Pedersen, A. S., Christiansen, G., and Birkelund, S., 2001. Differential expression of Pmp10 in cell culture infected with *Chlamydia pneumoniae* CWL029. *FEMS Microbiol Lett.* 203, 153-9.
- Pedersen, L. N., Podenphant, L., and Moller, J. K., 2008. Highly discriminative genotyping of *Chlamydia trachomatis* using *omp1* and a set of variable number tandem repeats. *Clin Microbiol Infect.* 14, 644-52.
- Penttila, T., Vuola, J. M., Puurula, V., Anttila, M., Sarvas, M., Rautonen, N., Makela, P. H., and Puolakkainen, M., 2000. Immunity to *Chlamydia pneumoniae* induced by vaccination with DNA vectors expressing a cytoplasmic protein (Hsp60) or outer membrane proteins (MOMP and *Omp2*). *Vaccine.* 19, 1256-65.
- Peters, J., Wilson, D. P., Myers, G., Timms, P., and Bavoil, P. M., 2007. Type III secretion in *Chlamydia*. *Trends Microbiol.* 15, 241-51.
- Peterson, E. M., and de la Maza, L. M., 1983. Characterization of *Chlamydia* DNA by restriction endonuclease cleavage. *Infect Immun.* 41, 604-8.
- Peterson, E. M., and de la Maza, L. M., 1988. *Chlamydia* parasitism: ultrastructural characterization of the interaction between the chlamydial cell envelope and the host cell. *J Bacteriol.* 170, 1389-92.
- Petrovay, F., and Balla, E., 2008. Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydia psittaci*. *J Med Microbiol.* 57, 1296-8.
- Philips, H. L., and Clarkson, M. J., 1998. Experimental infection of pregnant ewes with *Chlamydia pecorum*. *Infect Immun.* 66, 2818-21.
- Pirbhai, M., Dong, F., Zhong, Y., Pan, K. Z., and Zhong, G., 2006. The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *J Biol Chem.* 281, 31495-501.
- Polkinghorne, A., Borel, N., Becker, A., Lu, Z. H., Zimmermann, D. R., Brugnera, E., Pospischil, A., and Vaughan, L., 2009. Molecular evidence for chlamydial infections in the eyes of sheep. *Vet Microbiol.* 135, 142-6.

- Popov, V., Eb, F., Lefebvre, J. F., Orfila, J., and Viron, A., 1978. Morphological and cytochemical study of Chlamydia with EDTA regressive technique and Gautier staining in ultrathin frozen sections of infected cell cultures: a comparison with embedded material. *Ann Microbiol (Paris)*. 129 B, 313-37.
- Portig, I., Goodall, J. C., Bailey, R. L., and Gaston, J. S., 2003. Characterization of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2 in chlamydial infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 10, 103-7.
- Pospischil, A., Borel, N., Chowdhury, E. H., and Guscetti, F., 2009. Aberrant chlamydial developmental forms in the gastrointestinal tract of pigs spontaneously and experimentally infected with Chlamydia suis. *Vet Microbiol*. 135, 147-56.
- Pospischil, A., Thoma, R., Hilbe, M., Grest, P., Zimmermann, D., and Gebbers, J. O., 2002. [Abortion in humans caused by Chlamydophila abortus (Chlamydia psittaci serovar 1)]. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 144, 463-6.
- Prantner, D., and Nagarajan, U. M., 2009. Role for the chlamydial type III secretion apparatus in host cytokine expression. *Infect Immun*. 77, 76-84.
- Pudjiatmoko, Fukushima, H., Ochiai, Y., Yamaguchi, T., and Hirai, K., 1997. Diversity of feline Chlamydia psittaci revealed by random amplification of polymorphic DNA. *Vet Microbiol*. 54, 73-83.
- Rajalingam, K., Sharma, M., Paland, N., Hurwitz, R., Thieck, O., Oswald, M., Machuy, N., and Rudel, T., 2006. IAP-IAP complexes required for apoptosis resistance of C. trachomatis-infected cells. *PLoS Pathog*. 2, e114.
- Rake, G., McKee, C. M., and Shaffer, M. F., 1940. Agent of lymphogranuloma venereum in the yolk sac of the developing chick embryo. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 43, 332-334.
- Rake, G., Schaffer, M., and Thygeson, P., 1942. Relationship of agents of trachoma and inclusion conjunctivitis to those of lymphogranuloma-psittacosis group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 49, 545-547.
- Rank, R. G., Dascher, C., Bowlin, A. K., and Bavoil, P. M., 1995. Systemic immunization with Hsp60 alters the development of chlamydial ocular disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 36, 1344-51.
- Rank, R. G., and Sanders, M. M., 1992. Pathogenesis of endometritis and salpingitis in a guinea pig model of chlamydial genital infection. *Am J Pathol*. 140, 927-36.
- Raulston, J. E., 1997. Response of Chlamydia trachomatis serovar E to iron restriction in vitro and evidence for iron-regulated chlamydial proteins. *Infect Immun*. 65, 4539-47.

- Raulston, J. E., Davis, C. H., Paul, T. R., Hobbs, J. D., and Wyrick, P. B., 2002. Surface accessibility of the 70-kilodalton *Chlamydia trachomatis* heat shock protein following reduction of outer membrane protein disulfide bonds. *Infect Immun.* 70, 535-43.
- Read, T. D., Myers, G. S., Brunham, R. C., Nelson, W. C., Paulsen, I. T., Heidelberg, J., Holtzapple, E., Khouri, H., Federova, N. B., Carty, H. A., Umayam, L. A., Haft, D. H., Peterson, J., Beanan, M. J., White, O., Salzberg, S. L., Hsia, R. C., McClarty, G., Rank, R. G., Bavoil, P. M., and Fraser, C. M., 2003. Genome sequence of *Chlamydophila caviae* (*Chlamydia psittaci* GPIC): examining the role of niche-specific genes in the evolution of the Chlamydiaceae. *Nucleic Acids Res.* 31, 2134-47.
- Reinhold, P., Jaeger, J., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Bachmann, R., Schubert, E., Melzer, F., Elschner, M., and Sachse, K., 2007. Impact of latent infections with *Chlamydophila* species in young cattle. *Vet J.*
- Reinhold, P., Jaeger, J., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Bachmann, R., Schubert, E., Melzer, F., Elschner, M., and Sachse, K., 2008. Impact of latent infections with *Chlamydophila* species in young cattle. *Vet J.* 175, 202-11.
- Rekiki, A., Bouakane, A., Hammami, S., El Idrissi, A. H., Bernard, F., and Rodolakis, A., 2004. Efficacy of live *Chlamydophila abortus* vaccine 1B in protecting mice placentas and foetuses against strains of *Chlamydophila pecorum* isolated from cases of abortion. *Vet Microbiol.* 99, 295-9.
- Rhodes, A. J., and Van Rooyen, C. E., 1962. *Rhodes & van Rooyen: Textbook of virology* , 4th edition. The Williams and Wilkins company, Baltimore, Maryland, USA.
- Richmond, S. J., and Stirling, P., 1981. Localization of chlamydial group Antigen in McCoy cell monolayers infected with *Chlamydia trachomatis* or *Chlamydia psittaci*. *Infect Immun.* 34, 561-70.
- Roblin, P. M., Dumornay, W., and Hammerschlag, M. R., 1992. Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 30, 1968-71.
- Rockey, D. D., Grosenbach, D., Hruby, D. E., Peacock, M. G., Heinzen, R. A., and Hackstadt, T., 1997. *Chlamydia psittaci* IncA is phosphorylated by the host cell and is exposed on the cytoplasmic face of the developing inclusion. *Mol Microbiol.* 24, 217-28.
- Rockey, D. D., Heinzen, R. A., and Hackstadt, T., 1995. Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Mol Microbiol.* 15, 617-26.

- Rockey, D. D., and Rosquist, J. L., 1994. Protein antigens of *Chlamydia psittaci* present in infected cells but not detected in the infectious elementary body. *Infect Immun.* 62, 106-12.
- Rockey, D. D., Scidmore, M. A., Bannantine, J. P., and Brown, W. J., 2002. Proteins in the chlamydial inclusion membrane. *Microbes Infect.* 4, 333-40.
- Rodolakis, A., 1986. A mouse model for studying the invasive and abortive properties of ruminant isolates. Chlamydial diseases of ruminants. In Commission of the European Communities, Luxembourg. 133-137.
- Rodolakis, A., 1993. Les infections à *Chlamydia psittaci* : acquisition récentes et applications au diagnostic et à l'épidémiologie des chlamydioses aviaires, canines et félines. *Prac. Méd. Chir. Anim. Comp.* 28, 321-330.
- Rodolakis, A., Bernard, F., and Lantier, F., 1989. Mouse models for evaluation of virulence of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants. *Res Vet Sci.* 46, 34-9.
- Rodolakis, A., and Bernard, K., 1977. Isolation of *Chlamydia* from genital tract of rams affected by clinical epididymitis. *Bulletin Academie Veterinaire de France.* 50, 65-70.
- Rodolakis, A., and Chancerelle, L., 1977. [Plaque assay for *Chlamydia psittaci* in tissue samples (author's transl)]. *Ann Microbiol (Paris).* 128B, 81-5.
- Rodolakis, A., Salinas, J., and Papp, J., 1998. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet Res.* 29, 275-88.
- Rodolakis, A., and Souriau, A., 1992. Restriction endonuclease analysis of DNA from ruminant *Chlamydia psittaci* and its relation to mouse virulence. *Vet Microbiol.* 31, 263-71.
- Rodriguez, P., Allardet-Servent, A., de Barbeyrac, B., Ramuz, M., and Bebear, C., 1994. Genetic variability among *Chlamydia trachomatis* reference and clinical strains analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 32, 2921-8.
- Rogers, D. G., and Andersen, A. A., 1999. Conjunctivitis caused by a swine *Chlamydia trachomatis*-like organism in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest.* 11, 341-4.
- Rostand, K. S., and Esko, J. D., 1997. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect Immun.* 65, 1-8.
- Rzomp, K. A., Moorhead, A. R., and Scidmore, M. A., 2006. The GTPase Rab4 interacts with *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein CT229. *Infect Immun.* 74, 5362-73.
- Sachse, K., Grossmann, E., Berndt, A., Schutt, C., Henning, K., Theegarten, D., Anhenn, O., and Reinhold, P., 2004. Respiratory chlamydial infection based on experimental

- aerosol challenge of pigs with *Chlamydia suis*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 27, 7-23.
- Sachse, K., Hotzel, H., Slickers, P., Ellinger, T., and Ehricht, R., 2005. DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila* spp. *Mol Cell Probes*. 19, 41-50.
- Sachse, K., Laroucau, K., Hotzel, H., Schubert, E., Ehricht, R., and Slickers, P., 2008. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of *ompA* genes. *BMC Microbiol*. 8, 63.
- Sachse, K., Laroucau, K., Vorimore, F., Magnino, S., Feige, J., Muller, W., Kube, S., Hotzel, H., Schubert, E., Slickers, P., and Ehricht, R., 2009a. DNA microarray-based genotyping of *Chlamydophila psittaci* strains from culture and clinical samples. *Vet Microbiol*. 135, 22-30.
- Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A., and Longbottom, D., 2009b. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Vet Microbiol*. 135, 2-21.
- Salinas, J., Souriau, A., Cuello, F., and Rodolakis, A., 1995. Antigenic diversity of ruminant *Chlamydia psittaci* strains demonstrated by the indirect microimmunofluorescence test with monoclonal antibodies. *Vet Microbiol*. 43, 219-26.
- Salinas, J., Souriau, A., De Sa, C., Andersen, A. A., and Rodolakis, A., 1996. Serotype 2-specific antigens from ruminant strains of *Chlamydia pecorum* detected by monoclonal antibodies. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 19, 155-61.
- Salti-Montesanto, V., Tsoli, E., Papavassiliou, P., Psarrou, E., Markey, B. K., Jones, G. E., and Vretou, E., 1997. Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. *Am J Vet Res*. 58, 228-35.
- Sambri, V., Donati, M., Storni, E., Di Leo, K., Agnusdei, M., Petracca, R., Finco, O., Grandi, G., Ratti, G., and Cevenini, R., 2004. Experimental infection by *Chlamydia pneumoniae* in the hamster. *Vaccine*. 22, 1131-7.
- Sayada, C., Andersen, A. A., Storey, C., Milon, A., Eb, F., Hashimoto, N., Hirai, K., Elion, J., and Denamur, E., 1995. Usefulness of *omp1* restriction mapping for avian *Chlamydia psittaci* isolate differentiation. *Res Microbiol*. 146, 155-65.
- Schachter, J., Banks, J., Sugg, N., Sung, M., Storz, J., and Meyer, K. F., 1974. Serotyping of *Chlamydia*. I. Isolates of ovine origin. *Infect Immun*. 9, 92-4.

- Schachter, J., Banks, J., Sugg, N., Sung, M., Storz, J., and Meyer, K. F., 1975. Serotyping of Chlamydia: isolates of bovine origin. *Infect Immun.* 11, 904-7.
- Schachter, J., and Caldwell, H. D., 1980. Chlamydiae. *Annu Rev Microbiol.* 34, 285-309.
- Schachter, J., Stephens, R. S., Timms, P., Kuo, C., Bavoil, P. M., Birkelund, S., Boman, J., Caldwell, H., Campbell, L. A., Chernesky, M., Christiansen, G., Clarke, I. N., Gaydos, C., Grayston, J. T., Hackstadt, T., Hsia, R., Kaltenboeck, B., Leinonen, M., Ojcius, D., McClarty, G., Orfila, J., Peeling, R., Puolakkainen, M., Quinn, T. C., Rank, R. G., Raulston, J., Ridgeway, G. L., Saikku, P., Stamm, W. E., Taylor-Robinson, D. T., Wang, S. P., and Wyrick, P. B., 2001. Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51, 249; author reply 251-3.
- Schaeffer, A., and Henrich, B., 2008. Rapid detection of Chlamydia trachomatis and typing of the Lymphogranuloma venereum associated L-Serovars by TaqMan PCR. *BMC Infect Dis.* 8, 56.
- Schiller, I., Koesters, R., Weilenmann, R., Thoma, R., Kaltenboeck, B., Heitz, P., and Pospischil, A., 1997. Mixed infections with porcine Chlamydia trachomatis/pecorum and infections with ruminant Chlamydia psittaci serovar 1 associated with abortions in swine. *Vet Microbiol.* 58, 251-60.
- Schmiel, D. H., Knight, S. T., Raulston, J. E., Choong, J., Davis, C. H., and Wyrick, P. B., 1991. Recombinant Escherichia coli clones expressing Chlamydia trachomatis gene products attach to human endometrial epithelial cells. *Infect Immun.* 59, 4001-12.
- Schorey, J. S., Holsti, M. A., Ratliff, T. L., Allen, P. M., and Brown, E. J., 1996. Characterization of the fibronectin-attachment protein of Mycobacterium avium reveals a fibronectin-binding motif conserved among mycobacteria. *Mol Microbiol.* 21, 321-9.
- Scidmore, M. A., and Hackstadt, T., 2001. Mammalian 14-3-3beta associates with the Chlamydia trachomatis inclusion membrane via its interaction with IncG. *Mol Microbiol.* 39, 1638-50.
- Scidmore, M. A., Rockey, D. D., Fischer, E. R., Heinzen, R. A., and Hackstadt, T., 1996. Vesicular interactions of the Chlamydia trachomatis inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry. *Infect Immun.* 64, 5366-72.
- Scidmore-Carlson, M. A., Shaw, E. I., Dooley, C. A., Fischer, E. R., and Hackstadt, T., 1999. Identification and characterization of a Chlamydia trachomatis early operon encoding four novel inclusion membrane proteins. *Mol Microbiol.* 33, 753-65.

- Scieux, C., Grimont, F., Regnault, B., Bianchi, A., Kowalski, S., and Grimont, P. A., 1993. Molecular typing of *Chlamydia trachomatis* by random amplification of polymorphic DNA. *Res Microbiol.* 144, 395-404.
- Shaw, A. C., Christiansen, G., and Birkelund, S., 1999. Effects of interferon gamma on *Chlamydia trachomatis* serovar A and L2 protein expression investigated by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 20, 775-80.
- Siboulet, A., Catalan, F., Cohen, J., Erny, R., Henrion, R., and Tordjman, G., 1985. [Prevention of sexually transmissible diseases]. *Rev Infirm.* 35, 40-3.
- Sidi-Boumedine, K., 1996. Association of RAPD-PCR and specific DNA probes: method for detection and typing of ruminants chlamydial strains. 3^d meeting of the European society for *Chlamydia* research, Vienne, Autriche.
- Silberman, R., and Fiset, P., 1968. Method for counting Rickettsiae and Chlamydiae in purified suspensions. *J Bacteriol.* 95, 259-61.
- Skipp, P., Robinson, J., O'Connor, C. D., and Clarke, I. N., 2005. Shotgun proteomic analysis of *Chlamydia trachomatis*. *Proteomics.* 5, 1558-73.
- Souriau, A., Le Rouzic, E., Bernard, F., and Rodolakis, A., 1993. Differentiation of abortion-inducing and intestinal strains of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants by the microimmunofluorescence test. *Vet Rec.* 132, 217-9.
- Souriau, A., and Rodolakis, A., 1986. Rapid detection of *Chlamydia psittaci* in vaginal swabs of aborted ewes and goats by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Vet Microbiol.* 11, 251-9.
- Souriau, A., Salinas, J., De Sa, C., Layachi, K., and Rodolakis, A., 1994. Identification of subspecies- and serotype 1-specific epitopes on the 80- to 90-kilodalton protein region of *Chlamydia psittaci* that may be useful for diagnosis of chlamydial induced abortion. *Am J Vet Res.* 55, 510-4.
- Spears, P., and Storz, J., 1979. Biotyping of *Chlamydia psittaci* based on inclusion morphology and response to diethylaminoethyl-dextran and cycloheximide. *Infect Immun.* 24, 224-32.
- Sprague, L. D., Schubert, E., Hotzel, H., Scharf, S., and Sachse, K., 2008. The detection of *Chlamydophila psittaci* genotype C infection in dogs. *Vet J.*
- Stamm, W. E., 1990. Diagnostic tests should be used for sexually transmitted chlamydia. *West J Med.* 153, 559-60.
- Stamp, J. T., Mc, E. A., Watt, J. A., and Nisbet, D. I., 1950. Enzootic abortion in ewes; transmission of the disease. *Vet Rec.* 62, 251-4.

- Stamp, J. T., Watt, J. A., and Cockburn, R. B., 1952. Enzootic abortion in ewes; complement fixation test. *J Comp Pathol.* 62, 93-101.
- Stephens, R. S., Fawaz, F. S., Kennedy, K. A., Koshiyama, K., Nichols, B., van Ooij, C., and Engel, J. N., 2000. Eukaryotic cell uptake of heparin-coated microspheres: a model of host cell invasion by *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 68, 1080-5.
- Stephens, R. S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R. L., Zhao, Q., Koonin, E. V., and Davis, R. W., 1998. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science.* 282, 754-9.
- Stephens, R. S., Koshiyama, K., Lewis, E., and Kubo, A., 2001. Heparin-binding outer membrane protein of chlamydiae. *Mol Microbiol.* 40, 691-9.
- Stephens, R. S., Myers, G., Eppinger, M., and Bavoil, P. M., 2009. Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 55, 115-9.
- Stephens, R. S., Poteralski, J. M., and Olinger, L., 2006. Interaction of *Chlamydia trachomatis* with mammalian cells is independent of host cell surface heparan sulfate glycosaminoglycans. *Infect Immun.* 74, 1795-9.
- Stephens, R. S., Sanchez-Pescador, R., Wagar, E. A., Inouye, C., and Urdea, M. S., 1987. Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *J Bacteriol.* 169, 3879-85.
- Stephens, R. S., Tam, M. R., Kuo, C. C., and Nowinski, R. C., 1982. Monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis*: antibody specificities and antigen characterization. *J Immunol.* 128, 1083-9.
- Stephens, R. S., Wagar, E. A., and Schoolnik, G. K., 1988. High-resolution mapping of serovar-specific and common antigenic determinants of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J Exp Med.* 167, 817-31.
- Sting, R., and Hafez, H. M., 1992. Purification of *Chlamydia psittaci* antigen by affinity chromatography on polymyxin B agarose for use in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Zentralbl Bakteriologie.* 277, 436-45.
- Storey, C., Lusher, M., Yates, P., and Richmond, S., 1993. Evidence for *Chlamydia pneumoniae* of non-human origin. *J Gen Microbiol.* 139, 2621-6.
- Storni, E., Donati, M., Marangoni, A., Accardo, S., and Cevenini, R., 2006. Comparative PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis of the plasmid gene

- orf3 of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci*. FEMS Immunol Med Microbiol. 48, 313-8.
- Storz, J., Carroll, E. J., Ball, L., and Faulkner, L. C., 1968. Isolation of a psittacosis agent (*Chlamydia*) from semen and epididymis of bulls with seminal vesiculitis syndrome. Am J Vet Res. 29, 549-55.
- Storz, J., Eugster, A. K., Altera, K. P., and Olander, H. J., 1971. Behavior of different bovine chlamydial agents in newborn calves. J Comp Pathol. 81, 299-307.
- Storz, J., and Page, L. A., 1971. Taxonomy of the chlamydiae: reasons for classifying organisms of the genus *Chlamydia*, family Chlamydiaceae, in a separate order, Chlamydiales ord. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 21, 332-334.
- Storz, J., Smart, R. A., Marriott, M. E., and Davis, R. V., 1966. Polyarthrititis of calves: isolation of psittacosis agents from affected joints. Am J Vet Res. 27, 633-41.
- Stuart, E. S., Wyrick, P. B., Choong, J., Stoler, S. B., and MacDonald, A. B., 1991. Examination of chlamydial glycolipid with monoclonal antibodies: cellular distribution and epitope binding. Immunology. 74, 740-7.
- Su, H., Morrison, R. P., Watkins, N. G., and Caldwell, H. D., 1990a. Identification and characterization of T helper cell epitopes of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. J Exp Med. 172, 203-12.
- Su, H., Raymond, L., Rockey, D. D., Fischer, E., Hackstadt, T., and Caldwell, H. D., 1996. A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 11143-8.
- Su, H., Watkins, N. G., Zhang, Y. X., and Caldwell, H. D., 1990b. *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. Infect Immun. 58, 1017-25.
- Subtil, A., Parsot, C., and Dautry-Varsat, A., 2001. Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. Mol Microbiol. 39, 792-800.
- Suchland, R. J., Rockey, D. D., Bannantine, J. P., and Stamm, W. E., 2000. Isolates of *Chlamydia trachomatis* that occupy nonfusogenic inclusions lack IncA, a protein localized to the inclusion membrane. Infect Immun. 68, 360-7.
- Sykes, J. E., 2005. Feline chlamydiosis. Clin Tech Small Anim Pract. 20, 129-34.
- Sykes, J. E., Studdert, V. P., and Browning, G. F., 1999. Comparison of the polymerase chain reaction and culture for the detection of feline *Chlamydia psittaci* in untreated and doxycycline-treated experimentally infected cats. J Vet Intern Med. 13, 146-52.

