

« américaines » ont été répertoriées au Royaume Uni, en Italie et en France. Une étude a par ailleurs été menée par notre équipe pour analyser l'ensemble des virus grippaux isolés en France au laboratoire depuis 2005. Sur les 28 souches détectées, toutes appartiennent au lignage américain et plus particulièrement au sous-lignage floridien, tout comme les souches anglaises et italiennes mais également celles responsables des épidémies survenues au Japon et en Australie en 2007. Il semblerait par ailleurs que la protection offerte par les vaccins jusqu'alors n'était pas optimale ce qui a conduit l'Office international des épizooties (OIE) à émettre une recommandation demandant l'incorporation d'une souche représentative du sous-lignage floridien dans les valences vaccinales.

Pour le cheval, de nombreux vaccins à virus inactivé, comprenant des protéines virales ou mis au point via la technologie Canarypox sont commercialisés en France. Plusieurs fabricants continuent à incorporer une souche H7N7 et une ou plusieurs souches du sous-type H3N8 (souvent représentatives des lignages américains et européens).

Certains d'entre eux ont déjà tenu compte des recommandations de l'OIE en incorporant en plus une souche du sous-lignage floridien. Le suivi régulier des souches circulant sur le terrain permet de procéder à une prophylaxie adaptée et surtout de surveiller l'éventuelle apparition d'une souche qui aurait évolué de telle sorte qu'elle échapperait au système immunitaire des chevaux. Les outils diagnostiques actuels étant capables de détecter l'ensemble des virus influenza de type A, l'apparition d'un nouveau sous-type au sein d'une population équine serait mis en évidence de la même manière que le sous-type H3N8. Le typage systématique des souches isolées sur le sol français réalisé par notre équipe permet une surveillance pratiquement en temps réel des souches circulantes. Une telle information peut alors être transmise aux différents acteurs de la filière via le Réseau d'épidémiologie surveillance des pathologies équines (RESPE). ■

Loïc LEGRAND, Stéphane PRONOST,  
Pierre Hugues PITEL, Christine FORTIER,  
Guillaume FORTIER, laboratoire Frank  
DUNCOMBE 14053 CAEN cedex 4  
Christel MARCILLAUD PITEL, RESPE 223  
rue Pasteur 14120 Mondeville

#### Remerciements :

Les auteurs remercient Stéphane ZIENTARA pour les échanges constructifs sur l'étude menée au sein du laboratoire Frank Duncombe ainsi que les vétérinaires et les éleveurs pour leurs nombreux échanges sur cette pathologie.

#### Pour en savoir plus :

LEGRAND L., PITEL PH., FORTIER G., FREYMUTH F., PRONOST S. *Equine Influenza Virus: comparison of three methods, rapid tests, PCR and real-time PCR in a prospective study from November 2005 to June 2006 - Phylogenetic analysis of isolated strains. In proceeding 10th Congress of World Equine Veterinary Association. January 2008. Moscow (RUSSIA).* ZIENTARA S et DAUPHIN G. *La grippe des équidées.* [http://www.respe.net/internet/doc/18632\\_1grippegr.pdf](http://www.respe.net/internet/doc/18632_1grippegr.pdf). Mis à jour septembre 2003.  
WRIGHT FP, NEUMANN G, KAWAOKA Y. *Orthomyxoviruses in Fields Virology* (Knippe DM, Howley PM, Griffin DE), fifth edition, chapter 48, pp. 1691-1740  
CRAWFORD PC, DUBOVI EJ, CASTLEMAN WL, STEPHENSON I, GIBBS EP, CHEN L, SMITH C, HILL RC, FERRO P, POMPEY J, BRIGHT RA, MEDINA MJ, JOHNSON CM, OLSEN CW, COX NJ, KLIMOV AI, KATZ JM, DONIS RO. *Transmission of equine influenza virus to dogs. 2005 Sciences 310; pp. 482-5*

## Grippe équine : QUELLES MÉTHODES DE DIAGNOSTIC À L'HEURE ACTUELLE ?

**Le virus de la grippe dont le nom viendrait du francique gripan : saisir (que l'on retrouve dans le mot agripper) saisit sa victime en pleine santé, sans crier gare. C'est ce que l'on observe dans différentes espèces où il sévit avec un impact économique non négligeable ; chez le cheval, le porc, les oiseaux, d'autres espèces animales et l'homme bien sûr. La menace d'une pandémie relayée par les médias nous rappelle que ce virus est très contagieux et demeure un pathogène redoutable. Le franchissement des barrières d'espèces et sa grande faculté à évoluer dans le temps sont deux des éléments qui rendent ce virus redoutable. La présentation des différentes formes du virus de la grippe encore appelé Influenza (ce mot proviendrait de l'expression italienne « influenza di freddo : influence du froid) sont abordées dans l'article de Loïc LEGRAND (cf. article précédent).**

