

Mise au point d'une technique dite de "nested PCR" (PCR nichée) pour la détection de *Clostridium piliforme*, agent de la maladie de Tyzzer

A. NIEPCERON, D. LICOIS

INRA, UR 1282, IASP-Bât 213, 37380 Nouzilly, France

Résumé. Face aux limites des méthodes de diagnostic pour détecter *Clostridium piliforme*, agent de la maladie de Tyzzer, une nouvelle technique dite de "nested PCR" (PCR nichée) a été développée. La spécificité de cette technique vis-à-vis de *Clostridium piliforme* a été vérifiée par rapport aux souches bactériennes les plus proches phylogénétiquement (sur la base des homologies de séquences de l'ARNr 16S). La sensibilité de cette technique à partir de prélèvements cliniques a été démontrée.

Abstract. Development of a Nested PCR technique for the detection of *Clostridium piliforme*, Tyzzer's disease agent. In front of limits of diagnosis methods to detect *Clostridium piliforme*, Tyzzer's disease agent, a novel technique of nested PCR was developed. The specificity of this technique for *Clostridium piliforme* was checked with regard to the most phylogenetically close bacterial strains (on basis of 16S RNA sequence analogies). The sensibility of this technique from clinical samples was demonstrated.

Introduction

Clostridium piliforme est une bactérie filamenteuse intracellulaire Gram négatif, susceptible de sporuler, responsable de la maladie de Tyzzer. Initialement décrite en 1917 par Tyzzer chez une souris de laboratoire sous le nom de *Bacillus piliformis* (Tyzzer, 1917), elle a été reclassée dans le genre *Clostridium* sur la base des analogies de séquences des ARNr 16S (Duncan *et al.*, 1993). Cette maladie a été décrite dans de nombreuses espèces animales : rat, hamster, cobaye, gerbille, lapin, lièvre, rat musqué, chien, coyote, renard gris, serval, chat, cheval (poulain), veau, perruche, singe rhésus. Chez le lapin elle est plutôt décrite comme une maladie de l'animal de laboratoire (Licois, 1986 a).

Cette pathologie a été identifiée en France (Licois, 1986 b) mais elle a rarement été décrite au niveau des élevages industriels européens (Peeters, 1985 ; Le Normand *et al.*, 2005).

Le diagnostic de la maladie de Tyzzer est en effet difficile à établir. Les lésions les plus typiques sont des lésions d'entérites nécrotiques de l'iléon et du caecum marqué par un oedème important et des lésions de nécroses miliaires hépatiques mais le foie peut se révéler alésionnel chez le lapin (Licois, 1986a, b). Il n'existe pas à ce jour de milieu artificiel pour cultiver *Clostridium piliforme* et le diagnostic bactériologique se fonde essentiellement sur l'histologie. Les coupes réalisées à la périphérie des foyers de nécrose et colorées par imprégnation argentique (Coloration de Warthin-Starry) doivent permettre de visualiser les bactéries mais l'histologie peut se révéler insuffisante (Le Normand *et al.*, 2005). Des tests immuno-enzymatiques permettent de révéler théoriquement des anticorps spécifiques, signifiant que les animaux sont ou ont été infectés mais ces tests n'excluent pas des réactions croisées avec des anticorps d'autres *Clostridium* très proches phylogénétiquement.

Plus récemment, une technique de PCR (Polymerase Chain Reaction), amplifiant une séquence de l'ADN codant pour l'ARNr 16S (Goto et Itoh, 1994) a été utilisée pour révéler cette bactérie directement à partir de fécès d'animaux suspects (Furukawa *et al.*, 2002). Mais là aussi les limites de détection de cette technique ont été démontrées (Le Normand *et al.*, 2005). Dans ce contexte nous avons décidé d'améliorer le diagnostic par PCR avec pour objectif d'augmenter le seuil de détection ainsi que la spécificité vis-à-vis de *Clostridium piliforme*.

1. Matériels et Méthodes

1.1. Souches bactériennes

Les souches de *Clostridium clostridioforme* (DSM 933), *Clostridium coccoïdes* (DSM 935), *Clostridium colinum* (DSM 6011), *Clostridium neopropionicum* (DSM 3847), *Clostridium oroticum* (DSM 1287), *Clostridium propionicum* (DSM 1682), *Clostridium symbiosum* (DSM 934) et *Ruminococcus hansenii* (DSM 20583) (aussi identifiée comme *Streptococcus hansenii*) ont été obtenues auprès du centre allemand de ressources biologiques, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Braunschweig. Les souches de *Clostridium perfringens* (CIP 106677) et *Clostridium sordellii* (CIP 60.18) ont été obtenues auprès de l'Institut Pasteur, Paris ; celle de *Clostridium spiroforme* a été fournie par Samuel Boucher (Labovet, France) et la souche ASF 356 (ASF pour Altered Schaedler Flora (Floyd *et al.*, 1999)) a gracieusement été fournie par Nancy Taylor du Massachusetts Institute of Technology, (Cambridge, USA).