- Tam, J. E., Davis, C. H., Thresher, R. J., and Wyrick, P. B., 1992. Location of the origin of replication for the 7.5-kb *Chlamydia trachomatis* plasmid. *Plasmid*. 27, 231-6.
- Tammiruusu, A., Penttilä, T., Lahesmaa, R., Sarvas, M., Puolakkainen, M., and Vuola, J. M., 2007. Intranasal administration of chlamydial outer protein N (CopN) induces protection against pulmonary *Chlamydia pneumoniae* infection in a mouse model. *Vaccine*. 25, 283-90.
- Tanaka, C., Miyazawa, T., Watarai, M., and Ishiguro, N., 2005. Bacteriological survey of feces from feral pigeons in Japan. *J Vet Med Sci*. 67, 951-3.
- Tang, F. F., Huang, Y. T., Chang, H. L., and Wong, K. C., 1957. Isolation of trachoma virus in chick embryo. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*. 1, 109-20.
- Tankouo-Sandjong, B., Sessitsch, A., Liebana, E., Kornschöber, C., Allerberger, F., Hachler, H., and Bodrossy, L., 2007. MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence genes, for molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars. *J Microbiol Methods*. 69, 23-36.
- Tanzer, R. J., and Hatch, T. P., 2001. Characterization of outer membrane proteins in *Chlamydia trachomatis* LGV serovar L2. *J Bacteriol*. 183, 2686-90.
- Theegarten, D., Sachse, K., Mentrup, B., Fey, K., Hotzel, H., and Anhehn, O., 2008. *Chlamydia* spp. infection in horses with recurrent airway obstruction: similarities to human chronic obstructive disease. *Respir Res*. 9, 14.
- Thomson, N. R., Yeats, C., Bell, K., Holden, M. T., Bentley, S. D., Livingstone, M., Cerdeno-Tarraga, A. M., Harris, B., Doggett, J., Ormond, D., Mungall, K., Clarke, K., Feltwell, T., Hance, Z., Sanders, M., Quail, M. A., Price, C., Barrell, B. G., Parkhill, J., and Longbottom, D., 2005. The *Chlamydia abortus* genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation. *Genome Res*. 15, 629-40.
- Thygeson, P., 1962. Trachoma virus: historical background and review of isolates. *Ann N Y Acad Sci*. 98, 6-13.
- Timms, P., Eaves, F. W., Girjes, A. A., and Lavin, M. F., 1988. Comparison of *Chlamydia psittaci* isolates by restriction endonuclease and DNA probe analyses. *Infect Immun*. 56, 287-90.
- Ting, L. M., Hsia, R. C., Haidaris, C. G., and Bavoil, P. M., 1995. Interaction of outer envelope proteins of *Chlamydia psittaci* GPIC with the HeLa cell surface. *Infect Immun*. 63, 3600-8.

- Todd, W. J., and Caldwell, H. D., 1985. The interaction of *Chlamydia trachomatis* with host cells: ultrastructural studies of the mechanism of release of a biovar II strain from HeLa 229 cells. *J Infect Dis.* 151, 1037-44.
- Toye, B., Laferriere, C., Claman, P., Jessamine, P., and Peeling, R., 1993. Association between antibody to the chlamydial heat-shock protein and tubal infertility. *J Infect Dis.* 168, 1236-40.
- Trentmann, O., Horn, M., van Scheltinga, A. C., Neuhaus, H. E., and Haferkamp, I., 2007. Enlightening energy parasitism by analysis of an ATP/ADP transporter from chlamydiae. *PLoS Biol.* 5, e231.
- Troesch, A., Nguyen, H., Miyada, C. G., Desvarenne, S., Gingeras, T. R., Kaplan, P. M., Cros, P., and Mabilat, C., 1999. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol.* 37, 49-55.
- Tsai, P. Y., Hsu, M. C., Huang, C. T., and Li, S. Y., 2007. Human antibody and antigen response to IncA antibody of *Chlamydia trachomatis*. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 20, 156-61.
- Tsai, Y. H., Orsi, R. H., Nightingale, K. K., and Wiedmann, M., 2006. *Listeria monocytogenes* internalins are highly diverse and evolved by recombination and positive selection. *Infect Genet Evol.* 6, 378-89.
- van Ham, S. M., van Alphen, L., Mooi, F. R., and van Putten, J. P., 1993. Phase variation of *H. influenzae* fimbriae: transcriptional control of two divergent genes through a variable combined promoter region. *Cell.* 73, 1187-96.
- Vanrompay, D., Andersen, A. A., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F., 1993. Serotyping of European isolates of *Chlamydia psittaci* from poultry and other birds. *J Clin Microbiol.* 31, 134-7.
- Vanrompay, D., Butaye, P., Sayada, C., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F., 1997. Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using *omp1* restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Res Microbiol.* 148, 327-33.
- Vanrompay, D., Cox, E., Volckaert, G., and Goddeeris, B., 1999. Turkeys are protected from infection with *Chlamydia psittaci* by plasmid DNA vaccination against the major outer membrane protein. *Clin Exp Immunol.* 118, 49-55.
- Vanrompay, D., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F., 1995. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet Microbiol.* 45, 93-119.

- Vanrompay, D., Vanloock, M., Cox, E., Goddeeris, B. M., and Volckaert, G., 2001. Genetic immunization for *Chlamydia psittaci*. *Verh K Acad Geneeskd Belg.* 63, 177-88; discussion 188-91.
- Vora, G. J., and Stuart, E. S., 2003. A Role for the glycolipid exoantigen (GLXA) in chlamydial infectivity. *Curr Microbiol.* 46, 217-23.
- Vos, P., 1998. AFLP fingerprinting of *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol.* 82, 147-55.
- Vretou, E., Katsiki, E., Psarrou, E., Vougas, K., and Tsangaris, G. T., 2008. Identification and characterization of Inc766, an inclusion membrane protein in *Chlamydomonas abortus*-infected cells. *Microb Pathog.* 45, 265-72.
- Vretou, E., Psarrou, E., and Spiliopoulou, D., 1992. The role of lipopolysaccharide in the exposure of protective antigenic sites on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J Gen Microbiol.* 138, 1221-7.
- Vretou, E., Radouani, F., Psarrou, E., Kritikos, I., Xylouri, E., and Mangana, O., 2007. Evaluation of two commercial assays for the detection of *Chlamydomonas abortus* antibodies. *Vet Microbiol.*
- Waldhalm, D. G., Frank, F. W., Meinershagen, W. A., Philip, R. N., and Thomas, L. A., 1971. Lambing performance of ewes inoculated with *Chlamydia* sp. before and after breeding. *Am J Vet Res.* 32, 809-11.
- Wang, S. P., Kuo, C. C., Barnes, R. C., Stephens, R. S., and Grayston, J. T., 1985. Immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies. *J Infect Dis.* 152, 791-800.
- Warren, K., Swan, R., Bodetti, T., Friend, T., Hill, S., and Timms, P., 2005. Ocular chlamydiales infections of western barred bandicoots (*Perameles bougainville*) in Western Australia. *J Zoo Wildl Med.* 36, 100-2.
- Watson, M. W., Clarke, I. N., Everson, J. S., and Lambden, P. R., 1995. The CrP operon of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microbiology.* 141 (Pt 10), 2489-97.
- Wehrli, W., Brinkmann, V., Jungblut, P. R., Meyer, T. F., and Szczepek, A. J., 2004. From the inside out--processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells. *Mol Microbiol.* 51, 319-34.
- Weiser, J. N., Love, J. M., and Moxon, E. R., 1989. The molecular mechanism of phase variation of *H. influenzae* lipopolysaccharide. *Cell.* 59, 657-65.
- Welter-Stahl, L., Ojcius, D. M., Viala, J., Girardin, S., Liu, W., Delarbre, C., Philpott, D., Kelly, K. A., and Darville, T., 2006. Stimulation of the cytosolic receptor for

- peptidoglycan, Nod1, by infection with *Chlamydia trachomatis* or *Chlamydia muridarum*. *Cell Microbiol.* 8, 1047-57.
- Whittum-Hudson, J. A., Rudy, D., Gerard, H., Vora, G., Davis, E., Haller, P. K., Prattis, S. M., Hudson, A. P., Saltzman, W. M., and Stuart, E. S., 2001. The anti-idiotypic antibody to chlamydial glycolipid exoantigen (GLXA) protects mice against genital infection with a human biovar of *Chlamydia trachomatis*. *Vaccine.* 19, 4061-71.
- Wilson, M. R., and Thomson, R. G., 1968. *Chlamydia pneumonia* of calves. *Res Vet Sci.* 9, 467-73.
- Wilton, J. L., Scarman, A. L., Walker, M. J., and Djordjevic, S. P., 1998. Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology.* 144 (Pt 7), 1931-43.
- Wittenbrink, M. M., Schoon, H. A., Schoon, D., Mansfeld, R., and Bisping, W., 1993. Endometritis in cattle experimentally induced by *Chlamydia psittaci*. *Zentralbl Veterinarmed B.* 40, 437-50.
- Wuppermann, F. N., Molleken, K., Julien, M., Jantos, C. A., and Hegemann, J. H., 2008. *Chlamydia pneumoniae* GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEp-2 cells. *J Bacteriol.* 190, 3757-67.
- Wylie, J. L., Hatch, G. M., and McClarty, G., 1997. Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol.* 179, 7233-42.
- Yaraei, K., Campbell, L. A., Zhu, X., Liles, W. C., Kuo, C. C., and Rosenfeld, M. E., 2005. Effect of *Chlamydia pneumoniae* on cellular ATP content in mouse macrophages: role of Toll-like receptor 2. *Infect Immun.* 73, 4323-6.
- Yousef Mohamad, K., Roche, S. M., Myers, G., Bavoil, P. M., Laroucau, K., Magnino, S., Laurent, S., Rasschaert, D., and Rodolakis, A., 2008. Preliminary phylogenetic identification of virulent *Chlamydophila pecorum* strains. *Infect Genet Evol.* 8, 764-71.
- Zhang, F., Li, S., Yang, J., Yang, L., and He, C., 2009. Induction of a protective immune response against swine *Chlamydophila abortus* infection in mice following co-vaccination of omp-1 DNA with recombinant MOMP. *Zoonoses Public Health.* 56, 71-6.
- Zhang, N., Harrex, A. L., Holland, B. R., Fenton, L. E., Cannon, R. D., and Schmid, J., 2003. Sixty alleles of the ALS7 open reading frame in *Candida albicans*: ALS7 is a hypermutable contingency locus. *Genome Res.* 13, 2005-17.

- Zhang, Y. X., Stewart, S., Joseph, T., Taylor, H. R., and Caldwell, H. D., 1987. Protective monoclonal antibodies recognize epitopes located on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J Immunol.* 138, 575-81.
- Zhao, Q., Schachter, J., and Stephens, R. S., 1993. Lack of allelic polymorphism for the major outer membrane protein gene of the agent of guinea pig inclusion conjunctivitis (*Chlamydia psittaci*). *Infect Immun.* 61, 3078-80.
- Zhao, X., Pujol, C., Soll, D. R., and Hoyer, L. L., 2003. Allelic variation in the contiguous loci encoding *Candida albicans* ALS5, ALS1 and ALS9. *Microbiology.* 149, 2947-60.
- Zhou, Z., Wu, Y. M., Liu, J., Chen, C. Q., and Yang, L., 2007. [Application of the recombinant protein MOMP(VD2-VD3) from *Chlamydia pneumoniae* in sero diagnosis]. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 47, 512-6.

Annexes

Annexe 1 :

Les caractéristiques des infections dues à *Chlamydophila pecorum* chez différents animaux hôtes sont présentées dans la revue ci-jointe intitulée

« Recent epidemiological developments concerning *Chlamydophila pecorum*, sixteen years after it was named as the fourth specie of the *Chlamydiaceae* family »

qui a été soumise pour publication dans Veterinary Research (août, 2009).

Recent epidemiological developments concerning *Chlamydophila pecorum*, sixteen years after it was named as the fourth species of the *Chlamydiaceae* family

Khalil Yousef Mohamad and Annie Rodolakis

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380, Nouzilly (Tours), France

Abstract

This review provides an update on the epidemiology and pathogenesis of *Chlamydophila pecorum* strains in different animal hosts and the implications for animal health. Taxonomy, typing and genetic aspects of *C. pecorum* are also reviewed.

1- Introduction

Chlamydiae are obligate intracellular bacteria that develop inside eukaryotic cells within membrane-bound vacuoles termed inclusions, with a unique biphasic developmental cycle alternating between an extracellular metabolically inert form (elementary body, EB), and an intracellular metabolically active replicating form (reticulate body, RB) (Moulder, 1991). *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* were the first two species to be assigned to the genus *Chlamydia* on the basis of differences in inclusion morphology, glycogen content, susceptibility to sulfadiazine and natural host (Gordon and Quan, 1965; Page, 1966). *C. trachomatis* encompassed all *Chlamydiae* found in man. *C. psittaci* comprised all other *Chlamydiae* found in birds and animals except the mouse pneumonitis agent, classified as *C. trachomatis* on the basis of its biological properties. *C. pneumoniae* was separated from the other two species on the basis of ultrastructural differences in the elementary bodies, DNA homology values and serological reactions (Grayston et al., 1989).

Until 1993, *C. pecorum* strains were considered as members of the *C. psittaci* species, sharing many similar phenotypic characteristics, including inclusion morphology, the absence of glycogen in inclusions and sulfadiazine resistance. The word “pecorum” comes from the Latin word for flocks of sheep or herds of cattle (Fukushi and Hirai, 1993). The first isolation of *C. pecorum* was from a sporadic encephalomyelitis of cattle reported by McNutt and Waller (1940) (McNutt and Waller, 1940), and at that time it was considered as a *C. psittaci* strain.

C. psittaci strains which isolated from ruminants were subdivided into two serotypes using a plaque-reduction test (Schachter et al., 1974; Schachter et al., 1975). Serotype 1 the strains

causing abortion and enteritis, and serotype 2 included the strains inducing polyarthrititis and conjunctivitis (*C. pecorum*). *C. psittaci* strains isolated from ruminant were divided into three main biotypes based on their culture characteristics, although only a small number of strains was used in that study (Spears and Storz, 1979). Biotype 1 included strains causing abortion (*C. abortus* strains in the classification of Everett et al., 1999) with compact inclusion morphology and inclusions appearing within 48 h. Biotype 2 included strains causing polyarthrititis, conjunctivitis, and encephalomyelitis, and strains isolated from faecal samples were included in biotype 3. The two latter biotypes, which corresponded to *C. pecorum* strains, had diffuse inclusion morphology and inclusions appearing within 24 h. The abortion type grew well in a sheep fibroblast culture, unlike the enteric type (Philips and Clarkson, 1992). A micro-immuno fluorescence (MIF) test confirmed the 2 serotypes of *C. psittaci* identified by a plaque reduction test (serotype 2 corresponding to *C. pecorum*) (Eb and Orfila, 1982). Following subcutaneous inoculation into the footpad of mice, the *C. psittaci* strains subdivided into three groups; 1) highly invasive strains causing splenomegaly and massive infection of the spleen; 2) invasive strains inducing a moderate enlargement of the spleen with a low level of splenic infection; 3) non-invasive strains (*C. pecorum*) inducing neither increased spleen weight nor splenic infection (Rodolakis, 1986). The invasive and highly invasive strains corresponded to serotype 2, i.e. *C. abortus*, in the new classification (Everett et al., 1999).

Genetic differences between the *C. pecorum* and *C. psittaci* strains were identified through restriction endonuclease analysis (Fukushi and Hirai, 1989; Rodolakis and Souriau, 1992), DNA-DNA hybridization, and southern blot analysis with genomic DNA probes (Fukushi and Hirai, 1989). In 1992, Fukushi and Hirai, suggested separating the *C. pecorum* species from *C. psittaci* based on the results of DNA-DNA hybridization and immunological analysis (Fukushi and Hirai, 1992). *C. pecorum* strains exhibited 10% or less DNA relatedness to strains of the other three Chlamydial species (*C. trachomatis*, *C. psittaci* and *C. pneumoniae*), while the homology levels were 88% or greater within the *C. pecorum* species. Restriction enzyme and gene probe analysis indicated that the chlamydial strains infecting koalas belonged to two distinct genotypes of *C. psittaci*, one corresponding to the strains causing urogenital diseases and similar to the SBE *C. pecorum* strain and the other grouping the ocular isolates (Girjes et al., 1988). This observation was confirmed by *ompA* (major outer membrane protein-MOMP gene) sequence analysis, indicating that the 2 chlamydial species infecting koala were *C. pecorum* and *C. pneumoniae* (Glassick, 1996).

New taxonomic methods were developed with the discovery of polymerase chain reaction the (PCR) and sequence analysis. This made it possible to analyse a greater number of strains using a small DNA sample, in contrast to former methods (biological, morphological, and DNA-DNA hybridization techniques, etc) requiring isolation and culture of the bacteria, a difficult procedure for an obligate intracellular bacterium such as *Chlamydia*.

Using the 16S/23S intergenic spacer and domain I of the 23S gene, the isolates of *Chlamydia* were grouped into two lineages (Everett and Andersen, 1997); *C. trachomatis* including human, swine, and mouse-hamster groups, and non-*C. trachomatis* including *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Chlamydia psittaci* abortion, avian, feline, and guinea pig groups. Then in 1999, Everett proposed a new classification dividing the *Chlamydiaceae* family into two genera. *Chlamydia* and *Chlamydophila*, the former comprising 3 species; *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum* and *Chlamydia suis*, and the latter 6 species; *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila caviae*, *Chlamydophila felis*, *Chlamydophila pneumoniae* and *Chlamydophila pecorum* (Everett et al., 1999). Some *Chlamydiae* specialists reject this classification, particularly the division of the *Chlamydiaceae* family into two genera. According to these authors (Schachter et al., 2001), the new classification scheme was based on minor sequence differences in the 16S and 23S rRNA genes, and some of the new species included too few isolates. However, this new classification was confirmed by five genes sequences analysis; MOMP, GroEL chaperonin, KDO-transferase, small cysteine-rich lipoprotein and 60 kDa cysteine-rich protein (Bush and Everett, 2001). The majority of published studies on *Chlamydiae* isolated from animals cited this new classification.

Currently, sequencing or PCR-RFLP analysis of the *ompA* gene or the 16s/23s rRNA intergenic spacer appears to facilitate the characterization of the different isolates of *Chlamydia*. Many studies have classified different chlamydial strains isolated from ruminants, pigs, koalas, wild animals and birds under the *C. pecorum* species.

2- Epidemiology

2-1- *C. pecorum* infection in cattle

C. pecorum is probably the predominant chlamydial species infecting the intestine infection (Longbottom, 2004) and genital tract (Jee et al., 2004) of healthy cattle. In a study using quantitative PCR, 67% of vaginal cytobrush specimens taken from heifers with high anti-chlamydial antibody titres were found to be positive for *C. pecorum* (DeGraves et al., 2003). An investigate study of chlamydial infections of female calves using serial sampling beginning at the birth showed that calves acquired natural infection with *C. pecorum* at an

overall prevalence of 51% within the first 2 months after birth (Jee et al., 2004). These data demonstrate clearly that these genital infections are not necessarily transmitted by the venereal route. In contrast, a low level of *C. pecorum* infection was found in the semen and preputial washing samples (1-2/120) taken from healthy bulls (Kauffold et al., 2007).

C. pecorum strains in cattle cause numerous diseases, such as sporadic bovine encephalomyelitis, polyarthritis, pneumonia, enteritis, as well as vaginitis and endometritis (Doughri et al., 1974; Kaltenboeck et al., 2009; McNutt and Waller, 1940; Storz et al., 1966; Wilson and Thomson, 1968; Wittenbrink et al., 1993).

Chlamydial infections, including *C. pecorum*, have a potential to substantially reduce fertility in cattle in the breeding season (Kaltenboeck et al., 2005). In a study of Swedish cattle, comparison of the seroprevalence between the clinical cases and the controls suggested the *Chlamydophila* spp. infections (including *C. pecorum*) are not related to reproductive disorders (Godin et al., 2008). However, intestinal infections with *Chlamydophila* spp (including *C. pecorum*) in cattle may contribute to long-term effects on animal health resulting in economic losses (e.g. reduced bodyweight), despite the absence of marked clinical signs (Reinhold et al., 2008). In addition, respiratory chlamydial infection due to *C. pecorum* and/or *C. abortus* could be associated with chronic inflammation of the lungs and airways which affecting long-term lung function (Jaeger et al., 2007).

2-2- *C. pecorum* infection in small ruminant

C. pecorum strains are commonly found in the intestine of healthy animals such as sheep, colonization beginning at 3 months of age when the young start to graze (Clarkson and Philips, 1997). However, some isolates of *C. pecorum* have been associated with conjunctivitis, arthritis, and orchitis (Rodolakis et al., 1989; Storz et al., 1968).

Chlamydial abortion in small ruminants is generally due to *C. abortus*, but some *C. pecorum* strains have been isolated from ovine and caprine abortion cases, particularly in Morocco and Tunisia (Rekiki et al., 2004). However, the intradermal or intravenous inoculation of pregnant ewes with *C. pecorum* strains isolated from ovine abortion cases, did not induce the same abortion rate as *C. abortus* (1 out of 5) (Rodolakis and Souriau, 1989). Moreover, the intraperitoneal inoculation of pregnant mice with these *C. pecorum* strains did not cause abortions, although the placentas were infected (Rekiki et al., 2004). This study suggests that the outbred mouse is not a suitable model for *C. pecorum* infection as previously shown (Rodolakis et al., 1989). None of the *C. pecorum* strains tested in the mouse model were invasive. Other co-factors such as nutrition, parasites or the animal breed could play a role in abortion in small ruminants with *C. pecorum* infection.

Several studies have tested the pathogenicity of ovine intestinal *C. pecorum* strains, particularly in relation to abortion, using mouse or sheep models. For example, the oral infection of pregnant ewes with *C. pecorum*, alone or together with *Fasciola hepatica*, did not result in tissue invasion (Philips and Clarkson, 1998). In another study, the subcutaneous injection of pregnant ewes or pregnant mice with intestinal *C. pecorum* strains did not lead to placental infection (Anderson and Baxter, 1986; Rodolakis and Souriau, 1989; Wilson and Dungworth, 1963). Only the intravenous inoculation resulted in placental infection, but the infected pregnant ewes did not abort and lambs weight was not affected (Philips and Clarkson, 1998). Intestinal *C. pecorum* infection in the mouse model is mainly controlled by the non-specific immune response (Buendia et al., 1999). All these studies suggest that intestinal *C. pecorum* strains are unable to pass through the intestinal epithelium but that they may persist in the intestine for a long time.

2-3- *C. pecorum* infection in swine

In swine, *C. pecorum* infection has been associated with pneumonia, polyarthritis, pleuritis, pericarditis and abortion (Kaltenboeck et al., 1992; Kaltenboeck et al., 1993; Kaltenboeck and Storz, 1992). Mixed infections of *C. trachomatis* and *C. pecorum* are probably the main cause of chlamydial abortion in swine (Schiller et al., 1997). Unlike bovine chlamydial infection, *Chlamydia*-like organisms have frequently been detected in vaginal and cervical swabs taken from healthy sows (Camenisch et al., 2004).

C. pecorum has been found only sporadically (1-2%) in semen and faeces samples from boars. *C. psittaci* has frequently been found in semen samples, while *C. suis* is the predominant chlamydial species found in faeces samples (Kauffold et al., 2006).

2-4- *C. pecorum* infection in koalas

In koalas, *C. pecorum* strains cause conjunctivitis, urinary and reproductive tract disease and infertility (Cockram and Jackson, 1974; McColl et al., 1984). The level of *C. pecorum* infection in free-range koala populations could reach up to 85%, with 17% associated with clinical disease (Jackson et al., 1999). Young koalas have been found to have a high level of *C. pecorum* infection, 58% involving both ocular and urogenital infections, suggesting that mother-offspring transmission is a major transmission route among the koala population. In addition, *C. pecorum* could be more pathogenic for koalas than *C. pneumoniae* species (Jackson et al., 1999).

2-5- Infection of other animals

A strain of *C. pecorum* that causes conjunctivitis has been isolated from the western barred bandicoot in Australia (Warren et al., 2005). Three faecal samples from healthy pigeons in Japan were found to be *C. pecorum* positive using PCR (Tanaka et al., 2005). Recently, a mixed infection with *C. pecorum* and *C. abortus* caused abortion in water buffalo in Italy (Greco et al., 2008).

3- The typing of *C. pecorum* strains

Ovine and bovine *C. pecorum* strains present many genetic and antigenic variations (Fukushi and Hirai, 1989). Eight distinct *ompA* gene restriction patterns were identified among 12 *C. pecorum* strains (Denamur et al., 1991). A micro-immuno-fluorescence test identified 16 serotypes among 18 strains using a panel of monoclonal antibodies (Salinas et al., 1996). In contrast, the *C. pecorum* strains isolated from swine and koalas appear more homogenous. Eight swine strains were classified into 2 genotypes using the *ompA* sequence analysis (Kaltenboeck and Storz, 1992). Fifteen koala *C. pecorum* strains were grouped into 5 genotypes using the *ompA* sequence analysis (Jackson, 1997). Variant coding tandem repeats in the *incA* gene enabled 19 *C. pecorum* strains to be classified into 3 groups based on the presence of various motifs. Seven out of eight pathogenic strains were found in a single group (Yousef Mohamad et al., 2008a). These authors used the multi-virulence-locus sequence typing (MVLST) technique to classify 19 *C. pecorum* strains in 4 groups; one of these contains only 6 pathogenic strains of different clinical and geographical origins. Indeed, by comparing the number of repetitions of the CTR in the ORF663 gene, the pathogenic strain has been shown to have fewer repetitions than the non-pathogenic intestinal strains (Yousef Mohamad et al., 2008b). These studies suggest differences between the pathogenic *C. pecorum* strains and the non- pathogenic intestinal strains.