Nous présenterons dans cet article les méthodes de diagnostic utilisées en laboratoire. Ces techniques ne diffèrent pas suivant que l'on recherche un virus grippal équin, aviaire ou humain. Il est même essentiel que les acteurs de ces différents secteurs de la santé échangent leurs données face à ce virus qui peut passer d'une espèce à une autre, le dernier exemple en date étant le passage de l'espèce équine à l'espèce canine en 2004.

### HISTORIQUE

La grippe équine a été reconnue pour la première fois au cours d'une grande épidémie en Europe de l'est en 1956 (la souche du virus porte désormais le nom : virus A /Eq/Prague/56) et demeure depuis une des maladies respiratoires les plus pénalisantes sur le plan économique pour la filière équine (courses, compétitions ventes,...). La vaccination grippale est devenue obligatoire en 1969 pour tous les chevaux présentés à

un concours ou une exposition, puis pour les chevaux de course (galop, steeple-chase, trot). La grippe équine est une maladie enzootique (maladie qui frappe une ou plusieurs espèces animales dans une région, soit d'une façon constante, soit à certaines époques déterminées) et seuls deux pays (l'Islande et la Nouvelle Zélande) demeurent indemnes depuis l'épidémie qui a sévi en Australie en 2007. La rapidité avec laquelle le virus s'est propagé dans ce pays rappelle qu'un diagnostic précoce et des

► mesures de protection rapides et adaptées sont indispensables pour faire face à cette maladie. Si l'Australie a été aussi fortement touchée, c'est qu'il s'agissait d'un pays jusqu'alors indemne et l'arrivée d'un virus dans un pays naïf a toujours à des conséquences importantes. Parallèlement, le fait que cette épidémie soit survenue en 2007 a permis aux autorités australiennes de bénéficier des derniers outils de détection pour mettre en place leur plan de lutte. Ce sont ces outils de diagnostic qui vont être présentés dans le présent article en montrant les avantages et les limites de chacun mais également en faisant le point sur ce qui est disponible aujourd'hui pour la filière française.

## DIAGNOSTIC

Rappelons tout d'abord que lorsqu'on parle de diagnostic, il existe le diagnostic direct qui permet de détecter le virus et le diagnostic indirect qui permet de détecter les traces du passage du virus ; il s'agit alors de techniques d'immunologie qui détectent les anticorps

antiviraux produits par l'organisme pour se défendre suite au passage du virus. On mesure tout de suite l'avantage des techniques directes qui permettent une détection rapide du virus sans attendre la production des anticorps. Parmi les techniques directes sur lesquelles nous insisterons dans cet article, certaines sont plus rapides que d'autres. Mais si la rapidité est essentielle, elle n'est pas la qualité première d'un test biologique. Celui-ci doit avant tout être performant en termes de spécificité et sensibilité, c'est-à-dire qu'il doit permettre de détecter le pathogène recherché sans ambiguïté mais également de pouvoir le déceler lorsque celui-ci est présent en faible quantité dans le prélèvement.

