

EN DIRECT DU LABO

Avec Pathosense, Labocéa met le diagnostic métagénomique semi-quantitatif à la portée des praticiens



« En signant en juin dernier un partenariat avec la société Pathosense, Labocéa améliore encore les possibilités offertes par le séquençage à haut débit pour le terrain », indique la Dre Vét. Mouna Abed, nouvelle directrice santé animale de Labocéa. Pathosense est une plateforme de diagnostic en métagénomique cofondée en 2020 par deux vétérinaires de la faculté de Gand (Belgique) : le Pr Hans Nauwynck et le Dr Sebastiaan Theuns. L'approche de séquençage par la méthode Pathosense permet de connaître l'ensemble des acides nucléiques présents dans un prélèvement (le principe de la métagénomique), avec une originalité majeure : une analyse semi-quantitative qui permet d'indiquer quel(s) pathogène(s) peu(ven)t être dominant(s) dans le prélèvement.

Il s'agit d'un séquençage par technologie Oxford Nanopore, permettant de "lire" de longs brins d'acide nucléique, puis de reconstituer la séquence génomique initiale dans son intégralité (techniques des fragments recouvrants et cartographie génomique), grâce à une analyse bio-informatique poussée. À Ploufragan, la technologie Oxford Nanopore est aussi mise en œuvre (séquenceur MinIon) – d'où l'intérêt du partenariat avec Pathosense. Cette technologie est surtout utilisée jusqu'à présent pour le séquençage intégral du génome de pathogènes. Elle permet l'identification génétique plus précise et la recherche des facteurs de virulence ou d'antibiorésistance (résistome) et l'analyse métagénomique de l'ARN 16S bactérien (microbiome) pour les bactéries, ainsi que le génotypage viral (PCV2, SDRPV, PPV1, IBDV, rotavirus, etc.).

Pour le partenariat, « sur le plan pratique, le praticien peut réaliser lui-même le prélèvement en élevage grâce au kit Pathosense fourni par Labocéa, et nous l'adresser. Il peut aussi envoyer directement des animaux/prélèvements à Labocéa. La préparation des échantillons, l'extraction du génome et le séquençage sont réalisés à Labocéa-Ploufragan. Les données du

séquençage sont transmises sur le cloud de Pathosense, qui applique son traitement de données et renvoie les résultats à Labocéa ». Ces analyses indiquent quels pathogènes sont présents dans le prélèvement (par exemple dans un écouvillon nasopharyngé de truie) et selon quelle importance (faible, modérée ou élevée). « Un même résultat peut comporter des virus (par exemple présence élevée de SDRPV) comme des bactéries (par exemple présence élevée de *Mycoplasma hyopneumoniae* et faible de *Glaesserella parasuis* et de *Streptococcus* sp.) ». Les termes de l'accord avec Pathosense prévoient la protection des données épidémiologiques et des résultats obtenus, qui restent localisés à Ploufragan.

Toujours sur le séquençage, Labocéa est partenaire d'une plateforme de séquençage à haut débit Illumina sur le site de Quimper (en partenariat notamment avec l'Adria). Cette technologie *short reads*, qui permet de séquencer de petits brins d'acide nucléiques, permettra après assemblage d'obtenir une qualité de séquençage supérieure pour des génomes bactériens de grande taille (par exemple salmonelles).

UN CHIFFRE,
DES ANALYSES
3 730

C'est le nombre de RT-PCR qui ont été réalisées à Labocéa pour la recherche du génome du virus de la maladie hémorragique épizootique (MHE) entre octobre 2023 et la mi-août 2024. Seules 90 ont été réalisées dans le contexte d'une suspicion clinique, provenant d'Ille-et-Vilaine, des Côtes-d'Armor ou du Finistère.

ÇA BOUGE À LABOCÉA

Rappel sur les envois de prélèvements pour la stimulation de lymphocytes pour dosage de l'interféron gamma (tuberculose bovine)

Le test de dosage de l'interféron gamma (IFN γ), dans le cadre du dépistage de la tuberculose bovine, est prescrit par les DDPP/DDCSPP. La réponse immunitaire à *Mycobacterium bovis* est médiée par les lymphocytes T et les cellules NK. Ce test repose sur le principe de la « mémoire » des lymphocytes T : s'ils ont déjà été « primés » (sensibilisés) par les antigènes de *M. bovis*, lors d'une nouvelle exposition, ils vont à nouveau sécréter cette cytokine, en quantité. Le test repose donc sur l'obtention de lymphocytes T circulants (prise de sang sur anticoagulant), et leur exposition *in vitro* à des tuberculines spécifiques. La quantité d'IFN γ sécrétée

par ces cellules est alors mesurée par une méthode ELISA « sandwich » (trousses de laboratoire, officiellement validées).