4- Genetics

4-1- Tandem repeats

Little genetic information on *C. pecorum* is available because its genome sequence is not yet available. Recently, the sequence analysis of 12 genes demonstrated that *ompA* of *C. pecorum* (such as *C. trachomatis* and *C. psittaci*) is highly polymorphic gene with more than 300 polymorphic nucleotides. The housekeeping genes were found to be very homogenous between the *C. pecorum* strains (less than 5 polymorphic nucleotides). Interestingly, 2 CTR variants have been identified; the CTR of *incA* (9-18 nucleotides) which contains different motifs and is rich in alanine and praline, and the CTR of ORF663 (15 nucleotides) which is rich in serine, proline and lysine. Such CTRs may be involved in the virulence of *C. pecorum* (Yousef Mohamad et al., 2008a; Yousef Mohamad et al., 2008b). Another tandem repeat was

previously identified in the *C. pecorum* genome (8 nucleotides) in the intergenic space *rrn-nqrF* (the 5S rRNA gene and the gene for subunit F of the Na⁺-translocating NADH-quinone reductase). This varies greatly between *C. pecorum* strains (Liu et al., 2007). In general, the tandem repeats are not very numerous in *C. trachomatis* and *C. pneumoniae* genomes (Bavoil et al., 2000). The two tandem repeats found in the *Chlamydiae* genome are conserved in all chlamydial species, One at the N-terminal of Pmp (polymorphic membrane protein) (Grimwood and Stephens, 1999), and the other in the intergenic space of the ORF8 and ORF1 of the chlamydial plasmid (Tam et al., 1992).

Bioinformatics technology has developed software for detecting the VNTR (variable number tandem repeats) on the bacterial genome. VNTR analysis for *C. trachomatis* strains has identified some tandem repeats, most with a single nucleotide (Pedersen et al., 2008). In contrast, VNTR analysis for *C. psittaci* and *C. abortus* shows a high discrimination power, although the number of repeats does not vary greatly between strains (2-6 copies) (Laroucau et al., 2008; Laroucau et al., 2009).

Thus, the sequence of the *C. pecorum* genome could reveal some surprise regarding the existence and variability of the tandem repeat between the different *C. pecorum* strains.

4-2- Plasmid

The presence of plasmids in *C. trachomatis* and *C. psittaci* was first described in 1980 (Lovett, 1980). In addition, a plasmid was detected in *C. caviae*, *C. felis* and *C. pecorum* using the DNA-DNA hybridization method (Girjes et al., 1988; McClenaghan et al., 1988), but it was not detected in *C. abortus* strains (Lusher et al., 1989). Restriction enzyme analysis has demonstrated that these 3 plasmids are closely related. Sequence analysis of a 7.5 kb DNA plasmid isolated from *C. trachomatis*, trachoma biovar, identified 8 open reading frames and a region composed of four 22-bp repeats (Comanducci et al., 1988; Sriprakash and Macavoy, 1987). Chlamydial plasmids are unable to replicate in *Escherichia coli* (Palmer and Falkow, 1986). The hypothetical origin of replication for the *C. trachomatis* plasmid appears to be near a region which contains four 22-bp tandem repeats (Tam et al., 1992). An average copy number of 4.0 ± 0.8 plasmids per chromosome has been determined in the EBs of *C. trachomatis* and *C. pneumoniae* (Pickett et al., 2005).

Two plasmids from two *C. pecorum* (Bovine and Koala) strains of 7.4-kb have been characterized by restriction endonuclease analysis. These plasmids, showing considerable cross-hybridization, are quite distinct from the *C. psittaci* and *C. trachomatis* plasmids (Hugall et al., 1989). Some *C. pecorum* strains do not harbour plasmid (3 out of 11 studied isolates) as they cannot be found by using southern blot analysis (Anderson et al., 1996). A

great number of *Chlamydia* strains do not have plasmids, suggesting that they are not required for chlamydial growth.

The *C. pecorum* plasmid sequence is not yet available. It would be interesting to sequence it and compare its polymorphism between *C. pecorum* strains. Its sequence may differ from the other chlamydial plasmids. The presence of the plasmid in some *C. pecorum* strains could play a role in pathogenesis, as shown recently in *C. trachomatis* infection. The *C. trachomatis* L2 plasmid could regulate the expression of some chromosomal genes such as *glgA*, encoding glycogen synthase (Carlson et al., 2008). In addition, the plasmid-deficient *C. muridarum* mutant strain can infect the murine genital tract, but fails to cause disease in the oviduct. The mice infected with this strain have been shown to be protected against oviduct disease upon challenge with virulent *C. muridarum* strain (O'Connell et al., 2007).

4-3- Chlamydiaphage

In 1982, the first phage (Chp1) infection was described in an avian *C. psittaci* isolate (Richmond, 1982). Later, several phages were isolated from different chlamydial species: *C. pneumoniae* (CPAR39), *C. caviae* (CPG1), and *C. abortus* (Chp2) (Read et al., 2000), (Hsia et al., 2000), (Liu et al., 2000). A Chlamydiaphage (Chp3) was detected in the *C. pecorum* T52 strain isolated from sheep, belonging to the *Microviridae*. Its genome is 4554 bp long and encodes 8 open reading frames organised in the same genome structure as other chlamydiaphages (Everson et al., 2003; Garner et al., 2004). Chlamydiaphages are unable to infect all chlamydial species (Everson et al., 2003; Garner et al., 2004). No evidence has been found for the integration of phage DNA into the chlamydial chromosome (Lusher et al., 1989). Chlamydiaphages could play a role in the pathogenesis of *Chlamydia*, since the presence of CPG1phage in *C. caviae* infection delays the appearance of the peak level of *Chlamydiae* in animal and decreases the pathologic response (Rank et al., 2009).

5- Conclusion

The pathogenesis of *Chlamydia pecorum* species is still unclear. This species should receive more attention from *Chlamydia* specialists for three reasons. Firstly, the coding tandem repeats (CTR) found in the *incA* and ORF663 genes, allowed to distinguish between the pathogenic and non-pathogenic intestinal *C. pecorum* strains. This type of CTR appears to be involved in bacterial virulence. Identification of the role of this tandem repeat in the biology of *C. pecorum* species could be the key to understanding the pathogenesis of some *C. pecorum* strains. Secondly, the persistence of *C. pecorum* strains in the intestine and vaginal mucus of ruminants could cause a long-lasting sub-clinical infection and affect the animal's health. Thirdly, *C. pecorum* strains infect some endangered species such as koalas and

bandicoots and this could aggravate the situation by reducing the number of these animals due to abortion and infertility.

References

- Anderson, I. E., Baxter, S. I., Dunbar, S., Rae, A. G., Philips, H. L., Clarkson, M. J., and Herring, A. J., 1996. Analyses of the genomes of chlamydial isolates from ruminants and pigs support the adoption of the new species *Chlamydia pecorum*. *Int J Syst Bacteriol.* 46, 245-51.
- Anderson, I. E., and Baxter, T. A., 1986. *Chlamydia psittaci*: inclusion morphology in cell culture and virulence in mice of ovine isolates. *Vet Rec.* 119, 453-4.
- Bavoil, P. M., Hsia, R., and Ojcius, D. M., 2000. Closing in on *Chlamydia* and its intracellular bag of tricks. *Microbiology.* 146 (Pt 11), 2723-31.
- Buendia, A. J., De Oca, R. M., Navarro, J. A., Sanchez, J., Cuello, F., and Salinas, J., 1999. Role of polymorphonuclear neutrophils in a murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infect Immun.* 67, 2110-6.
- Bush, R. M., and Everett, K. D., 2001. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51, 203-20.
- Camenisch, U., Lu, Z. H., Vaughan, L., Corboz, L., Zimmermann, D. R., Wittenbrink, M. M., Pospischil, A., and Sydler, T., 2004. Diagnostic investigation into the role of Chlamydiae in cases of increased rates of return to oestrus in pigs. *Vet Rec.* 155, 593-6.
- Carlson, J. H., Whitmire, W. M., Crane, D. D., Wicke, L., Virtaneva, K., Sturdevant, D. E., Kupko, J. J., 3rd, Porcella, S. F., Martinez-Orengo, N., Heinzen, R. A., Kari, L., and Caldwell, H. D., 2008. The *Chlamydia trachomatis* plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor. *Infect Immun.* 76, 2273-83.
- Clarkson, M. J., and Philips, H. L., 1997. Isolation of faecal chlamydia from sheep in Britain and their characterization by cultural properties. *Vet J.* 153, 307-10.
- Cockram, F. A., and Jackson, A. R., 1974. Letter: Isolation of a *Chlamydia* from cases of keratoconjunctivitis in koalas. *Aust Vet J.* 50, 82-3.
- Comanducci, M., Ricci, S., and Ratti, G., 1988. The structure of a plasmid of *Chlamydia trachomatis* believed to be required for growth within mammalian cells. *Mol Microbiol.* 2, 531-8.
- DeGraves, F. J., Gao, D., Hehnen, H. R., Schlapp, T., and Kaltenboeck, B., 2003. Quantitative detection of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* by high-sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle. *J Clin Microbiol.* 41, 1726-9.
- Denamur, E., Sayada, C., Souriau, A., Orfila, J., Rodolakis, A., and Elion, J., 1991. Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*. *J Gen Microbiol.* 137, 2525-30.
- Doughri, A. M., Yong, S., and Storz, J., 1974. Pathologic changes in intestinal chlamydial infection of newborn calves. *Am J Vet Res.* 35, 939-44.
- Eb, F., and Orfila, J., 1982. Serotyping of *Chlamydia psittaci* by the micro-immunofluorescence test: isolates of ovine origin. *Infect Immun.* 37, 1289-91.
- Everett, K. D., and Andersen, A. A., 1997. The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp. *Int J Syst Bacteriol.* 47, 461-73.
- Everett, K. D., Bush, R. M., and Andersen, A. A., 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol.* 49 Pt 2, 415-40.
- Everson, J. S., Garner, S. A., Lambden, P. R., Fane, B. A., and Clarke, I. N., 2003. Host range of chlamydiaphages phiCPAR39 and Chp3. *J Bacteriol.* 185, 6490-2.
- Fukushi, H., and Hirai, K., 1989. Genetic diversity of avian and mammalian *Chlamydia psittaci* strains and relation to host origin. *J Bacteriol.* 171, 2850-5.
- Fukushi, H., and Hirai, K., 1992. Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int J Syst Bacteriol.* 42, 306-8.
- Fukushi, H., and Hirai, K., 1993. *Chlamydia pecorum*--the fourth species of genus *Chlamydia*. *Microbiol Immunol.* 37, 516-22.
- Garner, S. A., Everson, J. S., Lambden, P. R., Fane, B. A., and Clarke, I. N., 2004. Isolation, molecular characterisation and genome sequence of a bacteriophage (Chp3) from *Chlamydomydia pecorum*. *Virus Genes.* 28, 207-14.
- Girjes, A. A., Hugall, A. F., Timms, P., and Lavin, M. F., 1988. Two distinct forms of *Chlamydia psittaci* associated with disease and infertility in *Phascogale cinereus* (koala). *Infect Immun.* 56, 1897-900.

- Glassick, T., Giffard, P., Timms, P., 1996. Outer membrane protein 2 gene sequences indicate that two chlamydial species, *Chlamydia pecorum* and *Chlamydia pneumoniae*, cause infections in koalas. *Syst Appl Microbiol.* 19, 456-464.
- Godin, A. C., Bjorkman, C., Englund, S., Johansson, K. E., Niskanen, R., and Alenius, S., 2008. Investigation of *Chlamydophila* spp. in dairy cows with reproductive disorders. *Acta Vet Scand.* 50, 39.
- Gordon, F. B., and Quan, A. L., 1965. Occurrence of Glycogen in Inclusions of the Psittacosis-Lymphogranuloma Venereum-Trachoma Agents. *J Infect Dis.* 115, 186-96.
- Grayston, J. T., Wang, S. P., Kuo, C. C., and Campbell, L. A., 1989. Current knowledge on *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 8, 191-202.
- Greco, G., Corrente, M., Buonavoglia, D., Campanile, G., Di Palo, R., Martella, V., Bellacicco, A. L., D'Abramo, M., and Buonavoglia, C., 2008. Epizootic abortion related to infections by *Chlamydophila abortus* and *Chlamydophila pecorum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology.* 69, 1061-9.
- Grimwood, J., and Stephens, R. S., 1999. Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Comp Genomics.* 4, 187-201.
- Hsia, R., Ohayon, H., Gounon, P., Dautry-Varsat, A., and Bavoil, P. M., 2000. Phage infection of the obligate intracellular bacterium, *Chlamydia psittaci* strain guinea pig inclusion conjunctivitis. *Microbes Infect.* 2, 761-72.
- Hugall, A., Timms, P., Girjes, A. A., and Lavin, M. F., 1989. Conserved DNA sequences in chlamydial plasmids. *Plasmid.* 22, 91-8.
- Jackson, M., Giffard, P., Timms, P., 1997. Outer membrane protein A gene sequencing demonstrates the polyphyletic nature of koala *Chlamydia pecorum* isolates. *Syst Appl Microbiol.* 20, 187-200.
- Jackson, M., White, N., Giffard, P., and Timms, P., 1999. Epizootiology of *Chlamydia* infections in two free-range koala populations. *Vet Microbiol.* 65, 255-64.
- Jaeger, J., Liebler-Tenorio, E., Kirschvink, N., Sachse, K., and Reinhold, P., 2007. A clinically silent respiratory infection with *Chlamydophila* spp. in calves is associated with airway obstruction and pulmonary inflammation. *Vet Res.* 38, 711-28.
- Jee, J., Degraives, F. J., Kim, T., and Kaltenboeck, B., 2004. High prevalence of natural *Chlamydophila* species infection in calves. *J Clin Microbiol.* 42, 5664-72.
- Kaltenboeck, B., Hehnen, H. R., and Vaglenov, A., 2005. Bovine *Chlamydophila* spp. infection: do we underestimate the impact on fertility? *Vet Res Commun.* 29 Suppl 1, 1-15.
- Kaltenboeck, B., Heinen, E., Schneider, R., Wittenbrink, M. M., and Schmeer, N., 2009. OmpA and antigenic diversity of bovine *Chlamydophila pecorum* strains. *Vet Microbiol.* 135, 175-80.
- Kaltenboeck, B., Kousoulas, K. G., and Storz, J., 1992. Two-step polymerase chain reactions and restriction endonuclease analyses detect and differentiate ompA DNA of *Chlamydia* spp. *J Clin Microbiol.* 30, 1098-104.
- Kaltenboeck, B., Kousoulas, K. G., and Storz, J., 1993. Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (ompA) genes of the four chlamydial species. *J Bacteriol.* 175, 487-502.
- Kaltenboeck, B., and Storz, J., 1992. Biological properties and genetic analysis of the ompA locus in chlamydiae isolated from swine. *Am J Vet Res.* 53, 1482-7.
- Kauffold, J., Henning, K., Bachmann, R., Hotzel, H., and Melzer, F., 2007. The prevalence of chlamydiae of bulls from six bull studs in Germany. *Anim Reprod Sci.* 102, 111-21.
- Kauffold, J., Melzer, F., Henning, K., Schulze, K., Leiding, C., and Sachse, K., 2006. Prevalence of chlamydiae in boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology.* 65, 1750-8.
- Laroucau, K., Thierry, S., Vorimore, F., Blanco, K., Kaleta, E., Hoop, R., Magnino, S., Vanrompay, D., Sachse, K., Myers, G. S., Bavoil, P. M., Vergnaud, G., and Pourcel, C., 2008. High resolution typing of *Chlamydophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). *Infect Genet Evol.* 8, 171-81.
- Laroucau, K., Vorimore, F., Bertin, C., Yousef Mohamad, K., Thierry, S., Hermann, W., Maingourd, C., Pourcel, C., Longbottom, D., Magnino, S., Sachse, K., Vretou, E., and Rodolakis, A., 2009. Genotyping of *Chlamydophila abortus* strains by multilocus VNTR analysis. *Vet Microbiol.*
- Liu, B. L., Everson, J. S., Fane, B., Giannikopoulou, P., Vretou, E., Lambden, P. R., and Clarke, I. N., 2000. Molecular characterization of a bacteriophage (Chp2) from *Chlamydia psittaci*. *J Virol.* 74, 3464-9.
- Liu, Z., Rank, R., Kaltenboeck, B., Magnino, S., Dean, D., Burall, L., Plaut, R. D., Read, T. D., Myers, G., and Bavoil, P. M., 2007. Genomic plasticity of the *rrn-nqrF* intergenic segment in the Chlamydiaceae. *J Bacteriol.* 189, 2128-32.
- Longbottom, D., 2004. Chlamydial infections of domestic ruminants and swine: new nomenclature and new knowledge. *Vet J.* 168, 9-11.

- Lovett, M., Kuo, K. K., Holmes, K., Falkow, S., 1980. Plasmids of the genus *Chlamydia*. In *Current Chemotherapy and Infectious Diseases*, vol. 2, pp. 1250–1252. Edited by J. Nelson & C. Grassi. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Lusher, M., Storey, C. C., and Richmond, S. J., 1989. Plasmid diversity within the genus *Chlamydia*. *J Gen Microbiol.* 135, 1145-51.
- McClenaghan, M., Honeycombe, J. R., Bevan, B. J., and Herring, A. J., 1988. Distribution of plasmid sequences in avian and mammalian strains of *Chlamydia psittaci*. *J Gen Microbiol.* 134, 559-65.
- McColl, K. A., Martin, R. W., Gleeson, L. J., Handasyde, K. A., and Lee, A. K., 1984. *Chlamydia* infection and infertility in the female koala (*Phascogale cinereus*). *Vet Rec.* 115, 655.
- McNutt, S. H., and Waller, E. F., 1940. Sporadic bovine encephalomyelitis (Buss disease). *Cornell Vet.* 30, 437-448.
- Moulder, J. W., 1991. Interaction of *chlamydiae* and host cells in vitro. *Microbiol Rev.* 55, 143-90.
- O'Connell, C. M., Ingalls, R. R., Andrews, C. W., Jr., Scurlock, A. M., and Darville, T., 2007. Plasmid-deficient *Chlamydia muridarum* fail to induce immune pathology and protect against oviduct disease. *J Immunol.* 179, 4027-34.
- Page, L. A., 1966. Interspecies transfer of psittacosis-LGV-trachoma agents: pathogenicity of two avian and two mammalian strains for eight species of birds and mammals. *Am J Vet Res.* 27, 397-407.
- Palmer, L., and Falkow, S., 1986. A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid.* 16, 52-62.
- Pedersen, L. N., Podenphant, L., and Moller, J. K., 2008. Highly discriminative genotyping of *Chlamydia trachomatis* using *omp1* and a set of variable number tandem repeats. *Clin Microbiol Infect.* 14, 644-52.
- Philips, H. L., and Clarkson, M. J., 1992. Culture of sheep *Chlamydia* in a sheep fibroblast cell culture. *Res Vet Sci.* 53, 267-8.
- Philips, H. L., and Clarkson, M. J., 1998. Experimental infection of pregnant ewes with *Chlamydia pecorum*. *Infect Immun.* 66, 2818-21.
- Pickett, M. A., Everson, J. S., Pead, P. J., and Clarke, I. N., 2005. The plasmids of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydophila pneumoniae* (N16): accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. *Microbiology.* 151, 893-903.
- Rank, R. G., Bowlin, A. K., Cane, S., Shou, H., Liu, Z., Nagarajan, U. M., and Bavoil, P. M., 2009. Effect of *Chlamydiaphage phiCPG1* on the course of conjunctival infection with "*Chlamydia caviae*" in guinea pigs. *Infect Immun.* 77, 1216-21.
- Read, T. D., Fraser, C. M., Hsia, R. C., and Bavoil, P. M., 2000. Comparative analysis of *Chlamydia* bacteriophages reveals variation localized to a putative receptor binding domain. *Microb Comp Genomics.* 5, 223-31.
- Reinhold, P., Jaeger, J., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Bachmann, R., Schubert, E., Melzer, F., Elschner, M., and Sachse, K., 2008. Impact of latent infections with *Chlamydophila* species in young cattle. *Vet J.* 175, 202-11.
- Rekiki, A., Bouakane, A., Hammami, S., El Idrissi, A. H., Bernard, F., and Rodolakis, A., 2004. Efficacy of live *Chlamydophila abortus* vaccine 1B in protecting mice placentas and fetuses against strains of *Chlamydophila pecorum* isolated from cases of abortion. *Vet Microbiol.* 99, 295-9.
- Richmond, S., Stirling, P., Ashley, C., 1982. *Chlamydia* have phage too. In: Ma*rdh P-A, Holmes K K, Oriel J D, Piot P, Schachter J. , editors. *Fifth International Symposium on Human Chlamydial Infection*. Amsterdam, The Netherlands; Elsevier Biomedical Press. 41-44.
- Rodolakis, A., 1986. A mouse model for studying the invasive and abortive properties of ruminant isolates. *Chlamydial diseases of ruminants*. In Commission of the European Communities, Luxembourg. 133-137.
- Rodolakis, A., Bernard, F., and Lantier, F., 1989. Mouse models for evaluation of virulence of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants. *Res Vet Sci.* 46, 34-9.
- Rodolakis, A., and Souriau, A., 1989. Variations in the virulence of strains of *Chlamydia psittaci* for pregnant ewes. *Vet Rec.* 125, 87-90.
- Rodolakis, A., and Souriau, A., 1992. Restriction endonuclease analysis of DNA from ruminant *Chlamydia psittaci* and its relation to mouse virulence. *Vet Microbiol.* 31, 263-71.
- Salinas, J., Souriau, A., De Sa, C., Andersen, A. A., and Rodolakis, A., 1996. Serotype 2-specific antigens from ruminant strains of *Chlamydia pecorum* detected by monoclonal antibodies. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 19, 155-61.
- Schachter, J., Banks, J., Sugg, N., Sung, M., Storz, J., and Meyer, K. F., 1974. Serotyping of *Chlamydia*. I. Isolates of ovine origin. *Infect Immun.* 9, 92-4.
- Schachter, J., Banks, J., Sugg, N., Sung, M., Storz, J., and Meyer, K. F., 1975. Serotyping of *Chlamydia*: isolates of bovine origin. *Infect Immun.* 11, 904-7.
- Schachter, J., Stephens, R. S., Timms, P., Kuo, C., Bavoil, P. M., Birkelund, S., Boman, J., Caldwell, H., Campbell, L. A., Chernesky, M., Christiansen, G., Clarke, I. N., Gaydos, C., Grayston, J. T., Hackstadt, T., Hsia, R., Kaltenboeck, B., Leinonen, M., Ojcius, D., McClarty, G., Orfila, J., Peeling, R.,

- Puolakkainen, M., Quinn, T. C., Rank, R. G., Raulston, J., Ridgeway, G. L., Saikku, P., Stamm, W. E., Taylor-Robinson, D. T., Wang, S. P., and Wyrick, P. B., 2001. Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51, 249; author reply 251-3.
- Schiller, I., Koesters, R., Weilenmann, R., Thoma, R., Kaltenboeck, B., Heitz, P., and Pospischil, A., 1997. Mixed infections with porcine *Chlamydia trachomatis/pecorum* and infections with ruminant *Chlamydia psittaci* serovar 1 associated with abortions in swine. *Vet Microbiol.* 58, 251-60.
- Spears, P., and Storz, J., 1979. Biotyping of *Chlamydia psittaci* based on inclusion morphology and response to diethylaminoethyl-dextran and cycloheximide. *Infect Immun.* 24, 224-32.
- Sriprakash, K. S., and Macavoy, E. S., 1987. Characterization and sequence of a plasmid from the trachoma biovar of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid.* 18, 205-14.
- Storz, J., Carroll, E. J., Ball, L., and Faulkner, L. C., 1968. Isolation of a psittacosis agent (*Chlamydia*) from semen and epididymis of bulls with seminal vesiculitis syndrome. *Am J Vet Res.* 29, 549-55.
- Storz, J., Smart, R. A., Marriott, M. E., and Davis, R. V., 1966. Polyarthrititis of calves: isolation of psittacosis agents from affected joints. *Am J Vet Res.* 27, 633-41.
- Tam, J. E., Davis, C. H., Thresher, R. J., and Wyrick, P. B., 1992. Location of the origin of replication for the 7.5-kb *Chlamydia trachomatis* plasmid. *Plasmid.* 27, 231-6.
- Tanaka, C., Miyazawa, T., Watarai, M., and Ishiguro, N., 2005. Bacteriological survey of feces from feral pigeons in Japan. *J Vet Med Sci.* 67, 951-3.
- Warren, K., Swan, R., Bodetti, T., Friend, T., Hill, S., and Timms, P., 2005. Ocular chlamydiales infections of western barred bandicoots (*Perameles bougainville*) in Western Australia. *J Zoo Wildl Med.* 36, 100-2.
- Wilson, M. R., and Dungworth, D. L., 1963. Psittacosis Lymphogranuloma-Venereum Group Viruses in Sheep. Comparisons between a Faecal and an Enzootic Abortion Strain. *J Comp Pathol.* 73, 277-84.
- Wilson, M. R., and Thomson, R. G., 1968. *Chlamydia pneumonia* of calves. *Res Vet Sci.* 9, 467-73.
- Wittenbrink, M. M., Schoon, H. A., Schoon, D., Mansfeld, R., and Bisping, W., 1993. Endometritis in cattle experimentally induced by *Chlamydia psittaci*. *Zentralbl Veterinarmed B.* 40, 437-50.
- Yousef Mohamad, K., Rekiki, A., Myers, G., Bavoil, P. M., and Rodolakis, A., 2008a. Identification and characterisation of coding tandem repeat variants in *incA* gene of *Chlamydophila pecorum*. *Vet Res.* 39, 56.
- Yousef Mohamad, K., Roche, S. M., Myers, G., Bavoil, P. M., Laroucau, K., Magnino, S., Laurent, S., Rasschaert, D., and Rodolakis, A., 2008b. Preliminary phylogenetic identification of virulent *Chlamydophila pecorum* strains. *Infect Genet Evol.* 8, 764-71.