Toutes les souches ont été cultivées en anaérobiose, en tube de Hungate, selon la technique décrite par Padhila *et al.*, (1995) et selon les conditions définies par le centre DSMZ. La pureté de chaque souche a été contrôlée par examen microscopique après coloration de Gram.

1.2. Obtention de l'ADN à partir des souches bactériennes

Pour chaque souche, un volume de 3 ml de bouillon de culture est centrifugé 5 minutes à 13000 x g. Le culot est repris dans 1 ml de tampon de lyse (10mM Tris HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 2% Triton X-100), chauffé 10 minutes à 98°C puis centrifugé 1 minute à 12 000 x g. Le surnageant est directement utilisé en PCR.

1.3. ADN de référence

Trois échantillons d'ADN de *Clostridium piliforme* ont servi de contrôles positifs lors des PCR. Il ont gracieusement été fournis par A. Takakura (Central Institute of Experimental Animals, Kawasaki, Japon), T Furukawa (Research facilities for laboratory Animal Science, Hiroshima, Japon) et LK Riley (Missouri University, Columbia, USA)

1.4. Échantillons cliniques

Des échantillons de foie fournis par B. Le Normand (notés F2 et F3) et de caecum (C2 et C3) ont été prélevés sur deux lapins d'élevage. Ces lapins présentaient des lésions macroscopiques fortement évocatrices d'une infection par *Clostridium piliforme* (Le Normand *et al.*, 2005).

Deux autres prélèvements de caecum (C9 et C10) ont été réalisés sur deux lapins atteints de diarrhée, provenant d'un autre élevage. Des cultures bactériennes ont révélé l'absence de *Escherichia coli* appartenant aux sérogroupes entéropathogènes du lapin pour les 2 échantillons mais *Clostridium spiroforme* a été détecté pour un échantillon (C10).

1.5. Extraction d'ADN à partir des échantillons cliniques

L'ADN est extrait en utilisant le kit QIAamp DNA stool (QIAGEN, France) et selon le protocole décrit pour des échantillons de selles pour le dépistage d'agents pathogènes. Le produit d'élution est directement utilisé en PCR.

1.6. Analyses de séquences et identification d'amorces

Un alignement de séquences, correspondant au gène de l'ARNr 16S, a été réalisé à l'aide du logiciel ClustalW. Les espèces analysées ont été définies comme étant les plus proches phylogénétiquement de *Clostridium piliforme* (Duncan *et al.*, 1993). Elles appartiennent toutes au genre *Clostridium* sauf une : *Ruminococcus hansenii*.

Un premier couple d'amorce, ClosF/ClosR a été défini de manière à amplifier un fragment de 920pb à partir du gène de l'ARNr 16S de toutes les souches analysées

Un second couple, CpilF/CpilR, a été défini pour n'obtenir un fragment de 656pb, qu'à partir de l'ADN de *Cl. piliforme*.

1.7. Amplifications PCR

Pour vérifier la spécificité des amorces CpilF et CpilR

vis-à-vis de *Cl. piliforme*, une amplification PCR est réalisée à partir de l'ADN des souches bactériennes proches phylogénétiquement.

Le couple d'amorces ClosF et ClosR a été défini pour permettre l'amplification d'un fragment à partir de la plupart des espèces de *Clostridium*. Il est utilisé avec le premier couple d'amorce (CpilF et CpilR), dans une PCR nichée, afin d'améliorer la sensibilité de détection de *Cl. piliforme*.

A partir de l'ADN des échantillons cliniques, une première amplification est réalisée avec les d'amorces ClosF et ClosR, puis une deuxième amplification a lieu avec le couple d'amorces CpilF et CpilR à partir de 1 µL de la dilution 1/10 des produits issus de la première PCR. Les produits sont ensuite visualisés sur gel d'agarose 1% en tampon TBE 0.5X contenant 0,5µg/mL de BET.

2. Résultats

2.1. Spécificité de la technique vis-à-vis de *Clostridium piliforme*

Dans l'objectif de vérifier la spécificité des deux couples d'amorces utilisés au cours de la PCR nichée chaque couple a été testé individuellement par PCR sur plusieurs espèces de *Clostridium*. La PCR réalisée avec les amorces ClosF et ClosR permet d'amplifier un fragment d'environ 920pb à partir de toutes les souches bactériennes testées (figure 1A). Ce couple d'amorces permet donc bien d'amplifier un fragment à partir de plusieurs espèces de *Clostridium*. La PCR réalisée avec les amorces CpilF et CpilR (Figure 1B) permet d'amplifier un fragment d'environ 650 pb seulement à partir des trois échantillons d'ADN de *Clostridium piliforme*. Aucune amplification n'est observée avec les autres souches bactériennes. Le couple d'amorce CpilF et CpilR est donc bien spécifique de *Clostridium piliforme*.

2.2. Sensibilité de la PCR nichée à partir des échantillons cliniques

Pour tester la sensibilité de la technique à partir des prélèvements cliniques, les amorces spécifiques de *Clostridium piliforme* (CpilF/CpilR) ont d'abord été utilisés en PCR sans amplification préalable avec le couple ClosF/ClosR (figure 2A). Un faible signal vers 650 pb est obtenu pour 3 échantillons sur six (C2, F2 et F3). Pour les autres échantillons, il n'y a pas d'amplification à la taille attendue (650 pb).

En réalisant la PCR nichée (deux amplifications PCR consécutives : la première avec ClosF/ClosR suivie d'une seconde avec CpilF/CpilR), une amplification est observée pour cinq échantillons sur six (C10, C2, C3, F2 et F3) (figure 2B). Ces cinq échantillons seraient donc contaminés par *Clostridium piliforme*. Une première amplification avec les amorces ClosF et ClosR, avant la PCR spécifique de *Clostridium piliforme* (CpilF/CpilR) permet donc d'augmenter la sensibilité de la technique à partir des échantillons cliniques.

Figure 1. Spécificité de la PCR CpilF/CpilR vis-à-vis de *Clostridium piliforme*. Amplifications PCR réalisées à partir des ADN des souches bactériennes : (A) avec les amorces ClosF/ClosR, (B) avec les amorces CpilF/CpilR. Le puits M est le marqueur de taille.

1 = *Cl. clostridioforme*, 2 = *Cl. coccoïdes*, 3 = *Cl. colinum*, 4 = *R. hansenii*, 5 = *Cl. neopropionicum*, 6 = *Cl. oroticum*, 7 = *Cl. perfringens*, 8 = *Cl. propionicum*, 9 = *Cl. sordellii*, 10 = *Cl. spiroforme*, 11 = *Cl. symbiosum*, 12 = *Cl. species ASF 356*, 13 à 15 = *Cl. piliforme*

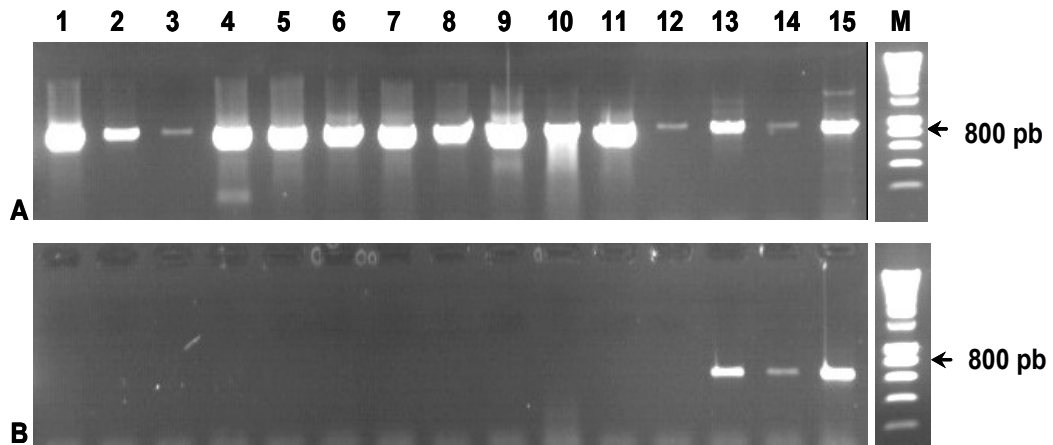


Figure 2. Sensibilité de la PCR nichée à partir des échantillons cliniques. Amplifications PCR réalisées avec les amorces CpilF/CpilR : (A) directement à partir des échantillons, (B) à partir des produits issus de la première amplification (avec les amorces ClosF/ClosR).