Si cette quantité est nulle, l'animal est indemne de tuberculose. La technique présente un point critique : la phase de stimulation doit intervenir dans les huit heures suivant le prélèvement sanguin. C'est pourquoi le plan national de surveillance de la tuberculose bovine a mis en place un réseau de laboratoires de diagnostic proches des lieux de prélèvement, qui vont réaliser la phase de stimulation *in vitro* des lymphocytes dans ce court délai.

Le site de Labocéa-Fougères est agréé pour cette première étape, et la Dre Vét. Camille Levesque, cheffe du service immunologie virologie PCR de Labocéa-Fougères, souligne l'importance de la qualité du prélèvement :

- « Le prélèvement est à réaliser sur un tube hépariné de 10 ml, bien rempli (ou 2 tubes de 5 ml). Les prélèvements doivent être retournés délicatement plusieurs fois après la prise de sang, pour bien dissoudre l'héparine ; ils ne doivent être ni réfrigérés ni congelés.

- Les prélèvements seront déposés avant 14 h les lundi, mardi ou mercredi. Il ne sera pas possible de les traiter un vendredi. Dans tous les cas, il est préférable de prévenir le laboratoire.

- Le délai maximal entre la réalisation du prélèvement et sa réception par le laboratoire est de 6 heures. Pendant cette durée il est primordial de maintenir les tubes à 21 ± 5 °C (transport en glacière/boîte isolée). En hiver, il faut prévoir une glacière (contenant une bouteille d'eau chaude qui ne soit pas en contact direct avec les prélèvements). En été, mettre un bloc réfrigérant enroulé dans une couverture (éviter le contact direct avec les prélèvements), dans une glacière pour maintenir une température correcte ».

Le plasma obtenu est ensuite envoyé à un autre laboratoire, pour le dosage proprement dit de l'IFN γ .

Mise en perspective du recours au PTS pour les techniques de flottation, en parasitologie

Pour les analyses coprologiques, un liquide de flottation nécessite une densité élevée pour la mise en évidence des œufs lourds (trématodes notamment). Mais les composés utilisés jusqu'ici ne sont plus acceptables, soit en lien avec leur toxicité pour le manipulateur (iodomercurate de potassium), soit pour leur toxicité environnementale (sulfate de zinc). La coprologie n'est toutefois pas une analyse orpheline. Un composé alternatif a été validé avec succès : le polytungstate de sodium (PTS). Avec deux praticiens également membres de la commission parasitologie de la SNGTV, le Dr Vét. Guillaume Lequeux, chef du service « Anatomie pathologique et microbiologie vétérinaire » à Labocéa-Fougères, a réalisé une présentation et animé un atelier lors des journées nationales des GTV, en mai 2024, consacrés à l'utilisation du PTS comme liquide de flottation.

C'est le laboratoire de parasitologie de l'ENV de Toulouse qui a identifié le PTS comme alternative, « combinant à la fois la rapidité et la praticité des techniques de flottation utilisant la lame de Mac Master ». Initialement utilisé en palynologie (étude des pollens dans les sédiments paléontologiques), puis en paléoparasitologie vétérinaire (recherche d'œufs de parasites dans les coprolithes), il se présente sous la forme d'une solution non visqueuse, non corrosive ni inflammable, très stable et non volatile à température ambiante. Les préparations du commerce (2,82 g/ml) sont incolores à jaunâtres, sans odeur.

« Le PTS présente une toxicité (orale, dermique, oculaire et respiratoire s'il est inhalé), mais ne nécessite pas d'utilisation de hottes aspirantes pour sa manipulation. Son écotoxicité (aiguë, la seule étudiée) semble limitée, mais il doit être éliminé dans des conteneurs pour déchets liquides, comme c'est le cas pour le sulfate de zinc ».

Pour une solution de densité 1,44, il suffit de diluer 100 ml de la solution du commerce dans 309 ml d'eau distillée. « La solution ainsi obtenue se conserve en bouteille plastique ou en verre à température ambiante, pendant de très nombreux mois, d'après notre expérience ». Deux études ont été menées à Labocéa-Fougères pour évaluer la mise en œuvre du PTS comme liquide de flottation, en prenant la flottation à l'iodomercurate comme référence. Avec les retours d'expérience en cliniques vétérinaires, présentés aussi aux JNGTV 2024, elles permettent de conclure que « le PTS permet d'obtenir des performances analytiques, qualitatives et quantitatives, comparables voire meilleures par rapport aux liquides denses habituellement utilisés, que ce soit pour les œufs de strongles ou ceux de trématodes ».

Son coût est nettement plus élevé et les techniques de régénération ne sont pas encore au point, ce qui limite son intérêt aux contextes où le volume utilisé est faible (Mac Master après une phase de centrifugation ou utilisation de dispositifs de type Mini-Flotac).

Actes des JNGTV 2024, « Utilisation du PTS comme liquide de flottation » par G. Lequeux, L. Dravignay et J-P Gratioux, p. 667-676.

EN BREF

● **ONE HEALTH** : 120 scientifiques ont assisté au colloque international « *The One Health challenges to tackle infectious diseases* », qui s'est tenu à Saint-Brieuc, du 12 au 14 juin dernier. L'Anses avait associé Labocéa au comité scientifique, qui a sélectionné notamment une présentation inaugurale du Pr Serge Morand (Cnrs), et permis d'assister à une session sur les aspects zoonotiques de l'influenza aviaire coprésidée par les Drs Vét. Nicolas Eterradossi (Anses) et Mouna Abed-Zahar (Labocéa). Le succès de cette première édition, dont Labocéa était co-organisateur, incite à la préparation d'une seconde, si possible dans deux ans, selon des modalités qui restent à définir.



● **La Dre vét. Maria Zacharopoulou** a intégré l'équipe de santé animale de Labocéa-Ploufragan depuis la mi-juillet, afin de soutenir la croissance de l'activité d'histopathologie. Formée à faculté vétérinaire de Thessalie (Grèce), elle a obtenu par la suite le diplôme d'études spécialisées vétérinaires « Anatomie pathologique » (DESV - AP) après trois années passées à l'École nationale vétérinaire de Toulouse. Lauréate de la bourse européenne de chercheur Marie Skłodowska Curie, elle a exercé en tant que prestataire indépendante, avec une valence prononcée en histologie chiens et chats.



● **La Dre vét. Mouna Abed-Zahar** est la directrice du pôle « Santé animale » de Labocéa depuis ce 1^{er} septembre 2024. Elle exerçait depuis mars 2021 en tant que cheffe du service « Immunologie, virologie, PCR et séquençage » du site de Ploufragan. Initialement formée sur l'aviculture, elle a rapidement étendu le champ de ses compétences aux autres filières animales, entre autres au travers de sept années d'enseignement vétérinaire (maître de conférence), d'une thèse d'université réalisée avec l'Anses-Ploufragan et de son activité de biologiste à Labocéa.

● **AGRÈMENTS** : Labocéa s'est vu décerner cette dernière année plusieurs nouveaux agréments sur différents sites. Celui de Fougères sur la peste porcine africaine (PPA), dont la pression s'accroît à nos frontières, lui permet d'assurer le diagnostic par PCR et sérologie (ELISA) depuis janvier 2024. À Ploufragan, le laboratoire a fait partie des tous premiers à être agréés pour la mise en évidence du génome H5 HP des virus influenza aviaire par RT-PCR, dans le cadre des analyses sur suspicion clinique. Il dispose aussi à présent de l'agrément en sérologie pour les anticorps dirigés contre les nucléoprotéines des virus influenza aviaire (ELISA NP) pour les analyses officielles de surveillance active post-vaccination.

● **BOTULISME** : plusieurs experts de Labocéa-Ploufragan sont co-auteurs de la première description d'un cas de botulisme de type C en élevage porcin breton, publiée cet été dans la revue *Anaerobe*. Les Drs Vét. Mouna Abed-Zahar, Nadia Amenna, Mustapha Fellag, ainsi que les cadres techniques Marie-Agnès Baudouard et Marie-Hélène Bayon-Auboyer, sont intervenus à la fois pour la mise en évidence de la bactérie, de sa toxine et des lésions histologiques.

Le résumé de la publication est accessible à <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1075996424000684?via%3Dihub>.