Annexe 2 :

Les *Chlamydophila* sont considérées comme des agents zoonotiques potentielles ou avérées. La revue « **Zoonotic potentiel of *Chlamydophila*** » (Rodolakis et Yousef Mohamad, 2009) ci-jointe présente les maladies provoquées chez l'homme et les animaux par les différentes espèces de *Chlamydophila*. Les voies de transmission et les méthodes disponibles pour le contrôle de l'infection sont également rapportées en fonction du risque qu'elles présentent pour la santé humaine.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

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



Review

Zoonotic potential of *Chlamydomphila*

Annie Rodolakis^{*}, Khalil Yousef Mohamad

INRA, UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2009

Received in revised form 23 February 2009

Accepted 2 March 2009

Keywords:

Chlamydomphila

Zoonosis

Prevention

Vaccines

ABSTRACT

The purpose of this article is to present the diseases induced in humans and animals by the different species of *Chlamydomphila*, after providing an overview on the history of these infectious agents and their taxonomy. The route of transmission and the available methods for prevention and control in the different animal species are reviewed.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	000
2. History	000
3. Taxonomy	000
4. Clinical signs	000
4.1. <i>Chlamydomphila psittaci</i>	000
4.2. <i>Chlamydomphila abortus</i>	000
4.3. <i>Chlamydomphila felis</i>	000
4.4. <i>Chlamydomphila caviae</i>	000
4.5. <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	000
4.6. <i>Chlamydomphila pecorum</i>	000
5. Route of transmission	000
6. Diagnostics	000
7. Antibiotic therapy	000
7.1. <i>Chlamydomphila psittaci</i>	000
7.2. <i>Chlamydomphila abortus</i>	000
7.3. <i>Chlamydomphila felis</i>	000
8. Vaccines	000
8.1. <i>Chlamydomphila psittaci</i>	000
8.2. <i>Chlamydomphila abortus</i>	000
8.3. <i>Chlamydomphila felis</i>	000
9. Conclusion	000
References	000

^{*} Corresponding author. Tel.: +33 247 427 634; fax: +33 247 427 779.
E-mail address: Annie.Rodolakis@tours.inra.fr (A. Rodolakis).

1. Introduction

Chlamydiaceae are spread globally and cause acute diseases in humans and animals. They may provoke ocular, pulmonary, genital, articular, and intestinal illness, but very often they induce persistent, chronic, or subclinical infections. All *Chlamydophila* species are potential zoonotic pathogens, although *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* are the most important and best documented.

Chlamydiae are obligate intracellular Gram-negative bacteria with a unique growth cycle, which is initiated by the attachment to the host cell of the infectious elementary bodies (EBs), extracellular dormant, particles with a cell wall quite similar to that of Gram-negative bacteria. Adhesion induces phagocytosis within a phagosome. After entering the cell, the EBs convert into vegetative reticulate bodies (RBs), in which macromolecular synthesis takes place. After multiplication by binary fission, the RBs convert back into EBs, which are released from the host cell by lysis or exocytosis.

2. History

In the history of chlamydial infections, the description of trachoma first occurred in the Ebers papyrus (1500 B.C.) and in ancient Chinese manuscripts. Pedanius Dioscorides, a Sicilian physician, first used the term trachoma in 60 A.D. A century later the four stages of the disease were delineated by Galen (Thygeson, 1962).

At the beginning of the 19th century, a relationship was suspected between an infection in psittacine birds and pneumonia in humans who had been in contact with them. In 1895, Morange proposed the name psittacosis for this infection, but the disease-causing agent was finally isolated 35 years later during an epidemic of several hundred cases caused by infected Argentinean parrots in 1929–1930 in the US and Europe. In 1930, Levinthal described minuscule spherical basophilic bodies in tissues of infected parrots, and almost simultaneously, Coles and Lillie made the same observation in the cells of infected humans and birds. Bedson et al. (1930) established the etiological role of these organisms in the disease. In 1932, the intracellular developmental cycle of the psittacosis agent was described. Two years later, Thygeson (1934) identified a resemblance between the developmental cycle of the psittacosis agent and the organisms observed during the replication of the trachoma and inclusion conjunctivitis agents, which were first found in 1907 by Halberstädter and von Prowazek (1907). EBs were detected in the brains of cattle suffering from sporadic encephalomyelitis (McNutt and Waller, 1940), in the lungs of asymptomatic mice (Gönnert, 1941), and in cats suffering from pneumonia (Baker, 1944). In 1950, Stamp et al. (1950) demonstrated that *Chlamydiae* caused abortion in sheep, and more recently, *C. psittaci* strains were isolated from tortoises and *C. pneumoniae* from frogs and snakes (Bodetti et al., 2002).

However the nature of these pathogenic agents was only clarified at the end of the 1960s. They were originally regarded as viruses because they were unable to grow outside of a live cell, then as an intermediate organism between bacteria and viruses (Bernkopf et al., 1962)

because clear definitions of bacteria and viruses were lacking. The cultivation of the psittacosis agent in the chorioallantoic membrane (Burnet and Rountree, 1935), then in the yolk sac of chicken embryos (Yamura and Meyer, 1941), allowed biochemical and biological studies showing that these agents are prokaryotic organisms that parasitize eukaryotic cells. They retain their cellular properties throughout the growth cycle, and the RBs develop in cytoplasmic vacuoles and divide by a process analogous to binary fission in bacteria. Both the EBs and RBs contain DNA and RNA, and the cytoplasm is defined by a cell wall. They are sensitive to antibiotics, leading to the conclusion that they share many properties with bacteria (Moulder, 1966).

3. Taxonomy

The classification was controversial until recently, as attested to by the various appellations that designated the agents of the PLT group, Psittacosis, Lymphogranuloma venereum Trachoma, over the years. In 1948, they were classed in the order *Rickettsiales* and the family of *Chlamydozoceae* Moshkowsky, which included three genera (*Chlamydozoon*, *Myagawanella*, and *Colesiota*), since they could not be cultivated outside of living animal cells. During the next 20 years, a new classification was proposed almost every year until Storz and Page (Storz and Page, 1971) proposed placing them in a new order, *Chlamydiales*, which contained only one genus, *Chlamydia*, characterized by the unique intracellular developmental cycle. This genus included two species, *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* (Page, 1968) that are distinguished on the basis of sulfonamide susceptibility and glycogen accumulation within the inclusion, leading to different iodine staining. *C. psittaci* strains were sulfadiazine resistant and iodine-staining negative, whereas *C. trachomatis* strains were sensitive to sulfonamides and iodine-staining positive. In addition, the two species appeared to have a low degree of similarity in DNA sequences (Weiss et al., 1970).

Molecular biology and phylogenetic analysis of the 16S and 23S rRNA genes changed the classification of *Chlamydia* and the nomenclature of the strains again (Everett et al., 1999). Now the order *Chlamydiales* contains at least four families and the family *Chlamydiaceae* contains two genera, *Chlamydia* and *Chlamydophila*, with nine species: three for the genus *Chlamydia*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum*, and *Chlamydia suis*; two for the genus *Chlamydophila*, *Chlamydophila pneumoniae* and *Chlamydophila pecorum*; and four species that corresponded to the previous *Chlamydia psittaci*, *Chlamydophila psittaci* pathogen for birds, *Chlamydophila abortus* pathogen for ruminants, *Chlamydophila caviae* pathogen for guinea pigs, and *Chlamydophila felis* pathogen for cats.

The phylogenetic trees constructed from five other genes, *ompA* coding for the major outer membrane protein (MOMP), *GroEL* coding for a chaperon protein, *omp2* coding for the 60 kDa cysteine-rich protein, *omp3* coding for a small cysteine rich lipoprotein, and *kdtA* coding for the KDO-transferase, supported this new classification (Bush and Everett, 2001). In addition, this classification, which is

relevant to the host range, disease syndrome, and virulence, provides easy tools for identifying new strains by PCR-RFLP on the 16S-23S spacer region (Everett et al., 1999) or by DNA microarray (Sachse et al., 2005). Genetic studies suggested that *C. pneumoniae* and *C. pecorum* are closely related and that *C. abortus* is derived from *C. psittaci* (Van Loock et al., 2003).

The revised taxonomy has been adopted by most researchers working on animal chlamydiosis but is still rejected by some involved in human infections (Schachter et al., 2001) that contest the sharing in two genera (Stephens, 2008). In the current literature, these bacteria are designed as *Chlamydia* or *Chlamydophila*, which are abbreviated as *C* and *Cp*.

C. abortus strains exhibit very little antigenic (Salinas et al., 1995) or molecular diversity (Laroucau et al., 2009), but *C. psittaci* could be classified in six serovars (A–F) using anti-MOMP monoclonal antibodies (mAbs) (Andersen, 1997). These serovars are preferentially associated with some host species: A with psittacine birds, B with pigeons, C with ducks and geese, D with turkeys, E with pigeons and ducks, and F with parakeets. The serovars correlate with the genotypes defined by *ompA* polymorphisms characterized by restriction fragment length polymorphisms (RFLP) or sequencing that allowed the identification of type E/B in ducks (Geens et al., 2005).

4. Clinical signs

Table 1 gives an overview of the clinical signs induce in animals and human by the different species.

4.1. *Chlamydophila psittaci*

Psittacosis is the animal chlamydiosis that presents the major zoonotic threat. *C. psittaci* strains induce a systemic

disease in psittacine birds, domestic poultry, and wild fowl. People in frequent contact with domestic and companion birds at work or in their spare time are the most predisposed to infection. The incubation period typically lasts 1–2 weeks, but longer incubations periods are also reported. The symptoms are variable and unspecific, resembling mild flu-like illness with fever, headache, sore throat, myalgia, and diarrhea, but endocarditis, encephalitis, and severe interstitial pneumonia with non-productive cough, sometimes fatal, are also reported (Petrovay and Balla, 2008). In addition, the chlamydial infection is often complicated by secondary bacterial infections. With *C. psittaci* strains, delays before antibiotic treatment and the age and immune status of the patient affect disease development, which is more severe in elderly, young, and immunocompromised individuals and pregnant women. Indeed, abortion after contamination by infected birds occurred in pregnant women suffering from pneumonia and respiratory distress (Idu et al., 1998; Khatib et al., 1995). However, the disease is rarely fatal in humans when it is diagnosed rapidly and treated accurately. Thus, awareness of the danger is important for those at risk.

Disease severity in birds depends on the virulence of chlamydial strains and the species of the bird. These factors are not independent because the various genotypes that impact host specificity also show different virulence levels. Nevertheless, asymptomatic infections can occur with strains of both low and high virulence, and many strains remain quiescent in birds until activated by stress. In addition, age can affect disease course: adult birds may have asymptomatic infections, while young birds have acute disease (Herrmann et al., 2006).

Infected psittacine birds often present with hyperthermia, anorexia, lethargy, fluffed feathers, closed eyes, and diarrhea with green watery droppings. Birds may also present with respiratory signs, such as nasal discharge,

Table 1
Zoonotic potential of the *Chlamydophila* species and routes of transmission from animals to humans.

<i>Chlamydophila</i> species	Host		Pathology in animals		Route for human transmission	Pathology in humans	
	Principal host	Occasional host	Clinical signs	Severe disease		Usual disease	Severe disease
<i>C. psittaci</i>	Bird	Dog, horse, pig	Hyperthermia, anorexia, lethargy, diarrhea	Conjunctivitis, pneumonia, pericarditis, death	Inhalation	Influenza-like illness	Endocarditis, encephalitis, pneumonia, death
<i>C. abortus</i>	Sheep, goat, cattle	Pigs, deer, horse	Abortion, stillbirth, epididymitis ^a	Metritis	Inhalation	Influenza-like illness	Pneumonia, abortion, renal failure, respiratory distress, death
<i>C. felis</i>	Cat	– ^b	Conjunctivitis	Pneumonia, chronic salpingitis	Contact	Conjunctivitis	Endocarditis, severe liver breakdown
<i>C. caviae</i>	Guinea-pig	–	Conjunctivitis, genital tract infection	–	Contact	Conjunctivitis	–
<i>C. pneumoniae</i>	Human, koala, horse	Reptiles, amphibians	Respiratory diseases	–	Inhalation	Pneumonia, bronchitis, asthma ^c	Atherosclerosis ³
<i>C. pecorum</i>	Ruminant, swine, koala	Wild animal	Intestinal infection, conjunctivitis, urinary tract disease	Encephalomyelitis, pneumonia, arthritis	Contact	–	–

^a Clinical sign in infected male.

^b (–) Not reported.

^c Clinical signs by human *C. pneumoniae* isolates.

sneezing, and open-mouth breathing, due to pneumonia and airsacculitis. Conjunctivitis, with ocular discharge, together with sinusitis may be observed. The liver is usually affected and unusual feather coloration from altered metabolism may occur in chronically infected birds (Billington, 2005).

In turkeys, serovar D strains induce the most severe disease, with conjunctivitis, rhinitis, sinusitis, tracheitis, airsacculitis, pneumonia, pericarditis, enteritis, and reduced egg production. Mortality rates may be high without early antibiotic treatment. In addition, serovar D strains are especially dangerous for poultry workers, particularly in the poultry processing plant. Clinical signs of turkeys infected with serotypes of low virulence are milder, including anorexia and diarrhea (Vanrompay et al., 1995b).

In contrast, infected feral pigeons are asymptomatic latent carriers of *C. psittaci* that shed bacteria in feces, respiratory, and conjunctival secretions (Magnino et al., 2008). However, clinical signs, including anorexia, diarrhea, and respiratory signs, may occur in cases of simultaneous disease, such as salmonellosis, trichomoniasis, and viral infections (herpesvirus or paramyxovirus) (Longbottom and Coulter, 2003). Infections in ducks are also often asymptomatic, but confinement and close contact with them may induce severe pneumonia in humans (Laroucau et al., 2008). In some cases, *C. psittaci* strains may infect other mammals, such as dogs (Sprague et al., 2008), horses (Theegarten et al., 2008), and pigs (Kauffold et al., 2006), and induce abortions or pneumonia.

4.2. *Chlamydophila abortus*

C. abortus is the causal agent of enzootic abortion of ewes (EAE) or ovine enzootic abortion (OEA) and is the most common infectious cause of abortion in many small ruminant-rearing countries. The economic impact of these abortions is very high since one third of the pregnant ewes in a flock and occasionally 2-fold more pregnant goats may abort following the first exposure to *C. abortus*. This high level of abortion persists during 2 or 3 years until almost all the females abort. Then the disease takes on a cyclic nature and only 1–5% of abortions occur for several years until a new outbreak, when all primiparous females abort. This cyclic evolution is due to life-long immunity following abortion that protects against subsequent infection (Rodolakis et al., 1998). It is exceptional for a female to abort twice. Cattle, pigs, deer, and horses may also be infected with *C. abortus*.

In addition to the economic losses, *C. abortus* presents a zoonotic risk, inducing mild influenza-like illness or pneumonia in rare cases. Human infections associated with bovine chlamydial pneumonia and bovine encephalomyelitis were recorded (Johnson, 1983; Stepanek et al., 1983), and serological changes and urogenital symptoms were described in men and women in contact with bovine chlamydiosis (Stepanek et al., 1983). Although *C. abortus* is not very contagious in humans, the consequences of the infection for pregnant women in close contact with infected sheep and goats are disastrous. The association of human abortions with *Chlamydia* from ruminants was suspected long ago (Giroud et al., 1956) by several authors (Beer et al.,

1982; Crosse et al., 1971; Roberts et al., 1967; Terskikh et al., 1977), but it was based only on serological data. The role of *C. abortus* was contested (Hobson and Rees, 1982) until the isolation of the bacteria from the placenta and the fetus of a young woman who had assisted with a lambing on her husband's farm, on which some ewes had aborted (Buxton, 1986; Wong et al., 1985). RFLP characterization of the two strains from human and ovine origin proved definitively that the young woman was contaminated by her ewes (Herring et al., 1987). Abortions due to *C. abortus* have been confirmed in several other countries, including France (Villemonteix et al., 1990), the US (Jorgensen, 1997), Switzerland (Pospischil et al., 2002), Netherlands (Kam-pinga et al., 2000), and Italy (Walder et al., 2005). A fever with headache, malaise, nausea, and vomiting are generally the first symptoms of the infection in pregnant women and are frequently associated with lower abdominal pain followed by abortion and sometimes severe complications, such as acute renal failure, disseminated intravascular coagulation, or respiratory distress necessitating mechanical ventilation. Recovery from the disease follows termination of the pregnancy and appropriate antibiotic therapy, except in one case when the patient died (Beer et al., 1982).

C. abortus infection of pregnant ewes and goats induces abortion, stillbirth, or delivery of weak lambs or kids that quickly fall ill or have difficulties rising. Abortions mainly occur in the last month of gestation without clinical signs until abortion is imminent. Sometimes vaginal discharge is observed a few days before abortion, more frequently in goats than in ewes. As in small ruminants, no clinical symptoms are observed before the onset of bovine chlamydial abortion, which usually occurs during the last trimester of gestation, but may also take place as early as the fourth month (Storz, 1971).

Usually, aborting females recover rapidly without ill effect. Placental retention is rare in ewes but is more frequent in both cows and goats. This may lead to metritis, which is fatal in a very small number of cases. Arthritis, conjunctivitis, and pneumonia may affect calves, kids, and lambs born live from infected females. The fetus does not show specific macroscopic lesions.

In non-pregnant females, the infection generally develops towards an asymptomatic form, which may induce abortion during later gestations only in a small percentage of animals (Waldhalm et al., 1971). Male fetuses can be contaminated *in utero* (Rodolakis and Bernard, 1977) and adult males by mating with infected females. The infection can reach the seminal vesicles, causing epididymitis, and testicles, affecting the semen quality with shedding of the bacteria in the sperm.

In pigs, *C. abortus* may be isolated from cervical swabs and genital tracts of sows with repeated return to oestrus, abortions, and small litters with weak piglets (Thoma et al., 1997; Hoelzle et al., 2000; Camenisch et al., 2004). However, *C. suis* and *C. pecorum* seem to dominate in porcine abortions.

4.3. *Chlamydophila felis*

In cats, *C. felis* causes conjunctivitis associated with severe swelling of the lid, mild rhinitis, ocular and nasal

discharges, fever, and lameness, as shown by experimental infections (Masubuchi et al., 2002; TerWee et al., 1998). In addition, *C. felis* may reach the genital tract, producing chronic salpingitis leading to persistent oviduct infections.

Due to the close contact between cats and their owners, *C. felis* was suspected of causing human disease, particularly follicular conjunctivitis (Ostler et al., 1969; Schachter et al., 1969) or atypical pneumonitis (Cotton and Partridge, 1998). Endocarditis with secondary glomerulonephritis (Regan et al., 1979) and severe liver breakdown in an immunocompromised patient (Griffiths et al., 1978), both probably caused by a feline conjunctivitis agent, were reported based on serological investigations. However, *C. felis* was only isolated from conjunctivitis. The *Chlamydo-**phila* recovered from the HIV positive patient's eye suffering of chronic conjunctivitis was indistinguishable of that isolated from the cat's eye (Hartley et al., 2001). *C. felis* can induce conjunctivitis in people who are in close contact with infected cats, but the risk is extremely low, as indicated by the comparison of the seroprevalence in cats and their owners (Yan et al., 2000). However, some precaution is warranted when handling affected cats.

4.4. *Chlamydomphila caviae*

C. caviae in guinea pigs produces asymptomatic infection or clinical signs ranging from mild to severe conjunctivitis, with profuse purulent ocular discharge sealing the eyelids. Conjunctival chemosis, follicular hypertrophy, and pannus may develop as early as five days after experimental infection. Keratoconjunctivitis is self-limiting and clears up within 3–4 weeks. It may also cause infection of the genital tract, inducing symptoms comparable to those caused by *C. trachomatis* in humans. Infection of guinea pigs with *C. caviae* is widely used as an experimental model of *C. trachomatis* genital tract infection in humans (Batteiger and Rank, 1987).

PCR analysis allowed the detection of *C. caviae* in a conjunctival swab of the owners of symptomatic guinea pigs (Lutz-Wohlgroth et al., 2006). He reported mild serous ocular discharge, suggesting a zoonotic potential for *C. caviae* similar to that of *C. felis*. Symptomatic and asymptomatic guinea pigs may harbor *C. caviae*. As some are pets in close contact with young children, it would be interesting to investigate more accurately if *C. caviae* could be responsible for conjunctivitis in humans.

4.5. *Chlamydomphila pneumoniae*

C. pneumoniae, as all *Chlamydomphila* species, induces asymptomatic and chronic infections. It was first considered an exclusively human pathogen responsible for respiratory diseases, such as pneumonia, chronic bronchitis, and asthma, but also chronic diseases, such as atherosclerosis. However, strains of *C. pneumoniae* are widespread in the environment. They have been found, by molecular methods in a range of reptiles (snakes, iguanas, chameleons, turtles) and amphibians (frogs), and also in the respiratory tracts of horses, koalas (Bodetti et al., 2002), and western barred bandicoots (Kutlin et al., 2007). *C. pneumoniae* DNA may be found in ocular and urogenital

samples of asymptomatic or symptomatic koalas, but in the latter case it is associated with *C. pecorum*, suggesting that *C. pecorum* is responsible for the clinical signs (Jackson et al., 1999). Three biovars have been described (Everett, 2000): the human biovar, also designated TWAR, the equine biovar, and the koala biovar. The genotyping of *C. pneumoniae* DNA from human and non-human origin revealed that most of the strains infecting humans were similar, unlike those from animals. The koala genotype was identified in the carotid plaque of one human (Cochrane et al., 2005) and strains very similar, if not identical to the human respiratory strains, were found in reptiles and amphibians (Bodetti et al., 2002). Although the zoonotic potential of *C. pneumoniae* remains unclear, *C. pneumoniae* is now so prevalent in human that it is unknown if animals or humans were the "original" reservoir.