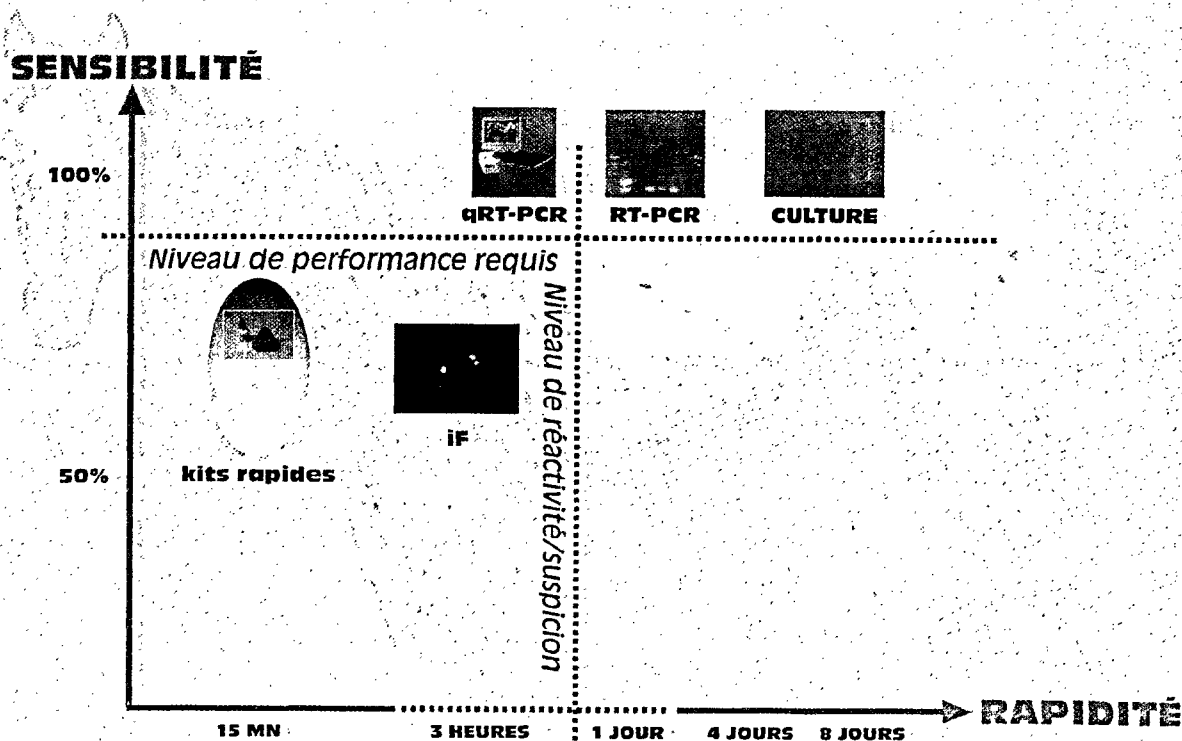
Avant de présenter les techniques de laboratoire, il est important de rappeler que le premier diagnostic est posé sur le terrain par l'observation de signes caractéristiques et en particulier de la forte contagiosité (cf. article précédent de Loïc Legrand). Mais ce diagnostic différentiel repose sur l'évolution de la maladie au sein de l'effectif et il n'est pas

toujours aisé de distinguer une infection à virus grippal d'une infection herpétique de celles d'une infection à virus herpès de type 1 ou 4 par exemple même si la contagiosité des virus herpès est généralement plus faible que celle du virus grippal. Il en est de même pour le virus de l'artérite virale sous sa forme respiratoire, mais ces observations ne peuvent constituer des généralités du fait de la variation de la virulence des différentes souches de virus. Le diagnostic devra reposer sur le recours au laboratoire.

**Le diagnostic des infections** dues au virus de la grippe repose sur l'isolement du virus à partir de chevaux en phase de maladie respiratoire aiguë ou sur la mise en évidence d'une réponse sérologique à l'infection. Elle peut aussi être déterminée par la détection de l'antigène viral (fraction protéique du virus) dans les sécrétions de l'appareil respiratoire à l'aide d'une méthode immuno-enzymatique ou par la détection de son matériel génétique (ARN viral) par les techniques de RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction).

SCHÉMA I

Avantages en terme de sensibilité et de rapidité des différentes méthodes spécifiques du diagnostic de la grippe équine





© LABORATOIRE F. DUNCOMBE

## Manipulations sur œufs embryonnés

### Isolement du virus grippal (culture)

L'isolement peut être réalisé à partir d'écouvillonnages nasaux ou de liquide de lavage nasal ou trachéal sur des œufs embryonnés de poule et/ou des cultures cellulaires (MDCK par exemple). Cette technique qui constitue la méthode de référence est très sensible mais peut nécessiter du temps ; en effet jusqu'à 5 passages successifs (chaque passage nécessite 3 à 4 jours) peuvent être nécessaires en cas de faible charge virale. Il est important de recevoir les échantillons aussitôt que possible après le début des signes cliniques. Ceux-ci sont adressés dans des milieux de transport adaptés sous couvert du froid.

### Détection de l'antigène viral par méthode immuno-enzymatique (ELISA)

L'antigène viral peut être détecté par un test ELISA de capture H3N8 utilisant un anticorps monoclonal. Cette technique permet de disposer de résultats rapides sur la base desquels il est possible de prendre des décisions et de gérer des situations. Elle ne doit pas remplacer l'isolement du virus, indispensable pour le suivi de l'évolution du virus et la mise à jour des vaccins. De plus, plusieurs kits de ce type ont été développés ces dernières années et tous ne présentent pas les mêmes caractéristiques. Parmi les tests les plus utilisés du fait de leurs performances, citons le kit DFA test (Becton DICKINSON, USA) et le test Espline (FURIJEBIO, Japon).