Les puits T+ et T- sont respectivement le témoin positif (ADN de *Clostridium piliforme*) et le témoin négatif (H₂O). Le puits M est le marqueur de taille

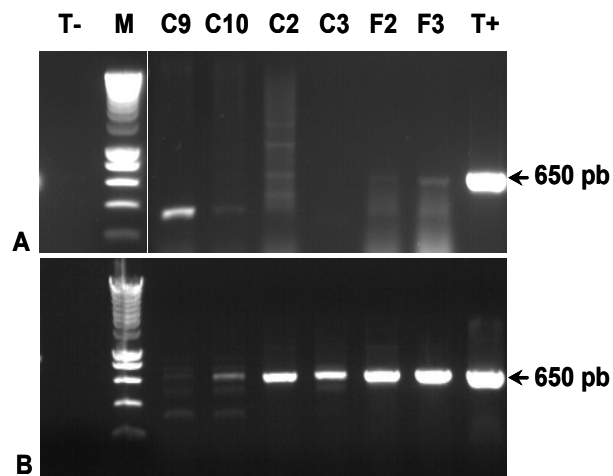
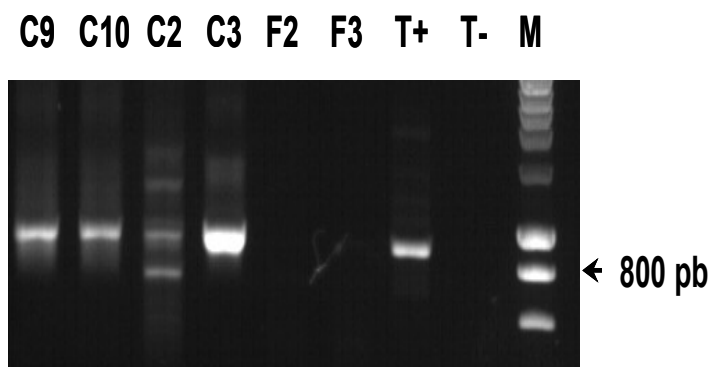


Figure 3. Amplification PCR avec les amorces ClosF et ClosR à partir des échantillons cliniques. Les puits T+ et T- sont respectivement les témoins positifs et négatifs.

Le puits M est le marqueur de taille, la flèche indique la bande à 800pb.



L'échantillon C9 ne semble pas présenter d'amplification, soit parce qu'il n'est pas contaminé par *Clostridium piliforme*, soit parce qu'il y a eu un problème au moment de l'extraction d'ADN. Pour vérifier ce point, la première étape de la PCR nichée, utilisant les amorces ClosF et ClosR a été réalisée sur tous les échantillons. Cette PCR qui permet l'amplification d'un fragment de 920 pb à partir du gène de l'ARNr 16S de plusieurs espèces de *Clostridium* a bien révélé un fragment de 920 pb pour les échantillons C9, C10, C2 et C3 (figure 3), ce qui valide donc l'extraction d'ADN pour l'échantillon C9. Cet échantillon ne serait donc probablement pas contaminé par *Clostridium piliforme* mais par une ou plusieurs autres espèces de *Clostridium*.

3. Discussion

Le diagnostic de la maladie de Tyzzer est très difficile à établir, du fait essentiellement de l'absence de technique culturale pour identifier ce germe. Différentes techniques plus ou moins lourdes à mettre en oeuvre sont utilisées pour mettre en évidence la présence de *Clostridium piliforme* : histologie, sérologie... Cependant ces techniques souffrent d'un manque de sensibilité et peuvent aboutir à un échec dans la détection ou bien à des faux positifs si l'on admet que des réactions croisées peuvent exister lors de l'utilisation des tests sérologiques par exemple. La technique PCR qui est encore peu utilisée et qui reste du domaine de la recherche, pourrait se révéler néanmoins plus fiable et aussi plus rapide.

L'étude que nous avons réalisée montre que la mise en oeuvre d'une PCR nichée a permis de détecter la présence de *Clostridium piliforme* dans des échantillons qui ont, dans un premier temps, été diagnostiqués comme négatifs par d'autres méthodes de diagnostic. C'est le cas avec les échantillons C2, C3, F2 et F3, pour lesquels l'histologie s'est avérée vaine (Le Normand et al., 2005). C'est une technique qui est également spécifique de *Clostridium piliforme* puisqu'elle ne croise pas avec les souches phylogénétiquement proches de cette bactérie.