4.6. *Chlamydomphila pecorum*

Only three *Chlamydomphila* species, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, and *C. psittaci*, may be isolated from the brain tissue of infected hosts; however most *C. pecorum* and *C. pneumoniae* strains are not considered highly virulent. Indeed, most healthy ruminants harbor *C. pecorum* in their intestinal tract (Jee et al., 2004) despite the fact that, in addition to encephalomyelitis, this bacterium may induce several clinical signs, such as pneumonia, arthritis, conjunctivitis, enteritis, urinary tract disease, metritis, and fertility disorders, in small ruminants, cattle, swine, and koalas (Table 2). For koalas, *C. pecorum* seems more pathogenic than *C. pneumoniae*.

This species presents many antigenic and genomic variations, particularly on the MOMP (Denamur et al., 1991; Fukushi and Hirai, 1992; Kaltenboeck et al., 2008; Kuroda-Kitagawa et al., 1993; Salinas et al., 1995). Pathogenic (isolates from clinical samples) and non-pathogenic (isolates from the intestinal tracts of healthy ruminants) strains differ genetically (Yousef Mohamad et al., 2008a). Phylogenetic analysis could distinguish them based on the sequence of three potential virulence genes, *ompA*, *incA*, which encodes an inclusion membrane protein, and an ORF including a 15-nucleotide variant coding for a tandem repeat (Yousef Mohamad et al., 2008b). However, its potential zoonotic risk is still unknown.

5. Route of transmission

Chlamydomphila is shed in feces, urine, respiratory secretions, birth fluids, and placentas of infected sympto-

Table 2
Clinical signs induced by *C. pecorum* according to host species.

Clinical signs	Ewes and goats	Cattle	Swine	Koalas
Encephalomyelitis	–	+	–	–
Pneumonia	+	+	+	+
Arthritis	+	+	+	–
Conjunctivitis	+	+	+	+
Abortion	±	±	+	–
Metritis and infertility	–	+	+	+
Enteritis	–	+	+	+
Urinary tract disease	–	–	+	+

matic and asymptomatic animals, and in saliva and feather dust of birds. As EBs do not survive very long, close contact is needed with infected animals to become infected. Two factors affect the transmission of the disease: the virulence of the strains and the number of bacteria that infect the host. The minimal infecting dose of the different strains are still unknown, but some serovars of *C. psittaci* are considered very contagious for humans, unlike *C. abortus*, but the quantity of bacteria shed in the placenta of an aborting ewe or goat is much higher than that shed by birds.

Transmission of *C. psittaci* and *C. abortus* from animals to humans generally happens through inhalation of infectious dust and aerosols inducing infection of the mucosal epithelial cells and macrophages of the respiratory tract (Table 1). The bacteria eventually spread through the blood stream to involve epithelial cells and macrophages of various organs, including the placentas of pregnant women. *C. psittaci*, *C. abortus*, and *C. pneumoniae* may be detected in the PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) of infected humans or animals, whereas *C. felis*, *C. pecorum*, and *C. caviae* tend to cause local infection of the mucosa. The rate of the clearance of *C. abortus* in the blood depends on the initial inoculum. *C. felis* may be transmitted from infected cats to humans via the fingers of the owners contaminated by the ocular discharges or infected dust in the fur of the pet.

In addition to the respiratory and ocular routes, the oral route is also important for the transmission of *C. psittaci* and *C. abortus* in animals. Drinking infected water could be a source of contamination for many avian species, while predators and scavengers may become infected by ingestion of infected carcasses and water. In addition, transmission from the parent to young birds may occur at the time of feeding by regurgitation (Harkinezhad et al., 2008).

In ruminants, the infection often originates from the ingestion of placenta or grass contaminated by vaginal discharge and placenta. Goats and ewes are more liable to abort when they are infected within 100 days of gestation. However, in intensive lambing conditions, contamination at the time of lambing can lead to abortion during the following gestation (Wilsmore et al., 1984).

Vertical transmission, which promotes the persistence of the infection in ruminant herds, also occurs in birds. The infection of eggs leads to embryonic death or to the hatching of live infected young birds. A major route of infection for neonatal kittens is from the mucosal surface of the reproductive tract of their mother at birth.

The venereal transmission of *C. abortus* is possible as the bacteria are found in the semen of bulls, rams, goats, and boars. Males become infected *in utero* or after mating of infected females. However, during post-abortion ovulation, no or very few DNA copies may be detected by PCR (Livingstone et al., 2008). In addition, venereal transmission to females leads to sterility and early embryonic mortality rather than late abortions.

In the nest, *C. psittaci* may be transmitted by lice, mites, and flies (Longbottom and Coulter, 2003). A similar role for other arthropod vectors has never been demonstrated for other *Chlamydophila* species. Birds appear to be excellent

vectors for the distribution of chlamydial infection because they feed on and have access to the feces and carcass of infected animals and are highly mobile (Everett et al., 1999). Although the isolation *C. abortus* from birds is extremely rare (Herrmann et al., 2000), it has been isolated from cats and dogs on farms with infected ruminants (Salinas et al., 1995).

6. Diagnostics

Definitive diagnosis is obtained by identification of the organism. This can be achieved by microscopic examination of stained smears, by detection of Chlamydial antigen by immunofluorescence or by ELISA, whereas Chlamydial DNA can be detected by the polymerase chain reaction (PCR) or by microarray. Several commercial PCR kits are available.

The possibilities for diagnostic detection of chlamydiae improved considerably following the introduction of PCR, which permits direct identification from clinical specimens and differentiation of species. The methodologies and technologies used currently in diagnosis of chlamydial infections in animals have recently been reviewed (Sachse et al., 2008b).

The determination of the *Chlamydophila* species and the genotype for *C. psittaci* by PCR and microarray (Sachse et al., 2008a) is important because the species do not present the same zoonotic risk.

Serological analyses can help confirm the molecular diagnosis or in epidemiological studies or if the identification of the agent is not feasible. The standard serological test for chlamydial antibodies is the complement fixation (CF) test using a group-reactive lipopolysaccharide antigen present in all strains. The occurrence of high CF titer in the majority of individual in a flock is presumptive evidence of active infection. The demonstration of a 4-fold increase in titer in an individual bird is considered to be diagnostic of a current infection. In ruminants, CF test lacks specificity due to its antigen common to *C. pecorum*. Several ELISA tests *C. abortus*-specific have been developed in order to improve chlamydial serology (Vretou et al., 2007). However, whatever the serological test it cannot identify carriers and potential shedders.

In human infection is generally diagnosed by seroconversion on paired acute and convalescent phase sera, although a single acute phase titer in the setting of clinically compatible illness is significant. Low positive titers are common in people in contact with animals. False positives may occur in *C. pneumoniae* and *C. trachomatis* infections. Specific micro-immunofluorescent (MIF) test must be used to improve the diagnosis. However a recent study demonstrated the weakness of MIF test for diagnosing human psittacosis (Verminnen et al., 2008).

7. Antibiotic therapy

Tetracycline is generally used for the treatment of animal chlamydiosis. *Chlamydiae* are sensitive to several antibiotics, such as cyclines, quinolones, and macrolides. However, these antibiotics are not bactericidal and the therapeutic levels of the drug should remain for a long time

(several weeks) to eliminate the infection and avoid the risk of transmission to humans. These long-term treatments are generally too expensive and not used for ruminants.

Most human patients respond to orally administered doxycycline or tetracycline hydrochloride, however the treatment must continue for at least 10–14 days after fever abates (<http://www.nasphv.org/Documents/Psittacosis.pdf>).

7.1. *Chlamydophila psittaci*

As there are no vaccines available, antibiotic treatment usually with tetracycline is the only way to limit the infection. Treatment needs to be maintained for extended periods of time. For pet birds, 45 days is often recommended (Vanrompay et al., 1995a). Antibiotics may be given with food (chlortetracycline 500–5000 ppm according to the bird species and the type of food, doxycycline 1000 mg/kg, or enrofloxacin 250–1000 ppm) (Gerlach, 1999) or in water (doxycycline 200–800 mg/L according to the bird species) but it is necessary to verify that no other source of water is available for drinking. Better results are obtained with doxycycline in water, since it is more stable in water than food and generally more accepted by birds, except for psittacine birds, which do not drink enough. In addition, parrots may be very suspicious of anything added to their water (Billington, 2005). For individual pet birds, direct treatment allows better control of the level of antibiotic in the blood. Intramuscular injections of doxycycline provide the best results. After antibiotic treatments, bacterial clearance should be checked at the end of the treatment and periodic re-sampling is advisable to monitor relapse.

Treatments must be used only to cure sick birds. Preventive regular use of antibiotics should be avoided to prevent antibiotic resistance. Although no resistance has been found in *C. psittaci* strains, tetracycline-resistant *C. suis* have been isolated from pigs in several countries (Di Francesco et al., 2008; Dugan et al., 2004).

7.2. *Chlamydophila abortus*

In ruminants, antibiotic treatment consists of two injections of tetracycline (20 mg/kg) during the last month of gestation to reduce the number of abortions and the quantity of *C. abortus* shed at parturition (Rodolakis et al., 1980). However, the infection is not cured and the shedding of the bacteria persists as well as the threat for pregnant women. This kind of treatment must be used only to prevent a high rate of abortion at the time of the first disease outbreak in the flock, and then the animals must be vaccinated.

7.3. *Chlamydophila felis*

Doxycycline is generally recommended for the treatment of conjunctivitis in cats. Oral treatment with 10 mg/kg is more efficacious than antibiotic eye ointment, but several weeks of treatment (at least 4 weeks) are needed to avoid relapse (Dean et al., 2005). Infected cats should be

kept indoors to prevent the spread of the infection. In the case of outbreaks in a cattery, all cats must be treated and infected cats must be separated from the others to minimize exposure.

8. Vaccines

8.1. *Chlamydophila psittaci*

No commercial vaccine is available for avian chlamydiosis despite work on vaccines for turkeys and, the good protection obtained in turkeys by plasmid DNA vaccines expressing the MOMP of *C. psittaci* serovar A (Vanrompay et al., 2001, 1999), and the demonstration of the MOMP expression for at least 10 weeks after vaccination with such vaccine (Loots et al., 2006).

8.2. *Chlamydophila abortus*

Both live and inactivated vaccines for *C. abortus* have been developed. The live thermosensitive vaccine (Ovilis Enzoowax[®] or Cevac[®] Chlamydia) is more efficient and induces the same immunity as the natural disease (Rocchi et al., 2008), which reduces the clinical signs and prevents infection in challenged ewes and goats (Rodolakis and Souriau, 1983, 1986). This live vaccine may be combined with other live vaccines against brucellosis, salmonellosis (Souriau et al., 1988), and toxoplasmosis (Chalmers et al., 1997). It could be compatible with the Q fever phase 1 vaccine (Coxevac CEVA) at two different injection sites as demonstrated in mice (Rekiki et al., 2004b). It is effective against all *C. abortus* strains tested and *C. pecorum* (Rekiki et al., 2004a), but not against *C. psittaci*. However, vaccination induces the production of antibodies that cannot be differentiated from those of naturally infected animals (Borel et al., 2005). Until now, no subunit or recombinant vaccines are as effective as the live vaccine (Longbottom and Livingstone, 2006). In contrast to *C. psittaci*, plasmid DNA vaccines expressing the MOMP of *C. abortus* either did not protect mice against a virulent challenge (Hechard et al., 2003) or less effectively than the live vaccine (Zhang et al., 2008).

No boosters are needed for about 5 years, but young animals and those newly introduced to the flock must be vaccinated during those 5 years. Indeed, abortion may persist during 3–5 years after the vaccination due to the infected females that give birth to infected young susceptible to abortions. The live vaccine is very safe. Thousands of ewes and goats have been vaccinated without problems, but pregnant females should not be vaccinated.

8.3. *Chlamydophila felis*

Both live and inactivated vaccines for *C. felis* have been used in Europe, the US, and Japan. The live attenuated vaccine is more efficient and reduces clinical signs, but does not completely prevent infection (Shewen et al., 1980). This live vaccine may be combined with a trivalent live vaccine against herpesvirus, calicivirus, and panleukopenia virus (Starr, 1993). In addition, a new specific

antigen should distinguish between infected and vaccinated cats, as high levels of antibodies against this antigen are detected only in the sera of infected cats (Ohya et al., 2008). Vaccination of cats living in close contact (cattery, pet shops, or pet keepers) is recommended.

9. Conclusion

The prevalence of chlamydial infections in humans, including the psittacosis, is likely underestimated in many countries, including the US, Australia, and several European countries, such as Belgium, Germany, and Switzerland, where it is a notifiable disease.

A cheap and efficacious vaccine against *C. psittaci* is needed to prevent infection in poultry and avoid contamination of workers in turkey and duck processing plants. Genetic vaccines are too expensive and probably not acceptable to consumers but could be considered for pets birds to reduce the use of systematic antibiotic treatments, or perhaps for at risk humans.

Everyone in contact with birds should be informed about the clinical signs of chlamydial infection and quickly seek medical attention for themselves and their pets if they have any suspicion of contamination. In addition, routine hygienic precautions are recommended when handling and feeding birds and cats. Children must be advised to avoid close face-to-face contact with cats and guinea pigs with conjunctivitis. Pregnant women, especially those who live in rural areas, should be made aware of the risks of zoonotic diseases and how to avoid them.

Conflict of interest

The authors certify that they have no financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the paper entitled “Zoonotic Potential of *Chlamydophila*”.

References

- Andersen, A.A., 1997. Two new serovars of *Chlamydia psittaci* from North American birds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 159–164.
- Baker, J.A., 1944. Virus causing pneumonia in cats and producing elementary bodies. *J. Exp. Med.* 79, 159–172.
- Batteiger, B.E., Rank, R.G., 1987. Analysis of the humoral immune response to chlamydial genital infection in guinea pigs. *Infect. Immun.* 55, 1767–1773.
- Bedson, S.P., Western, G.T., Simpson, S.L., 1930. Observations on the ethiology of psittacosis. *Lancet* 1, 235–236.
- Beer, R.J., Bradford, W.P., Hart, R.J., 1982. Pregnancy complicated by psittacosis acquired from sheep. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 284, 1156–1157.
- Bernkopf, H., Masiah, P., Becker, Y., 1962. Correlation between morphological and biochemical changes and the appearance of infectivity in FL cell cultures infected with trachoma agent. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 98, 62–81.
- Billington, S., 2005. Clinical and zoonotic aspects of psittacosis. In *Pract.* 27, 256–263.
- Bodetti, T.J., Jacobson, E., Wan, C., Hafner, L., Pospischil, A., Rose, K., Timms, P., 2002. Molecular evidence to support the expansion of the host-range of *Chlamydophila pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 146–152.
- Borel, N., Sachse, K., Rassbach, A., Bruckner, L., Vretou, E., Psarrou, E., Pospischil, A., 2005. Ovine enzootic abortion (OEA): antibody response in vaccinated sheep compared to naturally infected sheep. *Vet. Res. Commun.* 29 (Suppl. 1), 151–156.
- Burnet, F.M., Rountree, P.M., 1935. Psittacosis in the developing egg. *J. Pathol. Bact.* 40, 471–481.
- Bush, R.M., Everett, K.D., 2001. Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 203–220.
- Buxton, D., 1986. Potential danger to pregnant women of *Chlamydia psittaci* from sheep. *Vet. Rec.* 118, 510–511.
- Camenisch, U., Lu, Z.H., Vaughan, L., Corboz, L., Zimmermann, D.R., Wittenbrink, M.M., Pospischil, A., Sydler, T., 2004. Diagnostic investigation into the role of *Chlamydiae* in cases of increased rates of return to oestrus in pigs. *Vet. Rec.* 155, 593–596.
- Chalmers, W.S., Simpson, J., Lee, S.J., Baxendale, W., 1997. Use of a live chlamydial vaccine to prevent ovine enzootic abortion. *Vet. Rec.* 141, 63–67.
- Cochrane, M., Walker, P., Gibbs, H., Timms, P., 2005. Multiple genotypes of *Chlamydia pneumoniae* identified in human carotid plaque. *Microbiology* 151, 2285–2290.
- Cotton, M.M., Partridge, M.R., 1998. Infection with feline *Chlamydia psittaci*. *Thorax* 53, 75–76.
- Crosse, B.A., Gomes, P., Muers, M.M., 1971. Ovine psittacosis and sarcoïdosis in a pregnant woman. *N. Engl. J. Med.* 284, 642–653.
- Dean, R., Harley, R., Helps, C., Caney, S., Gruffydd-Jones, T., 2005. Use of quantitative real-time PCR to monitor the response of *Chlamydophila felis* infection to doxycycline treatment. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1858–1864.
- Denamur, E., Sayada, C., Souriau, A., Orfila, J., Rodolakis, A., Elion, J., 1991. Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2525–2530.
- Di Francesco, A., Donati, M., Rossi, M., Pignatelli, S., Shurdi, A., Baldelli, R., Cevenini, R., 2008. Tetracycline-resistant *Chlamydia suis* isolates in Italy. *Vet. Rec.* 163, 251–252.
- Dugan, J., Rockey, D.D., Jones, L., Andersen, A.A., 2004. Tetracycline resistance in *Chlamydia suis* mediated by genomic islands inserted into the chlamydial inv-like gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3989–3995.
- Everett, K.D., 2000. *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. *Vet. Microbiol.* 75, 109–126.
- Everett, K.D., Bush, R.M., Andersen, A.A., 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (Pt 2), 415–440.
- Fukushi, H., Hirai, K., 1992. Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 306–308.
- Geens, T., Desplanques, A., Van Loock, M., Bonner, B.M., Kaleta, E.F., Magnino, S., Andersen, A.A., Everett, K.D., Vanrompay, D., 2005. Sequencing of the *Chlamydophila psittaci ompA* gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2456–2461.
- Gerlach, H., 1999. *Chlamydia*. In: Ritchie, B.W., Harrison, G.J., Harrison, L.R. (Eds.), *Avian Medicine: Principles and Application*. HBD International Inc., Delray Beach, FL, pp. 984–996.
- Giroud, P., Roger, F., Dumas, N., 1956. Certain abortions in women could be attributed to agents belonging to the psittacosis group. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 242, 697–699.
- Gönnert, R., 1941. Die bronchopneumonie, eine neue viruskrankheit der maus. *Zbl Bakt (Orig)* 147, 161–174.
- Griffiths, P.D., Lechler, R.I., Trehan, J.D., 1978. Unusual chlamydial infection in a human renal allograft recipient. *Br. Med. J.* 2, 1264–1265.
- Halberstädter, L., von Prowazek, S., 1907. Über zellieinschlüsse parasitärer natur beim trachom. *Arb. Gesundheitsamt Berlin* 26, 44–47.
- Harkinezhad, T., Geens, T., Vanrompay, D., 2008. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. *Vet. Microbiol.*, doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.046.
- Hartley, J.C., Stevenson, S., Robinson, A.J., Littlewood, J.D., Carder, C., Cartledge, J., Clark, C., Ridgway, G.L., 2001. Conjunctivitis due to *Chlamydia felis* (*Chlamydia psittaci* feline pneumonitis agent) acquired from a cat: case report with molecular characterization of isolates from the patient and cat. *J. Infect.* 43, 7–11.
- Hechard, C., Grepinet, O., Rodolakis, A., 2003. Evaluation of protection against *Chlamydophila abortus* challenge after DNA immunization with the major outer-membrane protein-encoding gene in pregnant and non-pregnant mice. *J. Med. Microbiol.* 52, 35–40.
- Herring, A.J., Anderson, I.E., McClenaghan, M., Inglis, N.F., Williams, H., Matheson, B.A., West, C.P., Rodger, M., Brettie, P.P., 1987. Restriction endonuclease analysis of DNA from two isolates of *Chlamydia psittaci* obtained from human abortions. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 295, 1239.