### Détection de l'antigène viral par méthode d'immuno-fluorescence (IF)

Les antigènes viraux peuvent être détectés par des techniques d'immunofluorescence qui présentent l'avantage d'être légèrement plus sensibles que la plupart des tests rapides commerciaux. Ce procédé est utilisé dans les hôpitaux pour le diagnostic chez l'homme mais moins pratiqué dans le cas du virus grippal équin.

### Détection des acides nucléiques du virus (ARN) par les techniques d'amplification génique (RT-PCR)

Ces techniques font partie de ce que l'on nomme les techniques de biologie moléculaire. Depuis la première décrite en 1991 pour la détection du virus grippal humain, de nombreuses méthodes ont été développées pour détecter les virus grippaux de différentes espèces dont le cheval. Il s'agit d'une mise en évidence directe du virus par la détection de son ARN. Ce dernier est amplifié *in vitro* un grand nombre de fois jusqu'à être détectable et visualisable. Cette technique d'amplification a par ailleurs connu au début des années 2000 une révolution avec l'arrivée d'une nouvelle génération de machines dites de « PCR en temps réel » qui ont permis un gain de temps, l'automatisation des tests, davantage de sécurité dans les process et parfois même un gain de sensibilité. Ce sont ces techniques alliant rapidité et sensibilité qui constituent les outils les plus

performants à l'heure actuelle. Elles nécessitent l'extraction du génome des virus mais cela présente un avantage pour le suivi épidémiologique des souches. Il est en effet possible de séquencer le génome extrait et de typer les souches. Toutefois, ces méthodes aussi performantes soient-elles ne pourront se substituer à la culture qui demeurera nécessaire pour la préparation des vaccins en particulier.

### Méthodes sérologiques

Si ces techniques sont toujours utilisées, en pratique sur le terrain elles ne sont pas adaptées à une réponse rapide. Les infections peuvent être mises en évidence à l'aide d'épreuves sérologiques sur des sérums prélevés à 15 jours d'intervalle montrant une élévation des titres d'anticorps. Il existe deux méthodes simples : l'inhibition de l'hémagglutination et l'hémolyse radiale, toutes deux également efficaces et largement utilisées. La fixation du complément peut aussi être utilisée. Ces techniques mettant en évidence les anticorps nécessitent un délai de réponse plus important et ne sont pas utilisées pour le diagnostic. Elles permettent néanmoins de contrôler la vaccination en surveillant le taux d'anticorps et sont parfois demandées par certains pays pour des exportations.

Ce tour d'horizon des méthodes de diagnostic de la grippe montre plusieurs choses. Tout d'abord, les technologies employées ne sont pas si différentes chez l'homme et dans le milieu vétérinaire en particulier chez le cheval. Il est cependant indispensable pour les laboratoires qui réalisent ces tests de s'assurer de leur bonne spécificité pour l'espèce équine. Une fois cette étape réalisée, le laboratoire dispose de toute une panoplie d'outils pour réaliser le diagnostic. Les dernières études publiées montrent que les performances de ces différents outils ne sont pas identiques mais qu'il est essentiel de choisir l'outil adapté à ce que l'on cherche. En effet pourquoi attendre plusieurs jours le résultat d'une culture, qui donnera le résultat certes le plus sensible, si l'on peut avoir un résultat dans l'heure qui suit l'arrivée du prélèvement au laboratoire avec un test ELISA rapide. A l'inverse, pourquoi chercher une réponse dans l'heure et risquer une perte de sensibilité si l'on peut obtenir la réponse sous 2 à 3 heures avec une sensibilité optimale comme le permet la technique de PCR en temps réel. ▶

► Le schéma 1 illustre les avantages en terme de sensibilité et rapidité des différentes techniques de diagnostic direct de la grippe équine disponibles à ce jour. Les exigences attendues en terme de sensibilité et de délai acceptable montrent que la PCR en temps réel (qRT-PCR) est l'outil qui offre le meilleur compromis à ce jour. Mais là encore, le laboratoire spécialisé doit maîtriser cet outil car il existe de multiples variantes de ce type de test allant des tests développés par les grandes firmes pharmaceutiques, aux tests des laboratoires de référence en passant par les tests développés par certains laboratoires eux-mêmes encore appelés « home tests ». Des travaux de normalisation sont actuellement en cours pour inciter les laboratoires à utiliser dans les meilleures conditions les tests les plus performants. Si cet ensemble de techniques a permis au gouvernement australien de faire face à l'épidémie de 2007 dans de bonnes conditions, ceux-ci ont surtout mis l'accent sur l'utilisation de l'outil

