

compte rendu

Séquençage à haut débit : un outil pour le diagnostic causal des pneumonies chez les bovins ?



▲ 45 % des autopsies de jeunes bovins entre 1 et 6 mois sont motivées par des troubles respiratoires.

Laurent MASCARON

Correspondant en infectiologie et vaccinologie
Courriel : l.mascaron@orange.fr

ETUDE

Le séquençage haut débit du génome est utilisé pour identifier les bactéries associées aux maladies respiratoires des bovins. Cette technique semble toutefois moins indiquée dans le diagnostic de routine que dans la résolution des cas non élucidés par les méthodes d'analyses classiques. Elle a été présentée lors des Journées scientifiques de l'Adilva*, les 30 septembre et 1^{er} octobre, à Tours.

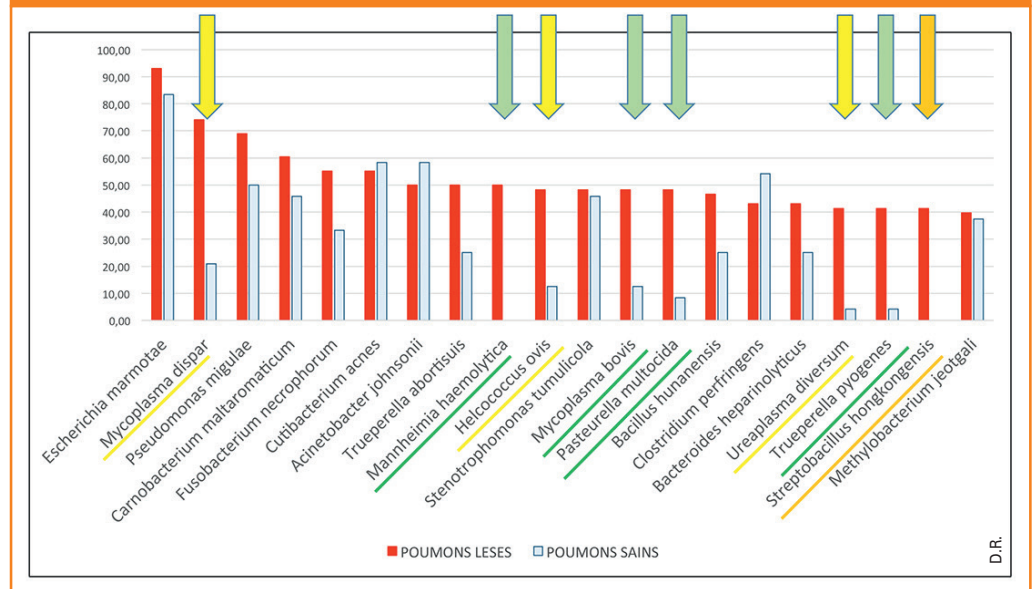
Dans le cadre de la session consacrée aux nouvelles technologies lors des Journées scientifiques de l'Adilva*, qui se sont déroulées, les 30 septembre et 1^{er} octobre, à Tours, notre confrère Fabien Grégoire, chef du service sérologie et biologie moléculaire au laboratoire de diagnostic de l'Arsia** à Ciney (Belgique), a présenté les résultats d'une étude visant à évaluer l'intérêt d'un outil de séquençage du génome dans l'identification des bactéries associées aux maladies respiratoires chez les bovins.

Prélèvements adressés lors de maladie respiratoire

L'Arsia est un groupement d'éleveurs wallons à vocation sanitaire doté d'un laboratoire qui l'appuie dans ses missions de détection et de contrôle des maladies, notamment à travers la réalisation d'autopsies et d'analyses des prélèvements qui lui sont adressés en diagnostic de routine.

« Parmi les cadavres bovins confiés, les veaux d'âge inférieur à 1 mois dominent ceux des autres classes d'âge (plus de 50 % des cadavres bovins). Suivent ensuite les jeunes bovins entre 1 et 6 mois (27 % des cadavres bovins), pour lesquels près de 45 % des autopsies sont motivées par des troubles respiratoires (données Arsia 2020) », a indiqué Fabien Grégoire. « Après autopsie et examens complémentaires habituels (PCR sur pou-

Prévalence des bactéries recherchées par séquençage sur poumons sains et lésés au laboratoire de l'Arsia (% des prélèvements analysés)



▲ En vert : bactéries connues comme pathogènes et recherchées en routine au laboratoire. En jaune : bactéries connues comme pathogènes et non recherchées en routine au laboratoire. En orange : bactéries dont le caractère pathogène n'est pas décrit ou pour lesquelles l'identification est douteuse.

mons et culture bactérienne, recherche de mycoplasmes), l'agent causal peut être identifié dans 8 à 9 cas de pneumonie sur 10, sur la base également des lésions macroscopiques, voire de l'histologie, mais il reste une proportion non négligeable de cas cliniques non expliqués ».