- Herrmann, B., Persson, H., Jensen, J.K., Joensen, H.D., Klint, M., Olsen, B., 2006. *Chlamydia psittaci* in Fulmars, the Faroe Islands. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 330–332.
- Herrmann, B., Rahman, R., Bergstrom, S., Bonnedahl, J., Olsen, B., 2000. *Chlamydia abortus* in a Brown skua (*Catharacta antarctica lonnbergi*) from a subantarctic island. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3654–3656.
- Hobson, D., Rees, E., 1982. Pregnancy complicated by psittacosis acquired from sheep. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 284, 1560–1561.
- Hoelzle, L.E., Steinhilber, G., Wittenbrink, M.M., 2000. PCR-based detection of chlamydial infection in swine and subsequent PCR-coupled genotyping of chlamydial *omp1*-gene amplicons by DNA-hybridization, RFLP-analysis, and nucleotide sequence analysis. *Epidemiol. Infect.* 125, 427–439.
- Idu, S.R., Zimmerman, C., Mulder, L., Meis, J.F., 1998. A very serious course of psittacosis in pregnancy. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 142, 2586–2589.
- Jackson, M., White, N., Giffard, P., Timms, P., 1999. Epizootiology of *Chlamydia* infections in two free-range koala populations. *Vet. Microbiol.* 65, 255–264.
- Jee, J., Degraives, F.J., Kim, T., Kaltenboeck, B., 2004. High prevalence of natural *Chlamydia* species infection in calves. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5664–5672.
- Johnson, F.W., 1983. Chlamydiosis. *Br. Vet. J.* 139, 93–101.
- Jorgensen, D.M., 1997. Gestational psittacosis in a Montana sheep rancher. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 191–194.
- Kaltenboeck, B., Heinen, E., Schneider, R., Wittenbrink, M.M., Schmeer, N., 2008. *OmpA* and antigenic diversity of bovine *Chlamydia* *pecorum* strains. *Vet. Microbiol.*, doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.036.
- Kampinga, G.A., Schroder, F.P., Visser, I.J., Anderson, J.M., Buxton, D., Moller, A.V., 2000. Lambing ewes as a source of severe psittacosis in a pregnant woman. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 144, 2500–2504.
- Kauffold, J., Melzer, F., Henning, K., Schulze, K., Leiding, C., Sachse, K., 2006. Prevalence of *Chlamydiae* in boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology* 65, 1750–1758.
- Khatib, R., Thirumoorthi, M.C., Kelly, B., Grady, K.J., 1995. Severe psittacosis during pregnancy and suppression of antibody response with early therapy. *Scand. J. Infect. Dis.* 27, 519–521.
- Kuroda-Kitagawa, Y., Suzuki-Muramatsu, C., Yamaguchi, T., Fukushima, H., Hirai, K., 1993. Antigenic analysis of *Chlamydia pecorum* and mammalian *Chlamydia psittaci* by use of monoclonal antibodies to the major outer membrane protein and a 56- to 64-kd protein. *Am. J. Vet. Res.* 54, 709–712.
- Kutlin, A., Roblin, P.M., Kumar, S., Kohlhoff, S., Bodetti, T., Timms, P., Hammerschlag, M.R., 2007. Molecular characterization of *Chlamydia pneumoniae* isolates from Western barred bandicoots. *J. Med. Microbiol.* 56, 407–417.
- Laroucau, K., de Barbeyrac, B., Vorimore, F., Clerc, M., Bertin, C., Harkinezhad, T., Verminnen, K., Obeniche, F., Capek, I., Bebear, C., Durand, B., Zanella, G., Vanrompay, D., Garin-Bastuji, B., Sachse, K., 2008. Chlamydial infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France. *Vet. Microbiol.*, doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.048.
- Laroucau, K., Vorimore, F., Bertin, C., Yousef Mohamad, K., Thierry, S., Hermann, W., Maingourd, C., Pourcel, C., Longbottom, D., Magnino, S., Sachse, K., Vretou, E., Rodolakis, A., 2009. Genotyping of *Chlamydia abortus* strains by multilocus VNTR analysis. *Vet. Microbiol.*, doi:10.1016/j.vetmic.2009.01.029.
- Livingstone, M., Wheelhouse, N., Maley, S.W., Longbottom, D., 2008. Molecular detection of *Chlamydia abortus* in post-abortion sheep at oestrus and subsequent lambing. *Vet. Microbiol.*, doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.033.
- Longbottom, D., Coulter, L.J., 2003. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J. Comp. Pathol.* 128, 217–244.
- Longbottom, D., Livingstone, M., 2006. Vaccination against chlamydial infections of man and animals. *Vet. J.* 171, 263–275.
- Loots, K., Look, M.V., Vanrompay, D., Goddeeris, B.M., 2006. CpG motifs as adjuvant in DNA vaccination against *Chlamydia psittaci* in turkeys. *Vaccine* 24, 4598–4601.
- Lutz-Wohlgroth, L., Becker, A., Brugnera, E., Huat, Z.L., Zimmermann, D., Grimm, F., Haessig, M., Greub, G., Kaps, S., Spiess, B., Pospischil, A., Vaughan, L., 2006. *Chlamydiales* in guinea-pigs and their zoonotic potential. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 53, 185–193.
- Magnino, S., Haag-Wackernagel, D., Geigenfeind, I., Helmecke, S., Dovc, A., Prukner-Radovic, E., Residbegovic, E., Ilieski, V., Laroucau, K., Donati, M., Martinov, S., Kaleta, E.F., 2008. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: review of data and focus on public health implications. *Vet. Microbiol.*, doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.045.
- Masubuchi, K., Nosaka, H., Iwamoto, K., Kokubu, T., Yamanaka, M., Shimizu, Y., 2002. Experimental infection of cats with *Chlamydia felis*. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 1165–1168.
- McNutt, S.H., Waller, E.F., 1940. Sporadic bovine encephalomyelitis. *Cornell Vet.* 30, 437–448.
- Moulder, J.W., 1966. The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and virus. *Annu. Rev. Microbiol.* 20, 107–130.
- Ohya, K., Takahara, Y., Kuroda, E., Koyasu, S., Hagiwara, S., Sakamoto, M., Hisaka, M., Morizane, K., Ishiguro, S., Yamaguchi, T., Fukushima, H., 2008. *Chlamydia felis* CF0218 is a novel TMH family protein with potential as a diagnostic antigen for diagnosis of *C. felis* infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 1606–1615.
- Ostler, H.B., Schachter, J., Dawson, C.R., 1969. Acute follicular conjunctivitis of epizootic origin. Feline pneumonitis. *Arch. Ophthalmol.* 82, 587–591.
- Page, L.A., 1968. Proposal for the recognition of two species in the genus *Chlamydia*. Jones, Rake, and Stearns 1945. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 18, 51–56.
- Petrovay, F., Balla, E., 2008. Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydia psittaci*. *J. Med. Microbiol.* 57, 1296–1298.
- Pospischil, A., Thoma, R., Hilbe, M., Grest, P., Zimmermann, D., Gebbers, J.O., 2002. Abortion in humans caused by *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 144, 463–466.
- Regan, R.J., Dathan, J.R., Trehan, J.D., 1979. Infective endocarditis with glomerulonephritis associated with cat *Chlamydia* (*C. psittaci*) infection. *Br. Heart J.* 42, 349–352.
- Rekiki, A., Bouakane, A., Hammami, S., El Idrissi, A.H., Bernard, F., Rodolakis, A., 2004a. Efficacy of live *Chlamydia abortus* vaccine 1B in protecting mice placentas and fetuses against strains of *Chlamydia pecorum* isolated from cases of abortion. *Vet. Microbiol.* 99, 295–299.
- Rekiki, A., Bouakane, A., Rodolakis, A., 2004b. Combined vaccination of live 1B *Chlamydia abortus* and killed phase I *Coxiella burnetii* vaccine does not destroy protection against chlamydiosis in a mouse model. *Can. J. Vet. Res.* 68, 226–228.
- Roberts, W., Grist, N.R., Giroud, P., 1967. Human abortion associated with infection by ovine abortion agent. *Br. Med. J.* 4, 37–39.
- Rocchi, M.S., Wattedegera, S., Meridiani, I., Entrican, G., 2008. Protective adaptive immunity to *Chlamydia abortus* infection and control of ovine enzootic abortion (OEA). *Vet. Microbiol.*, doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.030.
- Rodolakis, A., Bernard, K., 1977. Isolation of *Chlamydia* from genital tract of rams affected by clinical epididymitis. *Bull. Acad. Vet. France* 50, 65–70.
- Rodolakis, A., Salinas, J., Papp, J., 1998. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet. Res.* 29, 275–288.
- Rodolakis, A., Souriau, A., 1983. Response of ewes to temperature-sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* (var *ovis*) obtained by NTG mutagenesis. *Ann. Rech. Vet.* 14, 155–161.
- Rodolakis, A., Souriau, A., 1986. Response of goats to vaccination with temperature-sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* obtained by nitrosoguanidine mutagenesis. *Am. J. Vet. Res.* 47, 2627–2631.
- Rodolakis, A., Souriau, A., Raynaud, J.P., Brunault, G., 1980. Efficacy of a long-acting oxytetracycline against chlamydial ovine abortion. *Ann. Rech. Vet.* 11, 437–444.
- Sachse, K., Hotzel, H., Slickers, P., Ellinger, T., Ehrlich, R., 2005. DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydia* spp. *Mol. Cell. Probes* 19, 41–50.
- Sachse, K., Laroucau, K., Vorimore, F., Magnino, S., Feige, J., Muller, W., Kube, S., Hotzel, H., Schubert, E., Slickers, P., Ehrlich, R., 2008a. DNA microarray-based genotyping of *Chlamydia psittaci* strains from culture and clinical samples. *Vet. Microbiol.*, doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.041.
- Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A., Longbottom, D., 2008b. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Vet. Microbiol.*, doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.040.
- Salinas, J., Souriau, A., Cuello, F., Rodolakis, A., 1995. Antigenic diversity of ruminant *Chlamydia psittaci* strains demonstrated by the indirect immunofluorescence test with monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 43, 219–226.
- Schachter, J., Ostler, H.B., Meyer, K.F., 1969. Human infection with the agent of feline pneumonitis. *Lancet* 1, 1063–1065.
- Schachter, J., Stephens, R.S., Timms, P., Kuo, C., Bavoil, P.M., Birkelund, S., Boman, J., Caldwell, H., Campbell, L.A., Chernesky, M., Christiansen, G., Clarke, I.N., Gaydos, C., Grayston, J.T., Hackstadt, T., Hsia, R., Kaltenboeck, B., Leinonen, M., Ojcius, D., McClarty, G., Orfila, J., Peeling, R., Puolakkainen, M., Quinn, T.C., Rank, R.G., Raulston, J., Ridgeway, G.L., Saikku, P., Stamm, W.E., Taylor-Robinson, D.T., Wang, S.P., Wyrick, P.B., 2001. Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 249 (author reply 243–251).
- Shewen, P.E., Povey, R.C., Wilson, M.R., 1980. A comparison of the efficacy of a live and four inactivated vaccine preparations for the protection of cats against experimental challenge with *Chlamydia psittaci*. *Can. J. Comp. Med.* 44, 244–251.

- Souriau, A., Bosseray, N., Rodolakis, A., Lantier, F., Plommet, M., 1988. Anti-chlamydial immunity in ewes conferred by vaccination with a combination of three live *chlamydia*, *brucella* and *salmonella* vaccines. *Vet. Rec.* 123 (12), 29–32.
- Sprague, L.D., Schubert, E., Hotzel, H., Scharf, S., Sachse, K., 2008. The detection of *Chlamydomydia psittaci* genotype C infection in dogs. *Vet. J.*, doi:10.1016/j.tvjl.2008.04.002.
- Stamp, J.T., McEwen, A.D., Watt, J.A.A., Nisbet, D.J., 1950. Enzootic abortion in ewes. I Transmission of the disease. *Vet. Rec.*, 62, 251–254.
- Starr, R.M., 1993. Reaction rate in cats vaccinated with a new controlled-titer feline panleukopenia-rhinotracheitis-calicivirus-*Chlamydia psittaci* vaccine. *Cornell Vet.* 83, 311–323.
- Stepanek, O., Jindrichova, J., Horacek, J., Krpata, V., 1983. Chlamydiosis in cattle and in man: an epidemiologic and serologic study. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 27, 445–459.
- Stephens, R.S., 2008. Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy resolved. In: Sixth meeting of the European Society for Chlamydia Research, Aarhus, DK, pp. 131–136.
- Storz, J., 1971. Chlamydia and Chlamydia-Induced Diseases. Thomas CC, Springfield, IL, USA, 358 pp.
- Storz, J., Page, L.A., 1971. Taxonomy of the *Chlamydiae*: reasons for classifying organisms of the genus *Chlamydia*, Family *Chlamydiaceae*, in a separate order, *Chlamydiales* ord. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 21, 332–334.
- Tersikh, I.I., Dzhavad-Zade, M.D., Kakhrmanov, T.B., Popova, O.M., Maikova-Kasumova, A.D., 1977. Role of *Chlamydia* in the pathology of pregnancy and chronic gynecological diseases. *Vopr. Virusol.* 484–488.
- TerWee, J., Sabara, M., Kokjohn, K., Sandbulte, J., Frenchick, P., Dreier, K.J., 1998. Characterization of the systemic disease and ocular signs induced by experimental infection with *Chlamydia psittaci* in cats. *Vet. Microbiol.* 59, 259–281.
- Theegarten, D., Sachse, K., Mentrup, B., Fey, K., Hotzel, H., Anhehn, O., 2008. *Chlamydomydia* spp. infection in horses with recurrent airway obstruction: similarities to human chronic obstructive disease. *Respir. Res.* 9, 14.
- Thoma, R., Guscetti, F., Schiller, I., Schmeer, N., Corboz, L., Pospischil, A., 1997. *Chlamydiae* in porcine abortion. *Vet. Pathol.* 34, 467–469.
- Thygeson, P., 1934. The etiology of inclusion blennorrhoea. *Am. J. Ophthalm.* 17, 1019–1026.
- Thygeson, P., 1962. Thrachoma virus: historical background and review of isolates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 98, 6–13.
- Van Loock, M., Vanrompay, D., Herrmann, B., Vander Stappen, J., Volckaert, G., Goddeeris, B.M., Everett, K.D., 2003. Missing links in the divergence of *Chlamydomydia abortus* from *Chlamydomydia psittaci*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 761–770.
- Vanrompay, D., Cox, E., Kaiser, P., Lawson, S., Van Loock, M., Volckaert, G., Goddeeris, B., 2001. Protection of turkeys against *Chlamydomydia psittaci* challenge by parenteral and mucosal inoculations and the effect of turkey interferon-gamma on genetic immunization. *Immunology* 103, 106–112.
- Vanrompay, D., Cox, E., Vandenbussche, F., Volckaert, G., Goddeeris, B., 1999. Protection of turkeys against *Chlamydia psittaci* challenge by gene gun-based DNA immunizations. *Vaccine* 17, 2628–2635.
- Vanrompay, D., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 1995a. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet. Microbiol.* 45, 93–119.
- Vanrompay, D., Mast, J., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Goddeeris, B., 1995b. *Chlamydia psittaci* in turkeys: pathogenesis of infections in avian serovars A, B and D. *Vet. Microbiol.* 47, 245–256.
- Verminnen, K., Duquenne, B., De Keukeleire, D., Duim, B., Pannekoek, Y., Braeckman, L., Vanrompay, D., 2008. Evaluation of a *Chlamydomydia psittaci* infection diagnostic platform for zoonotic risk assessment. *J. Clin. Microbiol.* 46, 281–285.
- Villemonteix, P., Agius, G., Ducroz, B., Rouffineau, J., Plocoste, V., Castets, M., Magnin, G., 1990. Pregnancy complicated by severe *Chlamydia psittaci* infection acquired from a goat flock: a case report. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 37, 91–94.
- Vretou, E., Radouani, F., Psarrou, E., Kritikos, I., Xylouri, E., Mangana, O., 2007. Evaluation of two commercial assays for the detection of *Chlamydomydia abortus* antibodies. *Vet. Microbiol.* 123, 153–161.
- Walder, G., Hotzel, H., Brezinka, C., Gritsch, W., Tauber, R., Wurznier, R., Ploner, F., 2005. An unusual cause of sepsis during pregnancy: recognizing infection with *Chlamydomydia abortus*. *Obstet. Gynecol.* 106, 1215–1217.
- Waldhalm, D.G., Frank, F.W., Meinershagen, W.A., Philip, R.N., Thomas, L.A., 1971. Lambing performance of ewes inoculated with *Chlamydia* sp before and after breeding. *Am. J. Vet. Res.* 32, 809–811.
- Weiss, E., Schramek, S., Wilson, N.N., Newman, L.W., 1970. Deoxyribonucleic acid heterogeneity between human and murine strains of *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 2, 24–28.
- Wilmshire, A.J., Parsons, V., Dawson, M., 1984. Experiments to demonstrate routes of transmission of ovine enzootic abortion. *Br. Vet. J.* 140, 380–391.
- Wong, S.Y., Gray, E.S., Buxton, D., Finlayson, J., Johnson, F.W., 1985. Acute placentitis and spontaneous abortion caused by *Chlamydia psittaci* of sheep origin: a histological and ultrastructural study. *J. Clin. Pathol.* 38, 707–711.
- Yamura, H.Y., Meyer, K.F., 1941. Studies on the virus of psittacosis cultivated *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 68, 1–15.
- Yan, C., Fukushima, H., Matsudate, H., Ishihara, K., Yasuda, K., Kitagawa, H., Yamaguchi, T., Hirai, K., 2000. Seroepidemiological investigation of feline chlamydiosis in cats and humans in Japan. *Microbiol. Immunol.* 44, 155–160.
- Yousef Mohamad, K., Rekiki, A., Myers, G., Bavoil, P.M., Rodolakis, A., 2008a. Identification and characterisation of coding tandem repeat variants in *IncA* gene of *Chlamydomydia pecorum*. *Vet. Res.* 39, 56.
- Yousef Mohamad, K., Roche, S.M., Myers, G., Bavoil, P.M., Laroucau, K., Magnino, S., Laurent, S., Rasschaert, D., Rodolakis, A., 2008b. Preliminary phylogenetic identification of virulent *Chlamydomydia pecorum* strains. *Infect. Genet. Evol.* 8, 764–771.
- Zhang, F., Li, S., Yang, J., Yang, L., He, C., 2008. Induction of a Protective Immune Response Against Swine *Chlamydomydia abortus* Infection in Mice Following Co-Vaccination of *omp-1* DNA with Recombinant MOMP. *Zoonoses Public Health*, doi:10.1111/j.1863-2378.2008.01160.x.

Annexe 3 :

Genotyping of *Chlamydomophila abortus* strains by multilocus VNTR analysis

Karine Laroucau a, Fabien Vorimore, Claire Bertin, **Khalil Yousef Mohamad**, Simon Thierry, Willems Hermann, Cyril Maingourd, Christine Pourcel, David Longbottom, Simone Magnino, Konrad Sachse, Evangelia Vretou, Annie Rodolakis



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

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



Genotyping of *Chlamydomophila abortus* strains by multilocus VNTR analysis

Karine Laroucau^{a,*}, Fabien Vorimore^a, Claire Bertin^a, Khalil Yousef Mohamad^b,
Simon Thierry^a, Willems Hermann^c, Cyril Maingourd^d, Christine Pourcel^e,
David Longbottom^f, Simone Magnino^g, Konrad Sachse^h, Evangelia Vretouⁱ, Annie Rodolakis^b

^a Unité Zoonoses Bactériennes, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (Lerpaz), 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France

^b INRA, UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, 37380 Nouzilly, France

^c Institute for Hygiene and Infectious Diseases of Animals, Justus-Liebig University Giessen, Frankfurter Str. 85–89, D-35392 Giessen, Germany

^d LASAT – Laboratoire d'Analyses Sèvres Atlantique, 210 avenue de la Venise Verte, BP570, 79022 NIORT, France

^e Génome Polymorphisme et Minisatellites (GPMS), Institut de Génétique et Microbiologie, Bat. 400, UMR CNRS 8621, Université Paris XI, 91405 Orsay cedex, France

^f Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan, Penicuik, Midlothian EH26 0PZ, UK

^g National Reference Laboratory for Animal Chlamydioses, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Sezione Diagnostica di Pavia, Strada Campeggi 61, 27100 Pavia, Italy

^h Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), Institute of Molecular Pathogenesis, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, Germany

ⁱ Laboratory of Biotechnology, Hellenic Pasteur Institute, Vassilissis Sofias Avenue 127, 11521 Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2008

Received in revised form 13 January 2009

Accepted 19 January 2009

Keywords:

Chlamydomophila abortus

Intra-species differentiation

MLVA typing

Molecular epidemiology

ABSTRACT

Chlamydomophila (*C.*) *abortus* is the causative agent of ovine enzootic abortion with zoonotic potential whose epidemiology has been held back because of the obligate intracellular habitat of the bacterium. In the present study, we report on a molecular typing method termed multiple loci variable number of tandem repeats (VNTR) Analysis (MLVA) for exploring the diversity of *C. abortus*. An initial analysis performed with 34 selected genetic loci on 34 ruminant strains including the variant Greek strains LLG and POS resulted in the identification of five polymorphic loci, confirming the widely held notion that *C. abortus* is a very homogeneous species. Analysis of additional 111 samples with the selected five loci resulted in the classification of all strains into six genotypes with distinct molecular patterns termed genotypes [1] through [6]. Interestingly, the classification of the isolates in the six genotypes was partly related to their geographical origin. Direct examination of clinical samples proved the MLVA to be suitable for direct typing. Analysis of the genomic sequences in six *C. abortus* prototypes of amplicons generated with each of the five selected VNTR primers revealed that variation between genotypes was caused by the presence or absence of coding tandem repeats in three loci. Amplification of *Chlamydomophila psittaci* reference strains with the five selected VNTR primers and of the six *C. abortus* prototype strains with the eight VNTR primers established for the typing of *C. psittaci* [Laroucau, K., Thierry, S., Vorimore, F., Blanco, K., Kaleta, E., Hoop, R., Magnino, S., Vanrompay, D., Sachse, K., Myers, G.S., Bavoil, P.M., Vergnaud, G., Pourcel, C., 2008. High resolution typing of *Chlamydomophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). Infect. Genet. Evol. 8(2), 171–181] showed that both MLVA typing systems were species-specific when all respective VNTR primer sets were used.

In conclusion, the newly developed MLVA system provides a highly sensitive, high-resolution and easy-to-perform tool for the differentiation of *C. abortus* isolates of different origin, which is suitable for molecular epidemiological studies.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 49 77 13 00; fax: +33 1 49 77 13 44.
E-mail address: k.laroucau@afssa.fr (K. Laroucau).

1. Introduction

The family *Chlamydiaceae* comprises a group of obligate intracellular bacteria that are distributed worldwide and can infect both humans and animals. Two genera have been defined within the family, the genus *Chlamydia* including the species *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum* and *Chlamydia suis* and the genus *Chlamydo-phila* (C.), consisting of the species *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. pecorum* and *C. pneumoniae* (Everett et al., 1999).

C. abortus is the causative agent of abortion and foetal loss in sheep, goats and cattle in many countries around the world (Aitken and Longbottom, 2007). In addition, the bacterium has been isolated from cases of epididymitis, pneumonia, arthritis, conjunctivitis, and from the faeces of healthy sheep and goats (Denamur et al., 1991; Souriau et al., 1993; Salinas et al., 1995; Salti-Montesanto et al., 1997). *C. abortus* has also been associated with cases of abortion in horses, rabbits, guinea pigs and mice (Everett et al., 1999). The bacterium is known to possess zoonotic potential. Pregnant women may suffer severe infections, including spontaneous abortion, following exposure to animals infected with *C. abortus* (Buxton, 1986; Pospischil et al., 2002; Walder et al., 2005).

Until now, typing methods using monoclonal antibodies, RFLP analysis of the *ompA* gene, ribosomal RNA and *ompA* gene sequencing have consistently failed to reveal any differences between *C. abortus* isolates, whatever the host, the associated disease or the geographical origin (Denamur et al., 1991; Salinas et al., 1995; Everett et al., 1999). Exceptions to this were the Greek strains LLG and POS that were characterized as variants based on inclusion morphology, antigenic and molecular diversity (Vretou et al., 1996, 2001; Siarkou et al., 2002). However, a more sophisticated molecular typing tool, the amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis, allowed discerning the French strains from others even when ribosomal RNA gene and *ompA* sequences were highly conserved (Boumedine and Rodolakis, 1998).

With the increasing availability of whole bacterial genome sequences, new molecular tools based on genome-wide screening have been developed. The typing method termed multiple loci variable number of tandem repeats (VNTR) analysis (MLVA) is based on the detection of tandem repeat polymorphisms in the bacterial genome (Vergnaud and Pourcel, 2006). The method has been used successfully for typing many pathogens including *C. psittaci* the causative agent of avian chlamydiosis. This recently developed MLVA system was capable of classifying a panel of 150 *C. psittaci* isolates into 20 clusters based on eight VNTR loci and their respective PCR amplified sizes (Laroucau et al., 2008).

The aim of the present study was to explore the potential of MLVA for revealing the molecular diversity of *C. abortus* isolates and to assess its usefulness for future epidemiological investigations. Since *C. abortus* and *C. psittaci* are genetically closely related we also aimed to assess the potential of the MLVA systems to discriminate between the two species.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and isolates

C. abortus strains, isolates and DNA samples were obtained from INRA (Nouzilly, France), the Friedrich-Loeffler-Institut (Jena, Germany), the Hellenic Pasteur Institute (Athens, Greece), the Institute for Hygiene and Infectious Diseases of Animals (Giessen, Germany), the Moredun Research Institute (Edinburgh, Scotland), and the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Pavia, Italy). The characteristics of the strains investigated, including origin and source, are presented in Table 1. Sixty-seven strains originated from Germany and 19, 16, 12 and 10 strains were from France, the UK, Italy and Greece, respectively. Extra-European samples were from USA (3 strains), Namibia (4 strains) and Tunisia (4 strains). Finally, 10 strains were of unknown origin. In total, 145 samples were investigated. All the strains were isolated from clinically affected animals except Mo907, iC1 and 71 which were faecal isolates from apparently healthy animals.

C. psittaci reference strains Loth, CP3, GR9, NJ1, Cal10 and VS225 for avian serotypes A through F were from AFSSA (Maisons-Alfort, France). DNA was obtained as previously described (Laroucau et al., 2008).

2.2. Clinical samples

A panel of nine clinical samples collected from French cases of abortion from sheep, cattle and goat were directly subjected to DNA extraction using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). DNA was eluted with 150 µl of AE buffer and stored at –20 °C before analysis (Table 2). Infection by *C. abortus* was detected by a *C. abortus*-specific real-time PCR targeting the *ompA* gene (Pantchev et al., 2008). The protocol included primers Cpa-F (5'-GCAACTGACACTAAGTCGGCTACA-3'), Cpa-R (5'-ACAAGCATGTTCAATCGATAAGAGA-3'), and probe Cpa-p (FAM-5'-TAAATACCACGAATGGCAAGTTGGTTTAGCG-3'-TAMRA). Each reaction mix contained 2 µl of sample DNA template, 10 µl of Universal Mastermix 2× (Applied Biosystems), 0.5 µl of each primer (25 µM), 2 µl of the probe (1 µM), and 5 µl deionized water. The temperature-time profile was 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 15 s, and at 60 °C for 60 s.

2.3. MLVA genotyping method

Tandem repeat sequences within the whole genome sequence of the *C. abortus* strain S26/3 (GenBank acc. no. CR848038; Thomson et al., 2005) were determined using the Tandem Repeat Finder (TRF) program (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) (Benson, 1999). Thirty-four tandem repeats with a repeat unit equal to or larger than 6 bp were identified and primers for PCR amplification were chosen on both sides of the repeats (Table 3). PCRs were performed on an initial set of 34 *C. abortus* strains underlined in Table 1.

For the VNTR amplifications, PCR was performed in a total volume of 15 µl containing 5–10 ng of DNA, 1× PCR

Table 1

C. abortus isolates organised by MLVA genotype. Genotypes were based on similarity clustering of PCR product sizes obtained with the five selected primer sets; genotypes are characterized by numbers 1 through 6, shown in square brackets. Underlined strains were used for the complete MLVA based on 34 sets of primers.

MLVA genotype	ChlaAb_457	ChlaAb_581	ChlaAb_620	ChlaAb_914	ChlaAb_300	Nb of strains	Country	Species	Strains
[1]	1	1	1	1	3	1	De De De De	Sheep Cattle Goat Sheep	C9/98 ^c 03DC34 ^c , 03DC37 ^c , 1274/80 ^d , Tiho 22 ^d Kra ^b C1/98 ^c , C10/98 ^c , C17/98 ^c , C7/98 ^c , DC1 ^c , DC7 ^c , Z 339/84 ^d , Z 375/99 ^d , Z 346/99 ^d , Z 295/99 ^d , Z 241-IV/99 ^d , Z 241-III/99 ^d , Z 236-I/99 ^d , Z 227/99 ^d , Z 203/99 ^d , Z 184/99 ^d , Z 183/99 ^d , Z 174/99 ^d , Z 153/99 ^d , Z 154/99 ^d , Z 81/99 ^d , Z 106/97 ^d , Z 43-I/97 ^d , Z 136/96 ^d , Z 3479/92 ^d , Z 2512/89 ^d , Z 2488/89 ^d , Z 2181/89 ^d , Z 2007/88 ^d , Z 1905/88 ^d , Z 1808/87 ^d , Z 1509/87 ^d , Z 1493/87 ^d , Z 326/84 ^d , Z 319/84 ^d , Z 75/83 ^d , Z 27/83 ^d , 623/83 ^d , 96 ^d , 53 ^d , Vi 1902 ^d , Vi 760 ^d , Vi 1921 ^d , Vi 1825 ^d , Vi 233 ^d , Vi 202 ^d , Vi 155 ^d , Vi 63 ^d , Vi 19 ^d , Vi 3 ^d , Z 201/01 ^d , Z 52/02 ^d , Z 78/02 ^d , Z 178/02 ^d , Z 213/02 ^d , Z 207-2/03 ^d , Z 164/04 ^d , Z 157/04 ^d
[2]	1	1	2	1	3	115	Fr Fr Fr Fr Fr Fr Gr Gr It It Namibia Tunisia Unknown Unknown De Gr	Vaccine Mutant Cattle Goat Sheep Sprinkbok Goat Sheep Goat Sheep Goat Goat Unknown Sheep Cattle Sheep	<u>1B</u> ^a <u>1H</u> ^a <u>AV1</u> ^a <u>AC1</u> ^a , <u>iC1</u> ^a <u>AB1</u> ^a , <u>AB2</u> ^a , <u>AB7</u> ^a , <u>AB8</u> ^a , <u>AB9</u> ^a , <u>AB11</u> ^a , <u>AB13</u> ^a , <u>AB15</u> ^a , <u>AB16</u> ^a , <u>AB22</u> ^a , <u>OC1</u> ^a , <u>Q18</u> ^a , <u>VB1</u> ^a <u>SB1</u> ^a <u>FAG</u> ^b , MB ^b , <u>VPG</u> ^b MA ^b , MD ^b , <u>ME</u> ^b 1107/1 ^e , 1107/2 ^e , 9/2 ^e , 27684 ^e , 36550 ^e , 60172 ^e 221176 ^e , 3053/1 ^e , 201/2 ^e , 39678 ^e , 38552 ^e C21/98 ^c , A-57 ^d , A-55 ^d 532 ^d , 363 ^d , 469 ^d , 15 ^d Z 947/85 ^d , Z 739/99 ^d , Z 631/99 ^d , Z 74/05 ^d , Z 81/05 ^d , Z 17/06 ^d , Z 22/06 ^d , Z 16/06 ^d C16/98 ^c 03DC36 ^c , Z 1215/86 ^d <u>71</u> ^b
[3]	1	2	2	1	3	8	Namibia USA Unknown	Goat Sheep Cattle	A-58 ^d <u>B577</u> ^a , <u>Mo907</u> ^a , <u>B577</u> ^d C13/98 ^c
[41]	1	2	3	1	3	1	UK De Gr	Cattle Sheep Sheep	<u>BAF</u> ^a <u>DC4</u> ^c <u>FAS</u> ^b
[5]	1	2	3	2	3	18	It UK UK	Goat Cattle Sheep	4PV ^e <u>BA/M</u> ^a , <u>BA1</u> ^a <u>H574</u> ^a , <u>1H77</u> ^a , <u>S26/3</u> ^a , <u>S26/3</u> ^f , <u>A22</u> ^a , A22 ^f , S93/3 ^f , S95/3 ^f , S152/3 ^f , S124/3A ^f , S82/3 ^f , SP9001 ^d , C20/98 ^c
[6]	2	1	1	1	2	2	Gr Gr	Sheep Goat	<u>POS</u> ^b <u>LLG</u> ^b

Laboratories providing *C. abortus* strains: ^aINRA, ^bHellenic Pasteur Institute, ^cFriedrich Loeffler Institute, ^dInstitute for Hygiene and Infectious Diseases of Animals, ^eIstituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", and ^fMoredun Research Institute. Country abbreviations: France (Fr), Germany (De), Greece (Gr), Italy (It), United Kingdom (UK), United States of America (USA).

Table 2

Direct MLVA typing on French clinical samples. Genotypes were based on similarity clustering of PCR product sizes; they are characterized by numbers 1 through 6, shown in square brackets.

Name	Species	Sample	MLVA genotype
08-1301/2	Sheep	Vaginal swab	[2]
08-1301/9	Cattle	Placenta	[2]
08-1301/11	Cattle	Placenta	[2]
08-1301/15	Cattle	Mucus	[2]
08-1301/18	Cattle	Placenta	[2]
07-1463/40752	Sheep	Placenta	[2]
07-1463/40753	Sheep	Placenta	[2]
07-525/J	Sheep	Vaginal swab	[1]
08-1250	Goat	Placenta	[2]

reaction buffer, 1 U of Hot Start Taq DNA polymerase (Qiagen), 200 μ M of each deoxynucleotide, and 0.3 μ M of each flanking primer. VNTR sites were selected based on the whole genome sequence of *C. abortus* S26/3 and primers were designed to amplify these sites (Table 3). The initial denaturation step at 95 °C for 15 min was followed by 40 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 30 s, primer annealing at 58 °C for 30 s depending on the

primers, and elongation at 72 °C for 45 s. The final extension step was at 72 °C for 10 min. Five microliters of amplification product were loaded onto a 4% Metaphor/standard (50–50) agarose gel. Gels stained with ethidium bromide were visualized under UV light, and photographed. The size marker used was a 100-bp ladder (Mbi, Euromedex, France).

2.4. Data analysis

Amplicon size was determined manually using the 100 bp size marker. The number of motifs in each allele was derived from the amplicon size. The resulting data were analyzed with Bionumerics software package version 4.6 (Applied-Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium) as a character dataset. Clustering analysis was done using the categorical parameter and the UPGMA coefficient.

2.5. Sequencing of PCR products

The five targeted genomic regions of *C. abortus* strains C9/98, AB7, B577, BAF, S26/3, and POS were amplified with primers ChlaAb_457, ChlaAb_581, ChlaAb_620,

Table 3

Primers for PCR amplification and MLVA. These primers were used to characterize tandem repeats in 34 genetic loci. Primers ChlaAb_457, ChlaAb_581, ChlaAb_620, ChlaAb_914 and ChlaAb_300 were selected for the MLVA. Theoretical repetition numbers and repeat units were detected by the program Tandem Repeat Finder after analysis of the *C. abortus* S26/3 genome.

Name	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	Repeat unit (bp)	<i>C. abortus</i> S26/3 theoretical repetition number	Whole amplified <i>C. abortus</i> S26/3 fragment size
ChlaAb_22	CCATACGCAAAATCCTGATATTACA	CGCCTGATTGCGGAT	21	2.3	171
ChlaAb_76	CTCGTCAGGCAGTAGCACAAATT	TCTGTGTGAAGTTCCAAAAGCATC	12	2.1	164
ChlaAb_105	CAGGAATCATCGAAGGCTTCA	AGAAGCACACAACGCAATCC	6	4.3	230
ChlaAb_109	TGTAAGCATCCAAAGTATACATTTATCGT	CCCGATAGAATGGCTTCATAG	8	3.1	226
ChlaAb_112	GGAGCCTCATGGAAACGTGA	GTAGCCATGATCTGCCCTTCA	7	3.4	276
ChlaAb_165	CGATTCTCTCGAGCTTTTCA	TTAGTGGCTATCAACCGGACG	7	3.1	226
ChlaAb_174	CGGAGACTACGCTTACGGCT	ACCGCAGAATCCGTAACGTT	7	3.4	226
ChlaAb_198	CTTTCTTTATCACACAGTTGTGCTATAC	CGTGCTTGATTCTCTATTAATAAACCC	6	4.8	230
ChlaAb_242	TACCATCGGATGCTGTAGGGA	CGATAATAAGCCTGCGACTCG	7	3.3	224
ChlaAb_256	ATATCGCTTGGCGCAAGTTTA	CCTAGGCGGAGACGACTTTG	11	3.2	338
ChlaAb_283	TTTGTCTGCGCTCATAGGC	TGGGAAGGATCTTCTCTTCA	9	3.3	231
ChlaAb_294	CGTACGTAGCCCCGAAAGAG	GCGATAACGCAACTCCGAA	6	4.0	277
ChlaAb_300	AGACCTAAAGGCCACCTTCA	ATGCGCCAATCTATACGCTGA	9	3.0	227
ChlaAb_304	GATTTATGGTTTGGGACGCAA	GGGTCTTCTCACACAGCCGTA	7	3.4	227
ChlaAb_312	GGATTCAACGCTTGAGTGCA	TGCCAAGGCTCCTCACTACAA	6	3.5	225
ChlaAb_318	CTAGTGGAGCCGTGAATCCA	TCACCTGCAAGACACGCAAG	8	3.0	325
ChlaAb_404	GTTTTGTCTTGTGGCCTGG	AAAGCGCTCTGTTAATAAACCTTCAT	6	4.2	230
ChlaAb_457	GTACAAAAAAGCTAGCAGCAAGAA	CACGTTGGCAAGAAGCTGTG	28	2.8	358
ChlaAb_488	CTATTTCAACAAGGCGTTACTTAGCG	AGGTATCTTCAGGGAACATCACG	15	2.0	179
ChlaAb_494	CCTCCCGTGCATCCTAAGC	AACCATGAGGATTCAGCCG	6	4.2	276
ChlaAb_509	CTTTGACTTGTGGTAGTGACAT	TTACAACAGCATATCTTCAGTCGCT	18	2.0	152
ChlaAb_533	CCGTCATGCCTAAATTGGAAA	TGCTTGCGCCTTAGCTTTAAA	6	3.3	275
ChlaAb_546	GGTAGTATTTTCACTACGCTTTCCAG	TTAGAATCAAACTATCAATCTGAAGTAACT	6	3.5	223
ChlaAb_575	GGAAATACCCATGTAGGACGTATACC	CAATCCGACTAATTGGTCTCAATT	9	3.1	231
ChlaAb_581	ACAGCACCAGCATTAGCCG	TGGATAGTTGCTGCTGGTGG	15	2.1	161
ChlaAb_620	ATGCTATAATTGCTTAGTTTTTTAATCTG	CACATGCCGCCCTGAAC	11	3.6	163
ChlaAb_656	TAGGACTCATGCAGCCCAATC	TTTTTGGCCTCCACTCAGCT	6	3.5	233
ChlaAb_805	AATGTTTGTGAGCAAGCCC	TCCCCTGCAACCTCATGAAT	7	3.0	272
ChlaAb_839	GATTGTCTCCCCACGTTT	ATTGCGTTTGGGAGCAGG	7	3.6	227
ChlaAb_873	TCCGGCATGACGCTACAC	AAGGCACATGATCCCAAAAA	8	3.8	281
ChlaAb_914	TTTAAAGTTTCCGTATCTTTGTAATCGAT	TTTGAAGTTCCGATCATTACCAGAA	15	2.3	174
ChlaAb_924	CCCAGGAGAGAATTGGCAA	GCAATGCCACCCCTTATCAA	6	4.2	177
ChlaAb_940	TGGAGAGCTATGCCAATGCTT	GCGAGCCGTTTTCAATACTG	6	4.2	230
ChlaAb_1077	GTGGTTTCCATTGTTGCGG	GCAGTTTTATGGCTGTCATCAC	33	1.9	191

Primers in bold were retained for the MLVA study.

ChlaAb_914 and ChlaAb_300 and the PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). DNA sequencing of these PCR products was done at MWG (Biotech France, Roissy, France). Sequences have been deposited in GenBank database. Accession numbers listed in Fig. 2.

3. Results

3.1. Selection of VNTRs for MLVA analysis from an initial set of 34 *C. abortus* strains

Thirty-four tandem repeats with a repeat unit equal to or larger than 6 bp were identified by the program Tandem Repeat Finder in the whole genome sequence of *C. abortus* strain S26/3 (Table 3). In order to evaluate the polymorphism within these potential VNTR markers, primers were chosen on both sides of the repeats and PCRs were performed on an initial set of 34 *C. abortus* strains (Table 1).

Gel analysis of the size of the amplified fragments showed that only five of the tandem repeat loci, namely ChlaAb_457, ChlaAb_581, ChlaAb_620, ChlaAb_914 and ChlaAb_300 were polymorphic for these 34 strains (Fig. 1 and data not shown). Furthermore, it was possible to cluster the 34 *C. abortus* strains into five distinct genotypes based on the size of the amplified PCR products, highlighting thus the suitability of the selected five tandem repeat loci for establishing and developing a genotyping system for *C. abortus* (Fig. 1 and Table 1). The repeat units were localized in CAB267, the coding sequence of the

polymorphic outer membrane protein pmp5E, in CAB398 coding for a histone-like protein, in CAB502 coding for a putative exported protein with a lysine decarboxylase motif, in CAB541 coding for a conserved membrane protein (pseudogene), and in CAB786 coding for the 30S ribosomal protein S18 for markers ChlaAb_300, ChlaAb_457, ChlaAb_581, ChlaAb_620, and ChlaAb_914, respectively.

3.2. Evaluation of the selected VNTRs for MLVA analysis

The stability of the five selected tandem repeat markers was assessed by analysis of three *C. abortus* strains (A22, S26/3 and B577) stored in different laboratories (INRA, Moredun Research Institute, and/or Hellenic Pasteur Institute) and by analysis of different passages of the AB7 strains (2 and 7 passages). The results indicated that the analysis was independent from the performing laboratory and from the passage history of the strains under examination (data not shown). To assess the reproducibility of the MLVA analysis, three *C. abortus* strains (AB7, S26/3 and POS) were genotyped in parallel in two different laboratories, in AFSSA (Maisons-Alfort) and in INRA (Nouzilly). The results were identical in both places.

3.3. MLVA genotyping of *C. abortus* isolates

The set of the selected five markers was used to examine a panel of 111 additional *C. abortus* isolates from different ruminant hosts and from different geographical

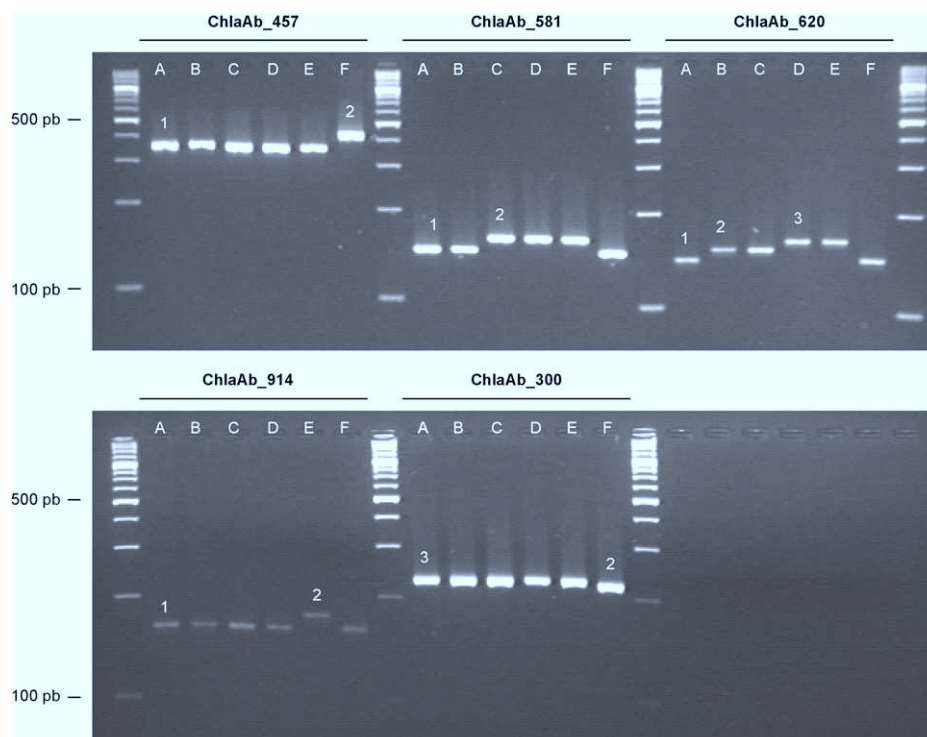


Fig. 1. VNTR amplicon sizes. PCR amplification of *C. abortus* strains C9/98 (A), AB7 (B), B577 (C), BAF (D), S26/3 (E) and POS (F) with ChlaAb_457, ChlaAb_581, ChlaAb_620, ChlaAb_914 and ChlaAb_300 (see Table 1). A 100-bp ladder (100–1000 bp) is run on both sides of each group of samples. The number of repeat units within each allele is indicated.

of the UK strains was represented among genotypes [2] and [3], and no French strain was represented among genotypes [3] and [5]. No correlation could be found with the animal species involved or with the infection status of the animals.

3.4. Direct typing of clinical samples

A panel of nine French clinical samples that were tested positive using the *C. abortus*-specific real-time PCR were genotyped using the five selected markers ChlaAb_457, ChlaAb_581, ChlaAb_620, ChlaAb_914 and ChlaAb_300. All samples amplified very efficiently and were found to belong to the genotype [2], except sample 07-525/1, which

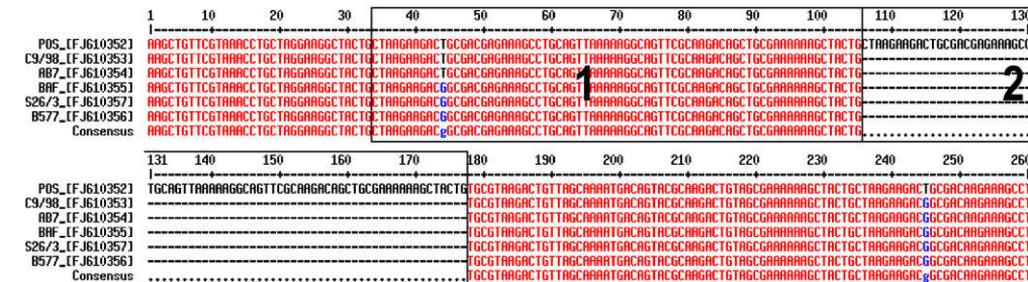
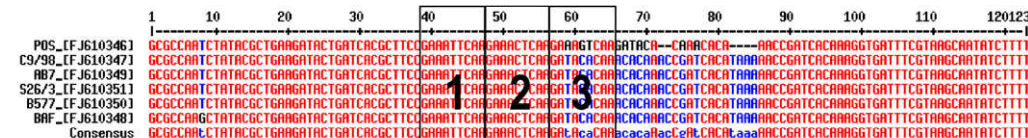
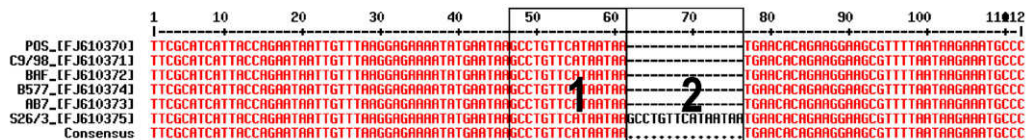
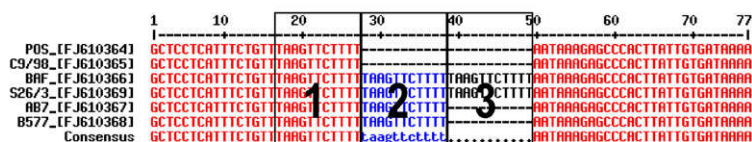
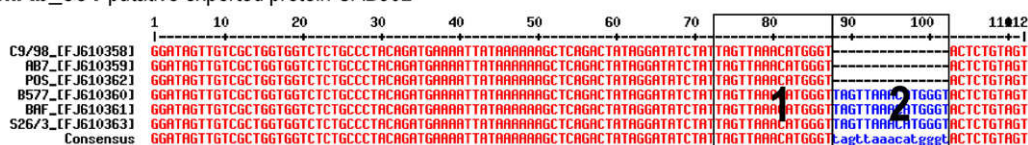


Fig. 2. VNTR localizations. Aligned sequences of the 5 targeted genomic regions of *C. abortus* strains C9/98, AB7, B577, BAF, S26/3, and POS amplified with markers ChlaAb_457, ChlaAb_581, ChlaAb_620, ChlaAb_914 and ChlaAb_300. Single, duplicate or triplicate repeat copies are boxed and marked “1”, “2” or “3”, respectively. Accession number of each sequence is indicated close to the corresponding strain name, shown in square brackets.

belonged to genotype [1] (Table 2). This result highlighted the suitability of the novel MLVA for direct typing of clinical samples without previous propagation of the bacteria.

3.5. Sequence analysis of PCR products

Genomic sequences were generated for each PCR product amplified with the five selected markers for the six strains C9/98, AB7, B577, BAF, S26/3 and POS, representing the six genotypes. With the exception of ChlaAb_300, where the polymorphism is due to deletion in the targeted sequence for POS, the repeat unit was localized similarly in all other sequences and its presence or absence in the sequence resulted into the experimental polymorphism (Fig. 2). The observed repeat size was a multiple of three nucleotides for all VNTRs contributing thus to the coding sequence of the loci. An exception to this was ChlaAb_620 (pseudogene CAB541). Consequently, the polymorphism in this locus was due to a stop in translation in one allele (2 copies of a 11-bp repeat) and to a frameshift in another allele (3 copies), as compared to the allele with a single copy of the repeat. In CAB502 (ChlaAb_581) the 15-mer TAGTTAAACATGGGT coding for peptide LVKHQ, was repeated in strains B577, BAF and S26/3 but not in strains

C9/98, AB7 and POS, whereas in CAB786 (ChlaAb_914) the 15-mer GCCTGTTTCATAATAA coding for peptide KPVHN was repeated only in strain S26/3. In the histone-like protein *hctB* (CAB398, ChlaAb_457) the 24-mer peptide AKKTATRKPAVKKAVRKTAACKAT was repeated once in strain POS.

Summarized, the results showed that the MLVA typing method developed on the analysis of 5 VNTR loci was capable of clustering 145 *C. abortus* strains in six genotypes and that variation among genotypes was caused in three loci by the presence or absence of coding tandem repeats.

3.6. Evaluation of MLVA typing for discerning between *C. psittaci* and *C. abortus*

Since *C. psittaci* and *C. abortus* are genetically closely related species it was important to assess the capability of the developed MLVA to distinguish between the two species. To this end six *C. psittaci* reference strains corresponding to the six avian serotypes, namely strains Loth, CP3, GR9, NJ1, Cal10 and VS225 were amplified with the five *C. abortus* VNTR primer sets ChlaAb_300, ChlaAb_457, ChlaAb_581, ChlaAb_620, and ChlaAb_914 (Fig. 3). No amplification product was observed with primers ChlaAb_581, ChlaAb_620, and ChlaAb_914 for any

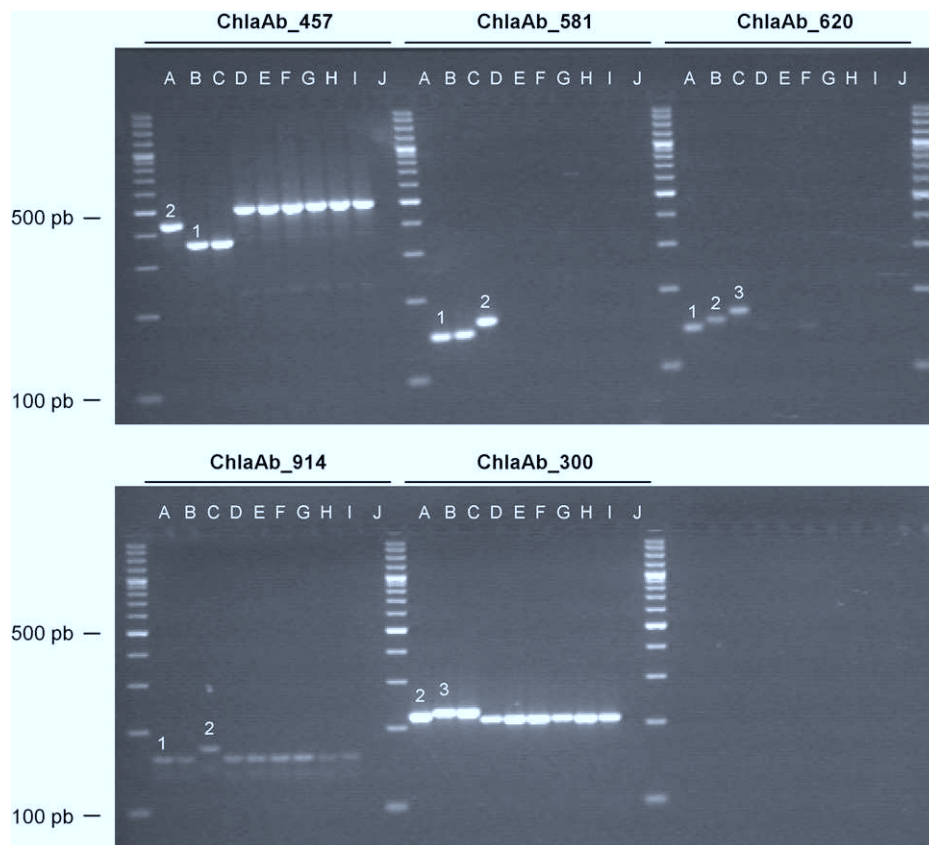


Fig. 3. *C. abortus* MLVA scheme on *C. psittaci* DNA. PCR amplification of the five VNTRs ChlaAb_457, ChlaAb_581, ChlaAb_620, ChlaAb_914 and ChlaAb_300 using DNA from three *C. abortus* strains POS (A), AB7 (B) and S26/3 (C) and from the six *C. psittaci* reference strains Loth (D), CP3 (E), GR9 (F), NJ1 (G), Cal10 (H) and VS225 (I). Negative control is in well J. A 100-bp ladder (100–1000 bp) is run on both sides of each group of samples. The number of repeat units within each allele is indicated.

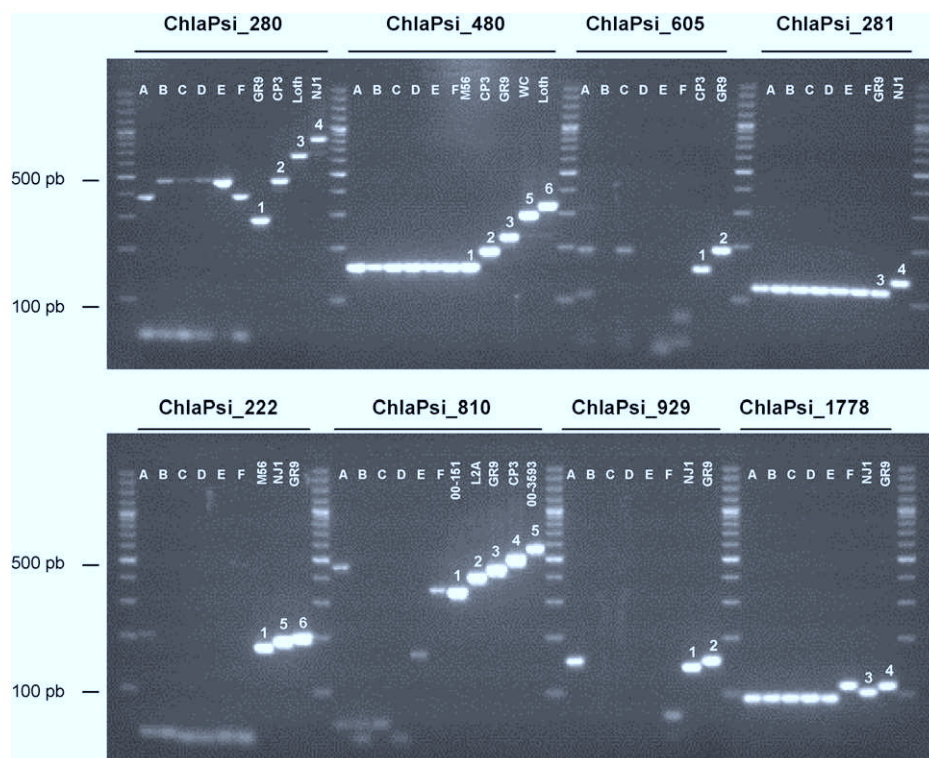


Fig. 4. *C. psittaci* MLVA scheme on *C. abortus*. DNA. PCR amplification of the 8 VNTRs ChlaPsi_280, ChlaPsi_480, ChlaPsi_605, ChlaPsi_810, ChlaPsi_222, ChlaPsi_281, ChlaPsi_929 and ChlaPsi_1778 using DNA from 6 *C. abortus* prototypes C9/98 (A), AB7 (B), B577 (C), BAF (D), S26/3 (E), POS (F) and from selected *C. psittaci* strains for comparison. The strains selected for each primer was according to previous patterns and their names are inserted in the figure (Laroucau et al., 2008). The number of repeat units within each allele is indicated. A 100-bp ladder (100–1000 bp) is run on both sides of each group of samples.

avian strain, while the size of the amplified fragments with primer ChlaAb_457 (histone-like protein CAB 398) was distinct for the avian strains. The amplification product with primer ChlaAb_300 (CAB267, pmp5E) was similar to the PCR product of the variant *C. abortus* strain POS.

Of equal importance was to evaluate the performance of a recently developed MLVA system for genotyping *C. psittaci* strains that was based on eight selected VNTR loci identified in the genomic sequence of strain 6BC (Laroucau et al., 2008). To this end the six *C. abortus* prototypes C9/98, AB7, B577, BAF, S26/3 and POS were amplified using the eight *C. psittaci* primer sets ChlaPsi_280, ChlaPsi_480, ChlaPsi_605, ChlaPsi_810, ChlaPsi_222, ChlaPsi_281, ChlaPsi_929 and ChlaPsi_1778. Amplification patterns for all six *C. abortus* prototypes were obtained with only three of the eight avian primer sets, ChlaPsi_480, ChlaPsi_281 and ChlaPsi_1778, while strains C9/98, S26/3 and POS were also amplified with ChlaPsi_280. Amplifications with the other four primers ChlaPsi_605, ChlaPsi_222, ChlaPsi_810 and ChlaPsi_929 were of low efficiency and were not consistently observed (Fig. 4). The PCR products with primers ChlaPsi_480 and ChlaPsi_281 corresponded to 1 and 3 repeat units, respectively. The amplified products of strains POS and LLG with marker ChlaPsi_1778 corresponded to 4 repeat units whereas the size of the PCR products in all other *C. abortus* strains was unique, never encountered before in *C. psittaci* (Fig. 4).

Taken together, the results showed that, though few VNTR primers produced amplification products with the heterologous species, amplification with the total number of VNTR primer sets was restricted to members of the homologous species, indicating that the developed MLVA typing systems were species-specific.

4. Discussion

Epidemiological studies of *C. abortus* isolates have been hampered by the requirement of culturing this fastidious obligate intracellular bacterium. Here, we present a new MLVA-based molecular typing system for the discrimination of *C. abortus* isolates that does not require culture and can therefore be performed directly on DNA extracted from field/clinical specimens. MLVA typing is a reproducible method which can be standardized and performed at low cost, thus facilitating large-scale molecular epidemiological investigations. Out of 34 tandem repeat loci identified in the *C. abortus* S26/3 genome by the program Tandem Repeat Finder, five were polymorphic in a preliminary PCR screen, thus confirming the high genetic homogeneity of this chlamydial species. By comparison, eight VNTRs were found in *C. psittaci* using just 20 primer pairs (Laroucau et al., 2008). The final analysis of about 145 *C. abortus* strains and field isolates resulted in a total of six distinct patterns designated genotype [1] through [6]. Strains belonging to genotype [1] through [5] were more closely

related to each other than to the two Greek variant strains LLG and POS, constituting genotype [6]. These findings were in accordance with previous studies demonstrating significant differences of the two strains (Vretou et al., 1996). Interestingly, the commercial vaccine strain 1B was classified as genotype [2]. In this sense MLVA could provide the means to differentiate between vaccinated and naturally infected animals if local strains were of a different genotype.

Three of the VNTR markers identified in the present study were located within genes or ORFs encoding predicted membrane or exported proteins (markers ChlaAb_300, ChlaAb_581 and ChlaAb_620 (pseudogene)). A further marker was located in *hctB*, a histone-like protein gene involved in establishing the nucleoid structure of chlamydial elementary bodies (CAB398, marker ChlaAb_457). In *C. trachomatis*, Hc1 is conserved among serovars while Hc2 (encoded by *hctB*) varies in size between strains due to internal deletions encoding lysine- and alanine-rich pentameric repeats (Hackstadt et al., 1993). Indeed, different numbers of repetitive elements and point mutations were recently detected in *hctB* in genital clinical samples, leading to high-resolution intra-serotype variation in *C. trachomatis* (Klint et al., 2008). Furthermore, polymorphic sites including *hctB* were responsible for the pathogenic diversity of *C. trachomatis* trachoma strains (Kari et al., 2008). In the present study, the *hctB* differed in the Greek strains LLG and POS bearing an 72 nucleotide repeat encoding a 24-mer peptide. Previous studies had shown that the polypeptide profiles of strains LLG and POS were characterized by the presence of a band at 26.5 kDa that was absent from the other *C. abortus* strains, and by the absence of a polypeptide at 22–23 kDa present in the other strains. It had been suggested by the same authors that these peptides could represent histone-like proteins that could eventually prove useful epidemiological tools for the identification of LLG-like strains (Vretou et al., 1996).

A series of previous studies based either on the reactivity with monoclonal antibodies (Salinas et al., 1995) or on ribosomal and *ompA* sequences have highlighted the remarkable homogeneity within the species *C. abortus* (Denamur et al., 1991; Everett et al., 1999). However, when AFLP, a technique based on whole-genome analysis not requiring knowledge of the genomic sequence, was applied to *C. abortus* strains, it was possible to accomplish differentiation within this species and identify a cluster of strains comprising French chlamydial isolates (Boumedine and Rodolakis, 1998). All strains studied by AFLP ($n = 12$) were included in the present study, except strain PS22. Clustering by MLVA was similar to that by AFLP (Boumedine and Rodolakis, 1998). However, the French strains, AC1 and AV1 could be distinguished by AFLP, but not by MLVA. MLVA is based on the detection of polymorphic repeat units, whereas AFLP identifies point mutations dispersed throughout the genome. Both techniques seem to be complementary as already observed for the genotyping of *C. psittaci* (Laroucau et al., 2008). Interestingly, MLVA classified UK strains only in genotypes [4] and [5] and French strains in genotype [2]. Only one French clinical sample was classified in genotype [1].

Apart from genotype [6], the number of tandem repeats was higher in genotype [5] than in all other genotypes. Genotype [5] includes the sequenced S26/3 strain (Thomson et al., 2005) from which the present MLVA marker panel has been deduced. Availability of genome sequences from other MLVA groups, e.g. AB7 or C9/98, will most probably give access to an additional number of tandem repeats and thus will increase the discriminatory power of MLVA. Variability observed in short repeated motifs, i.e., up to 9 bp, is thought to be caused by slipped-strand mispairing, which may occur in combination with inadequate mismatch repair pathways (Bichara et al., 2006). However, there are many indications of the way in which larger sequences are duplicated.

The present study complements and expands the recent report on the development and application of MLVA for typing strains of the species *C. psittaci* (Laroucau et al., 2008). Both MLVA studies do not only provide means to type strains or field isolates within the species, but also provide markers that discern between the two genetically related species, as presented in Figs. 3 and 4. This is of particular importance since *C. abortus* has also been detected in bird infections (see Pantchev et al., 2008). However, it is highly recommended to determine the chlamydial species before performing MLVA genotyping as suggested by the same authors.

In summary, our findings show that MLVA is a new typing method providing enhanced discrimination of *C. abortus* isolates from various hosts and geographical origins. The biological significance of the coding tandem repeats identified in the putative lysine decarboxylase (CAB502), in the 30S ribosomal protein S18 (CAB786), in pmp5E (CAB267) and in the *hctB* gene (CAB398) is unknown. Coding tandem repeats are believed to enhance specific properties of bacterial virulence factors. It is anticipated that application of MLVA to a large number of pathological isolates will not only prove useful to future veterinary surveys but will also might help establishing a possible association of these markers of diversity with pathogenic traits.

Conflicts of interest

None of the authors has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias this paper.

Acknowledgments

This work was supported by AIP 297 AFSSA/INRA grant. The study was an integral part of the European COST Action 855 “Animal chlamydioses and the zoonotic implications”.

References

- Aitken, I.D., Longbottom, D., 2007. Chlamydial abortion. In: Aitken, I.D. (Ed.), Diseases of Sheep. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 105–112.
- Benson, G., 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Res. 27, 573–580.
- Bichara, M., Wagner, J., Lambert, I.B., 2006. Mechanisms of tandem repeat instability in bacteria. Mutat. Res. 598, 144–163.

- Boumedine, K.S., Rodolakis, A., 1998. AFLP allows the identification of genomic markers of ruminant *Chlamydia psittaci* strains useful for typing and epidemiological studies. *Res. Microbiol.* 149 (10), 735–744.
- Buxton, D., 1986. Potential danger to pregnant women of *Chlamydia psittaci* from sheep. *Vet. Rec.* 118 (18), 510–511.
- Denamur, E., Sayada, C., Souriau, A., Orfila, J., Rodolakis, A., Elion, J., 1991. Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*. *J. Genet. Microbiol.* 137 (11), 2525–2530.
- Everett, K.D., Bush, R.M., Andersen, A.A., 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (Pt 2), 415–440.
- Hackstadt, T., Brickman, T.J., Barry III, C.E., Sager, J., 1993. Diversity in the *Chlamydia trachomatis* histone homologue Hc2. *Gene* 132, 137–141.
- Kari, L., Whitmire, W.M., Carlson, J.H., Crane, D.D., Reveneau, N., Nelson, D.E., Mabey, D.C., Bailey, R.L., Holland, M.J., McClarty, G., Caldwell, H.D., 2008. Pathogenic diversity among *Chlamydia trachomatis* ocular strains in nonhuman primates is affected by subtle genomic variations. *J. Infect. Dis.* 197 (3), 449–456.
- Klint, M., Nilsson, A., Birkelund, S., Herrmann, B., 2008. A mosaic structure of the hctB gene in *Chlamydia trachomatis* strains suggests regulation of DNA condensation. In: *Proceeding of the Sixth Meeting of the European Society for Chlamydia Research*. p. 63.
- Laroucau, K., Thierry, S., Vorimore, F., Blanco, K., Kaleta, E., Hoop, R., Magnino, S., Vanrompay, D., Sachse, K., Myers, G.S., Bavoil, P.M., Vergnaud, G., Pourcel, C., 2008. High resolution typing of *Chlamydomphila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). *Infect. Genet. Evol.* 8 (2), 171–181.
- Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., Sachse, K., 2008. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydomphila psittaci* and *Chlamydomphila abortus* from tissue samples. *Vet. J.*, doi:10.1016/j.tvjl.2008.02.025.
- Pospischil, A., Thoma, R., Hilbe, M., Grest, P., Zimmermann, D., Gebbers, J.O., 2002. Abortion in humans caused by *Chlamydomphila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 144, 463–466.
- Salinas, J., Souriau, A., Cuello, F., Rodolakis, A., 1995. Antigenic diversity of ruminant *Chlamydia psittaci* strains demonstrated by the indirect microimmunofluorescence test with monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 43 (2–3), 219–226.
- Salti-Montesanto, V., Tsoli, E., Papavassiliou, P., Psarrou, E., Markey, B.K., Jones, G.E., Vretou, E., 1997. Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. *Am. J. Vet. Res.* 58, 228–235.
- Siarkou, V., Lambropoulos, A.F., Chrisafi, S., Kotsis, A., Papadopoulos, O., 2002 Mar 1. Subspecies variation in Greek strains of *Chlamydomphila abortus*. *Vet. Microbiol.* 85 (2), 145–157.
- Souriau, A., Le Rouzic, E., Bernard, F., Rodolakis, A., 1993. Differentiation of abortion-inducing and intestinal strains of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants by the microimmunofluorescence test. *Vet. Rec.* 132 (9), 217–219.
- Thomson, N.R., Yeats, C., Bell, K., Holden, M.T., Bentley, S.D., Livingstone, M., Cerdeño-Tarraga, A.M., Harris, B., Doggett, J., Ormond, D., Mungall, K., Clarke, K., Feltwell, T., Hance, Z., Sanders, M., Quail, M.A., Price, C., Barrell, B.G., Parkhill, J., Longbottom, D., 2005. The *Chlamydomphila abortus* genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation. *Genome Res.* 15 (5), 629–640.
- Vergnaud, G., Pourcel, C., 2006. Multiple Locus VNTR (Variable Number Tandem Repeat) Analysis. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Vretou, E., Loutrari, H., Mariani, L., Costelidou, K., Eliades, P., Conidou, G., Karamanou, S., Mangana, O., Siarkou, V., Papadopoulos, O., 1996. Diversity among abortion strains of *Chlamydia psittaci* demonstrated by inclusion morphology, polypeptide profiles and monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 51 (3–4), 275–289.
- Vretou, E., Psarrou, E., Kaisar, M., Vlisidou, I., Salti-Montesanto, V., Longbottom, D., 2001. Identification of protective epitopes by sequencing of the major outer membrane protein gene of a variant strain of *Chlamydia psittaci* serotype 1 (*Chlamydomphila abortus*). *Infect. Immun.* 69, 607–612.
- Walder, G., Hotzel, H., Brezinka, C., Gritsch, W., Tauber, R., Wurzner, R., Ploner, F., 2005. An unusual cause of sepsis during pregnancy: recognizing infection with *Chlamydomphila abortus*. *Obstet. Gynecol.* 106, 1215–1217.

Communications scientifiques

Publication

Yousef Mohamad K., Rekiki A., Myers G., Bavoil P.M., Rodolakis A. Identification and characterisation of coding tandem repeat variants in *incA* gene of *Chlamydophila pecorum*. *Veterinary Research*, 2008; 39: 56.

Yousef Mohamad K., Roche S.M., Myers G., Bavoil P.M., Laroucau K., Magnino S., Laurent S., Rasschaert D., Rodolakis A. Preliminary phylogenetic identification of virulent *Chlamydophila pecorum* strains. *Infection, Genetics and Evolution*, 2008; 8: 764-771.

Yousef Mohamad K., Kaltenboeck B., Magnino S., Sachse K., Rodolakis A. *ompA*, *incA* and ORF663 genes can be used as epidemiological markers of *Chlamydophila pecorum* to assess strain pathogenicity. *Infection, Genetics and Evolution*, (submitted, July 2009).

Rodolakis A., **Yousef Mohamad K.** Zoonotic potential of *Chlamydophila*. *Veterinary Microbiology*, 2009.

Laroucau K., Vorimore F., Bertin C., **Yousef Mohamad K.**, Thierry S., Hermann W., Maingourd C., Pourcel C., Longbottom D., Magnino S., Sachse K., Vretou E., Rodolakis A. Genotyping of *Chlamydophila abortus* strains by multilocus VNTR analysis. *Veterinary Microbiology*, 2009; 137(3-4):335-44.

Communications

Yousef Mohamad K., Rekiki A., Berri M., Rodolakis A. The recombinant 35-kDa inclusion membrane protein IncA could be considered as a suitable candidate *Chlamydophila pecorum* serodiagnostic antigen. First European Meeting on Animal Chlamydioses and Zoonotic Aspect. Murcia (**Espagne**), 14- 16 juin 2009, Communication orale.

Yousef Mohamad K., Rekiki A., Myers G.S.A., Bavoil P.M., Rodolakis A. Identification and characterisation a Coding Tandem repeats in the IncA gene of the *Chlamydia pecorum* genome. 5th Workshop of COST Action 855: Pathogenesis, Epidemiology and Zoonotic Importance of animal chlamydioses. Pulawy (**Pologne**), 10-11 septembre 2007, Poster.

Yousef Mohamad K., Rekiki A., Rodolakis A. Identification d'une séquence répétée codante dans le gène IncA du génome de *Chlamydophila pecorum*. *Maladies infectieuses, retour sur le Futur. Journées d'animation scientifique du Département de Santé Animale. Tours (France)*, 25 au 27 juin 2007, Communication orale.

Yousef Mohamad K., Roche S., Bavoil P.M., Myers G., Rodolakis A. Preliminary phylogenetic identification of virulent *Chlamydophila pecorum* strains. Sixth meeting of the European Society for Chlamydia Research. Aarhus (**Danemark**), 1-4 juillet 2008, 2008: Poster.

Yousef Mohamad K., Roche S.M., Myers G., Bavoil P.M., Laroucau K., Magnino S., Laurent S., Rasschaert D., Rodolakis A. Preliminary phylogenetic identification of virulent *Chlamydophila pecorum* strains. Workshop on PCR-based detection and typing of *C. burnetii*. Sophia Antipolis (**France**), 23-24 June, 2008, AFSSA 2008, Communication orale.



Diversité génétique des souches de *Chlamydophila pecorum*: Recherche et identification des marqueurs épidémiologiques

Résumé

Chlamydophila pecorum est une espèce bactérienne intracellulaire obligatoire de la famille *Chlamydiaceae*. Le criblage d'une banque génomique de *C. pecorum* en utilisant un sérum ovine spécifique a permis d'identifier la protéine de la membrane d'inclusion (IncA) comme un candidat potentiel pour le sérodiagnostic de *C. pecorum* et de mettre en évidence une séquence répétée codante (CTR) riche en alanine et proline dans le gène *incA* de *C. pecorum*. Cette CTR présente des motifs d'acides aminés différents suivant la pathogénicité des souches de *C. pecorum*. La variabilité génétique de 19 souches de *C. pecorum* isolées de ruminant a été étudiée par MVLST (multi-virulence sequence typing). Les gènes *ompA* qui code pour la protéine majeure de la membrane externe, *incA* et l'ORF663 (cadre ouvert de lecture) permettent de différencier les souches pathogènes de *C. pecorum* des souches non-pathogènes. Cette hypothèse a été confirmée sur 32 autres souches comprenant 11 souches isolées de porcs. Les souches de *C. pecorum* isolées de lésions sont génétiquement différentes des souches isolées d'animaux asymptomatiques. Les 3 gènes *ompA*, *incA* et l'ORF663 sont des marqueurs moléculaire épidémiologiques potentiels qui pourraient être liés à la virulence de *C. pecorum*.

Mot-clés : *Chlamydophila pecorum*, diagnostic, marqueur moléculaire, pathogénicité, MVLST, *incA*, *ompA*, ORF663, séquence répétée codante

Abstract

Chlamydophila pecorum, an obligate intracellular bacterium belonged to *Chlamydiaceae* family. Screening of a genomic DNA library of *C. pecorum* by using a specific ovine serum, allowed to identify inclusion membrane protein (IncA) as a potential candidate for *C. pecorum* serodiagnosis and to highlight a coding tandem repeat (CTR) rich in alanine and proline in the *C. pecorum incA* gene. The CTR presents several amino acids motifs according to the pathogenesis of *C. pecorum* strains. The genetic variability of 19 *C. pecorum* strains isolated from ruminants was studied using MVLST (multi-virulence sequence typing) system. The genes *ompA* that code for the major outer membrane protein, *incA* and ORF663 (open reading frame) allowed to distinguish the pathogenic *C. pecorum* strains from non-pathogenic strains. This hypothesis was confirmed on additional 32 strains including 11 strains isolated from swine. The *C. pecorum* strains isolated from clinical cases are genetically different from strains isolated from healthy animals. *ompA*, *incA* and ORF663 genes are epidemiological molecular markers which could be related to the virulence of *C. pecorum*.

Keywords: *Chlamydophila pecorum*, diagnosis, molecular marker, pathogenesis, MVLST, *incA*, *ompA*, ORF663, coding tandem repeats