RT-PCR en temps réel. Une étude récente réalisée dans notre laboratoire dans des conditions terrain a permis de montrer qu'effectivement les tests qRT-PCR étaient plus sensibles que les tests de PCR classiques eux-mêmes plus sensibles que les tests ELISA rapides. ■

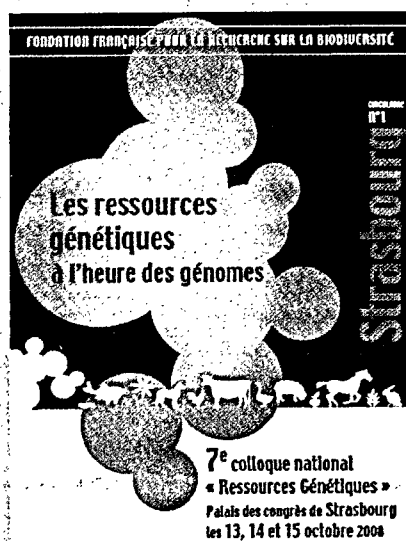
Stéphane PRONOST, Loïc LEGRAND,  
Pierre Hugues PITEL, Gaëlle MAZIERE,  
Guillaume FORTIER,  
Laboratoire Frank DUNCOMBE  
14053 CAEN cedex 4  
Christel MARCILLAUD PITEL, RESPE 223  
rue Pasteur 14120 Mondeville

#### Remerciements :

Les auteurs remercient leurs collègues du laboratoire de virologie du CHRU de Caen pour les nombreux échanges dans ce domaine ainsi que les éleveurs et les vétérinaires qui leur permettent d'évaluer sans cesse leurs tests en leur accordant leur confiance.

#### Pour en savoir plus :

THIRY E. *Virologie Equine des équidés Collection Virologie Clinique Le point Vétérinaire*  
LEGRAND L., PITEL PH., FORTIER G., FREYMUTH F., PRONOST S. *Equine Influenza Virus: comparison of three methods, rapid tests, PCR and real-time PCR in a prospective study from November 2005 to June 2006 - Phylogenetic analysis of isolated strains. In proceeding 10th Congress of World Equine Veterinary Association. January 2008. Moscow (RUSSIA).*  
ZIENTARA S. et DAUPHIN G. *La grippe des équidés.* [http://www.respe.net/internet/doc/18632\\_1grippegr.pdf](http://www.respe.net/internet/doc/18632_1grippegr.pdf). Mis à jour septembre 2003.  
VAN MAANEN C, CULLINANE A. *Equine influenza virus infections: an update. 2002 The Veterinary quarterly 24; pp. 79-94*



Il constituera l'une des toutes premières manifestations publiques de la fondation française pour la recherche sur la biodiversité. Cette fondation de coopération scientifique résulte de la fusion de deux groupements d'intérêts scientifiques (GIS) qui travaillent sur ces questions depuis plusieurs années : l'institut français de la biodiversité, et le bureau des ressources génétiques (cf. *équ'idée* 63 p.48).

## LES RESSOURCES GÉNÉTIQUES à l'heure du génome

Le 7<sup>ème</sup> colloque national « ressources génétiques » se déroulera les 13, 14 et 15 octobre 2008 au palais de congrès de Strasbourg.

Les communications s'articuleront autour des 4 thématiques suivantes :

- la vigne : génome et filières ;
- les développements méthodologiques : vers une nouvelle approche du vivant ;
- la nature de la diversité et processus de décision ;
- les systèmes d'information.

Deux forums sont également programmés le mardi après-midi :

- **Co-existence sauvage / domestique** : Quelles interactions entre diversité sauvage et domestique ? La nouvelle perception de la biodiversité pourrait permettre à ceux qui la gèrent de mieux bénéficier de cette interdépendance et ainsi d'affronter les menaces et défis de demain... ;

- **Politique des ressources génétiques** : L'organisation du colloque à Strasbourg constitue une opportunité pour confronter les compréhensions et vision de ressources génétiques et des politiques à mener entre acteurs de terrain et élèves de l'ENA, parlementaires et fonctionnaires européens...

Nul doute que les débats seront des plus enrichissants ! ■

Sophie DANVY

Pour en savoir plus : [www.brg.prd.fr](http://www.brg.prd.fr)