Nouvelle technologie pour rechercher les bactéries associées aux pneumonies

En 2019, un projet d'envergure a débuté à l'Arsia dont l'objectif est d'apporter un nouvel éclairage sur le microbiote respiratoire des bovins âgés de 1 à 6 mois, à l'aide de la technologie de séquençage haut débit 16S. Un premier volet, consacré à la métagénomique bactérienne, a visé à détecter l'ensemble des bactéries présentes dans un échantillon de poumon en ciblant le gène ARN ribosomique 16S. Ce gène, dont la séquence diffère entre chaque espèce bactérienne, joue un rôle central dans la synthèse protéique et constitue un identifiant très stable et fiable des organismes bactériens.

Comme la PCR, le séquençage 16S est adapté à l'identification des bactéries difficiles à cultiver (bactéries intracellulaires ou à croissance lente) et aux bactéries devenues non viables suite au traitement antibiotique ou à la qualité médiocre de l'échantillon. Toutefois, la différence majeure avec la PCR classique est que cette approche est universelle et ne nécessite pas de choisir *a priori* la ou les bactérie(s) dont on souhaite détecter la présence.

Dans une première étape, tout l'ADN d'origine bactérienne présent dans l'échantillon est amplifié de manière non spécifique en partant d'une séquence commune à toutes les bactéries (gène codant pour le fragment 16S de l'ARN ribosomique bactérien).

Dans une seconde étape, les brins d'ADN obtenus après amplification sont séquencés. L'ensemble des séquences d'ADN issues du processus d'amplification est ensuite comparé à une base de données afin de déterminer les espèces bactériennes contenues dans l'échantillon.

« L'étude a été menée sur 174 prélèvements de poumons de veaux présentant des lésions de pneumonie, 58 correspondant à des cas résolus et 116 à des cas non élucidés. En comparaison, un séquençage 16S a été réalisé sur 24 poumons issus de veaux non atteints d'affection respiratoire », a déclaré Fabien Grégoire.

Prévalence comparée des bactéries sur poumon sain ou lésé

Alors que 32 % des mises en cultures de prélèvements de poumons après autopsie s'avèrent négatives en analyse bactériologique à l'Arsia (78 % pour la recherche de mycoplasmes), on observe une grande variété de bactéries mises en évidence par séquençage, avec un nombre important de germes commensaux ou d'origine environnementale qui ont pu coloniser le tissu pulmonaire après la mort de l'animal. Il est donc pertinent de comparer les bactéries identifiées dans le groupe des poumons sains à celui des poumons lésés. Le

compte rendu (suite)

graphique présente les 20 d'entre elles les plus fréquemment identifiées dans les poumons lésés.

Pour chacune de ces bactéries, le pourcentage de détection dans les poumons sans lésion est indiqué en parallèle à celui observé dans les poumons lésés. Ces chiffres laissent apparaître que plusieurs d'entre elles sont détectées avec des fréquences au moins aussi élevées dans les poumons sains, ce qui semble indiquer qu'il peut s'agir de bactéries contaminantes.

D'autres sont par contre détectées dans les poumons lésés alors que leur prévalence dans les poumons sains est faible et sont régulièrement mises en évidence en routine par les tests PCR et la culture, telles *Mycoplasma bovis*, *Mannheimia*

haemolytica, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* ou *Trueperella pyogenes*.

D'autres bactéries, comme *Mycoplasma dispar*, *Helicoccus ovis* et *Ureaplasma diversum*, sont rapportées dans la littérature comme pathogènes dans l'espèce bovine mais ne sont pas détectées en routine. Enfin, certaines bactéries comme *Bacteroides spp.* apparaissent comme plus prévalentes dans les poumons lésés mais peu d'informations existent quant à leur implication dans les affections respiratoires bovines. Sans pouvoir nécessairement expliquer leur présence, les traitements antibiotiques curatifs fréquemment administrés aux animaux avant envoi des prélèvements ou des bovins au laboratoire ont également pu influencer le microbiote et rendre dans certains

cas inapparentes les bactéries responsables de la pneumonie.

A la lumière de cette étude, l'apport du séquençage haut débit semble moins indiqué dans le diagnostic de routine que dans la résolution des cas non élucidés par les méthodes d'analyses classiques. « *Un second volet de l'étude s'intéressera à la métagénomique virologique, en collaboration avec la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Liège, afin d'étudier les virus, connus ou non, qui pourraient potentiellement causer des infections pulmonaires* », a conclu notre confrère. ■

* Adilva : Association française des directeurs et cadres de laboratoires vétérinaires publics d'analyses.