Dans cette étude, les échantillons de foie analysés présentaient un piqueté nécrotique permettant de suspecter l'intervention de *Cl. piliforme* (Le Normand et al., 2005). Ces observations sont cohérentes avec les résultats de la PCR nichée où une amplification a été observée à partir des prélèvements de foie (F2 et F3). Mais lors des descriptions de la maladie de Tyzzer chez le lapin, le foie peut se révéler alésionnel (Licois, 1986a, b). Il serait intéressant de vérifier si la PCR nichée est susceptible de révéler ce germe dans le cas où le foie ne présente pas de lésion.

Par ailleurs, l'intensité des signaux à partir des échantillons de foie étant plus forte par rapport à celle des échantillons de caecum C2 et C3 (figure 2B), il semblerait que la technique soit plus sensible sur des échantillons obtenus à partir de foie que ceux obtenus à partir de caecum. Cependant, aucune amplification n'a été observée avec les amorces ClosF/ClosR pour les

échantillons F2 et F3 (figure 3), alors que les échantillons de caecum ont tous révélés une bande à 920 pb. Cette différence peut s'expliquer par la forte teneur en bactéries du genre *Clostridium* que comprend la flore digestive.

La nature du contenu caecal étant très proche de celle des fèces, il peut être envisagé d'appliquer cette technique aux prélèvements fécaux. L'intérêt de détecter les animaux vivants infectés par *Clostridium piliforme* est de pouvoir administrer plus rapidement un traitement. La sensibilité de la PCR nichée vis-à-vis des prélèvements fécaux reste toutefois à évaluer.

Remerciements

Nous remercions Samuel Boucher (Labovet, France), Nancy Taylor (Massachusetts Institute of Technology, USA), Dr Akira Takakura (Central Institute of Experimental Animals, Japon), Dr Toshinori Furukawa (Research facilities for laboratory Animal Science, Japon) et Dr Lela K Riley (USA) pour nous avoir gracieusement fourni respectivement les souches de *Clostridium spiroforme*, de l'ASF356 et les 3 échantillons d'ADN de *Clostridium piliforme*.

Références

- DUNCAN A.J., CARMAN R.J., OLSEN G.J., WILSON K.H., 1993. Assignment of the Agent of Tyzzer's Disease to *Clostridium piliforme* comb. Nov. On Basis of 16S RNA Sequence Analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 314-318
- FELDMAN S.H., KIAVAND A., SEIDELIN M., REISKE H.R., 2006. Ribosomal RNA sequences of *Clostridium piliforme* isolated from rodent and rabbit: re-examining the phylogeny of the Tyzzer's disease agent and development of a diagnostic polymerase chain reaction assay. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 45, vol.5, 65-73.
- DEWHIRST E.F., CHIEN C-C, PASTER B.J., ERICSON, R.L., ORCUTT R.P., SCHAUER D.B., FOX J.G., 1999. Phylogeny of the define murine microbiota: altered Schaedler flora. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3287-3292.
- LE NORMAND B., LICOIS D., NIEPCERON A., CHATELLIER S., 2005. Description d'un cas de maladie de Tyzzer dans un élevage intensif de lapins de chair. *11^{ème} journée de la recherche cunicole, 29-30 nov. 2005*, (ITAVI Ed.), Paris, 241-244.
- GOTO K., ITOH T. 1994. Detection of *Bacillus piliformis* by specific amplification of ribosomal sequences. *Exp. Anim.*, 43, 389-394.
- FURUKAWA T., FURUMOTO K., FUJIEDA M., OKADA E. 2002. Detection by PCR of the Tyzzer's disease organism (*Bacillus piliformis*) in feces. *Exp. Anim.* 51, 513-516.
- LICOIS D., 1986 a. La maladie de Tyzzer. *Ann. Rech. Vét.*, 171 363-386.
- LICOIS D., 1986 b. Description d'un cas de maladie de Tyzzer associé à une colibacillose chez le lapin : identification de *Bacillus piliformis* mais échec dans la tentative de son isolement. *Rec. Méd. Vét.*, 162, 1203-1209.
- PADILHA M.T.S., LICOIS D., GIDENNE T., CARRE B., FONTY G. 1995. Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. *Reprod. Nutr. Dev.* 35: 375-386.
- PEETERS J.E., 1985. Naturally occurring Tyzzer's disease (*Bacillus piliformis* infection) in commercial rabbits : a clinical and pathological study. *Ann. Rech. Vét.* 16, 6979.
- TYZZER E.E. 1917. A fatal disease of the Japanese waltzing mouse caused by a spore bearing bacillus (*Bacillus piliformis*, N. SP.) *J. Med. Res.*, 37, 307-338 .