** Arsia : Association régionale de santé et d'identification animales.

Boehringer Ingelheim : avis positif pour l'utilisation combinée d'Ingelvac CircoFLEX et Ingelvac PRRSFLEX EU en Europe

PROPHYLAXIE

Boehringer Ingelheim a annoncé, le 18 octobre, l'avis positif de l'Agence européenne du médicament sur l'usage combiné d'Ingelvac CircoFLEX ND et Ingelvac PRRSFLEX EU ND dans l'Union européenne. « *L'administration combinée de ces deux vaccins est une innovation en gestion sanitaire porcine. Désormais, la prévention de deux affections fréquentes et coûteuses, la circovirose porcine (PCV2) et le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP), peut être réalisée en une seule injection. Dans les élevages porcins, la majorité des animaux reçoivent des vaccins contre ces maladies* », explique le laboratoire.

Il précise que « *grâce à cette combinaison de vaccins mélangeables à l'élevage, il sera possible de mieux cibler le programme vaccinal en fonction de la situation épidémiologique. Cette innovation contribue également à améliorer le bien-être des animaux et la conduite générale de l'élevage en réduisant le stress dû à la vaccination et la manipulation des animaux. La combinaison d'Ingelvac CircoFLEX ND et Ingelvac ND PRRS MLV*



▲ *L'administration combinée de ces deux vaccins est une innovation en gestion sanitaire porcine. Désormais, la prévention de la circovirose porcine et du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin peut être réalisée en une seule injection.*

est déjà enregistrée aux États-Unis sous la marque FLEX CircoPRRS ».

Faciliter la vaccination

« Le mélange FLEX CircoPRRS ND, associé à FreVAX ND, dispositif d'injection sans aiguille

commercialisé cette année, poursuit le travail d'innovation de la marque en améliorant la qualité de vie des animaux tout en facilitant le processus de vaccination pour les vétérinaires et les éleveurs », conclut notre confrère Markus Hammer (responsable monde de la division Porcs Boehringer Ingelheim Santé Animale).

Ingelvac CircoFLEX ND s'administre aux jeunes porcs au moment du sevrage. Il est fabriqué à l'aide de la technologie de diafiltration brevetée DiaTEC ND, « *offrant le premier et unique vaccin anti-PCV2 non virucide mélangeable en élevage avec un vaccin PRRS vivant modifié* ».

Ingelvac PRRSFLEX ND EU, « *seul vaccin SDRP du marché spécialement formulé pour les porcelets, protège des infections SDRPv de type 1 dans le but d'optimiser les performances des porcs à tous les stades de la production. Il est utilisé pour l'immunisation active des porcs cliniquement sains à compter de l'âge de 17 jours dans les élevages affectés par le SDRPv de type 1 afin de diminuer les symptômes respiratoires cliniques de l'infection virale SDRP* ». Il s'administre en dose de 1 ml par injection intramusculaire unique. **V.D.**

Le prix EcoAntibio 2021 décerné à un travail sur la vaccination contre le virus respiratoire syncytial bovin

RÉCOMPENSE

A l'occasion du comité de pilotage du Réseau français de santé animale (RFSA) du 27 octobre, le Prix EcoAntibio 2021 a été remis à Sabine Riffault, directrice d'unité Virologie à l'Inrae*, pour sa publication *A single shot pre-fusion-stabilized Bovine RSV F Vaccine is Safe and Effective in Newborn Calves with Maternally Derived Antibodies* dans *Vaccines*.

Ce travail présente une approche nouvelle pour la vaccination des bovins contre le virus respiratoire syncytial. « *Cette affection respiratoire est la première cause de recours aux antibiotiques chez le veau du fait des*

surinfections bactériennes. Le design du vaccin est intéressant et son mode d'administration en une seule injection est innovant. Cette étude sur animal cible présente également un excellent modèle pour la médecine humaine (animal modèle) », explique le RFSA.

Immunisation locale de la mamelle

Le jury a souhaité également accorder une mention spéciale à deux autres publications : - celle de Béatrice Mounaix, *Veau – Double vaccination des mères et sensibilisation à la distribution du colostrum : des impacts positifs*

«Le design du vaccin est intéressant.»

sur la robustesse des veaux de boucherie : ces travaux présentés sous forme de poster démontrent l'importance de la vaccination et des pratiques d'élevage pour réussir à réduire le recours à l'antibiothérapie ; une publication dans une revue scientifique est espérée ;

- et celle de Nathan Cebron, *Th17-related mammary immunity, but not a high systematic Th1 immune response is associated with protection against E. coli mastitis* : l'intérêt de ces travaux porte sur la piste d'immunisation locale de la mamelle dans une affection majeure pour la filière bovine. **V.D.**

* Inrae : Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement.