



Amélioration du diagnostic des encéphalites virales équine

Camille Migné¹, Sabine Delannoy², Sylvie Lecollinet¹, Delphine Gaudaire³, Jackie Tapprest³, Léna Yousfi⁴, Pierre Tritz⁵, Stéphane Pronost⁶, Sara Moutailler⁴ et Cécile Beck¹

¹ UMR 1161 ANSES, INRA, ENVA, Laboratoire ANSES de santé animale, site de Maisons-Alfort

² Plateforme IdentityPath, Laboratoire ANSES de sécurité des aliments

³ Unité PhEED, ANSES, Laboratoire ANSES de santé animale, site de Normandie

⁴ UMR BIPAR ANSES, INRA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est Laboratoire ANSES de santé animale, site de Maisons-Alfort

⁵ RESPE

⁶ LABÉO Frank Duncombe, EA7450 Biotargen UNICAEN, CAEN

Cecile.beck@anses.fr



Cheval avec ataxie des membres antérieurs et postérieurs (crédit : Dr Philippe Garcia)

Ce qu'il faut retenir

Les affections nerveuses se classent au 4^{ème} rang des causes de mortalité chez les équidés. L'origine de ces affections est multiple (malformations, traumatismes, infections, ...) et elles représentent un impact sanitaire majeur pour la filière équine. En France, la surveillance de ces pathologies est assurée par les vétérinaires cliniciens, le réseau d'épidémiologie-surveillance en pathologie équine (RESPE) et le réseau des laboratoires de diagnostic départementaux (LDA) et nationaux de référence (LNR). Une des fonctions de cette surveillance est de détecter le plus précocement possible l'émergence et/ou la résurgence de certains pathogènes zoonotiques (ex : Fièvre West Nile, Encéphalite japonaise, ...).

Nous avons développé et validé un nouvel outil de diagnostic moléculaire de RT-PCR temps réel à haut débit s'appuyant sur la technologie LightCycler1536® qui permet de détecter en un seul essai la majorité des virus responsables d'affections nerveuses chez le cheval. Le but de cette approche multi pathogènes est d'optimiser le diagnostic des méningo-encéphalites infectieuses équine. À terme, l'approche syndromique de cet outil améliorera la surveillance en France des affections nerveuses infectieuses équine.

1 Contexte et objectifs

Un syndrome nerveux est l'ensemble des symptômes liés à un dysfonctionnement du système nerveux d'origine centrale, périphérique ou neuromusculaire. Il peut se manifester par des modifications du comportement, de la posture, d'allures et/ou par des mouvements anormaux et une fonte des masses musculaires. Les affections nerveuses sont assez rarement diagnostiquées en pratique vétérinaire équine. Des études, datant pour certaines d'une quinzaine d'années, montrent pourtant que ces affections nerveuses représentent la quatrième cause de mortalité chez le cheval [1]. Parmi les causes d'affections nerveuses, les maladies infectieuses ou parasitaires arrivent en troisième position derrière les origines traumatiques et les malformations congénitales [2]. En particulier les virus responsables d'encéphalites équinnes sont importants à détecter, soit parce que ce sont des agents de zoonoses comme par exemple les virus West Nile (WNV) ou de la rage, soit parce qu'ils ont une importance économique majeure dans la filière équine (ex : herpèsvirus de type 1 (EHV1)), soit parce qu'ils sont à risque d'émergence, présentant de ce fait une menace potentielle pour l'Europe (cas par exemple des encéphalites équinnes de l'Est (EEEV), de l'Ouest (WEEV) et vénézuélienne (VEEV)) [3]. Cependant le diagnostic des méningo-encéphalites virales équinnes est d'une grande complexité en médecine vétérinaire du fait de symptômes non pathognomoniques de l'infection et d'un diagnostic de laboratoire ardu par manque de spécificité des tests sérologiques et d'une approche moléculaire ciblée par agent pathogène [4].

2 Méthode

Afin d'améliorer la surveillance des méningo-encéphalites virales équinnes en France, nous avons abordé la question sous un angle syndromique et mis au point une nouvelle approche diagnostique par PCR temps réel haut débit (Light Cycler [LC] 1536) qui peut effectuer jusqu'à 1536 réactions de PCR en un seul essai.

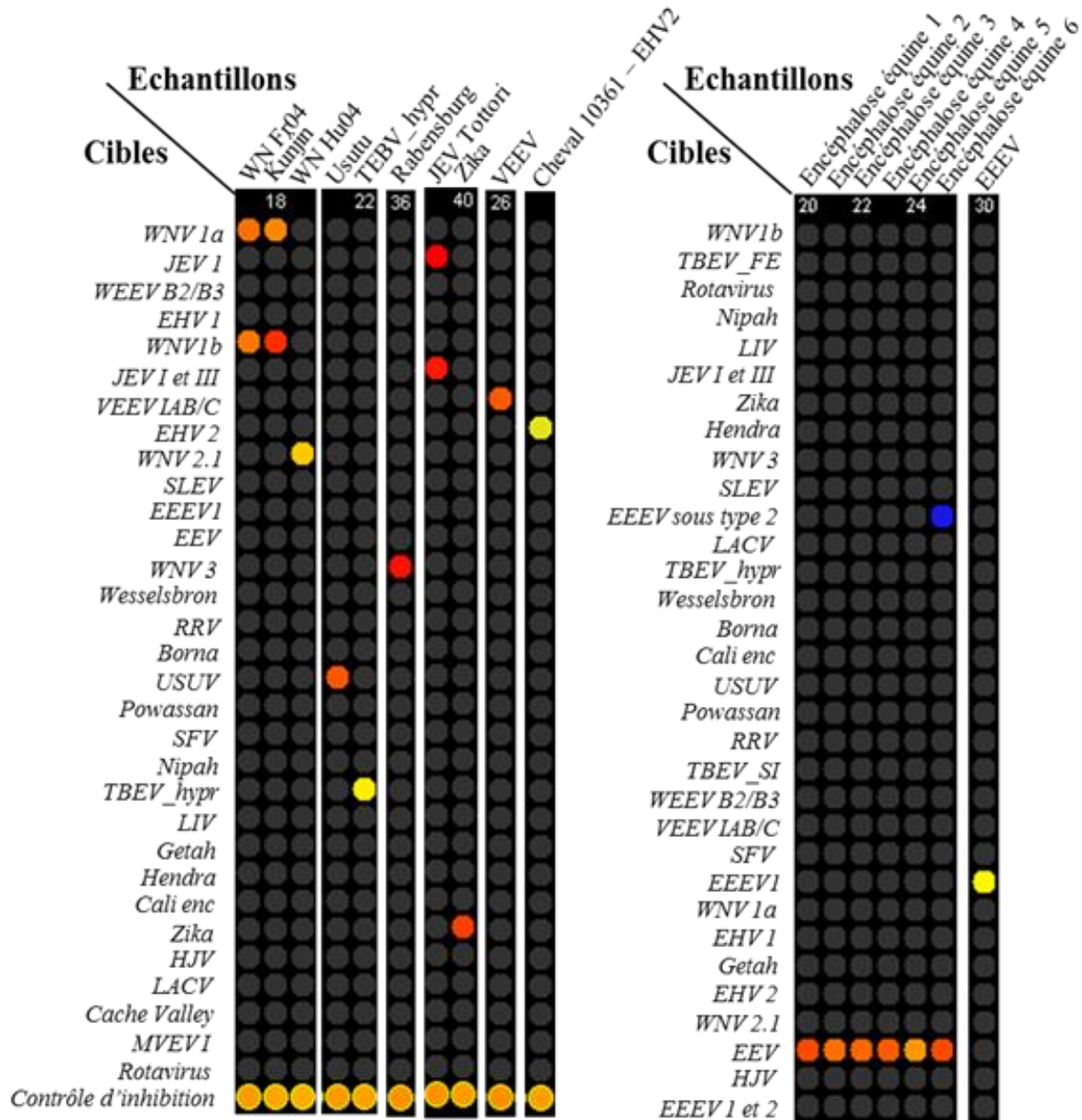
La majorité des virus responsables d'affections nerveuses ont été testés en PCR haut débit à l'aide de souches de référence : WNV de lignées 1,2 et 3, de l'encéphalite japonaise (JEV), encéphalites à tique (TBEV), Usutu (USUV), Zika (ZIKV), encéphalites exotiques (EEEV, VEEV et WEEV), encéphalose équine (EEV) et louping ill (LIV). Des génomes *in silico* pour les virus exotiques (Getah, Nipah, Highlands, Hendra, La Crosse, Cache Valley et encéphalite californienne) et des ARN/ADN transmis par des laboratoires partenaires du projet (Semliki Forest, Powassan, virus de Murrey Valley (MVEV), de l'encéphalite de saint louis (SLEV), Ross River, Wesselsbron, Rage, EHV1 et EHV4) ont permis d'évaluer les performances des PCR haut débit pour les virus correspondants. Nous avons aussi à notre disposition 4 échantillons terrain de chevaux morts d'encéphalite virale avec détection de génomes viraux dans le prélèvement d'encéphale (deux EHV de type 2 [EHV2], un WNV lignée 1 et un rotavirus,). Enfin tous les virus précédemment listés ont été recherchés par PCR haut-débit (LC1536) sur 36 échantillons terrains : 15 encéphales, 12 liquides céphalo-rachidiens et 9 écouvillons nasaux provenant de chevaux morts d'encéphalite et dont l'étiologie était inconnue.

3 Résultats

Le LC1536 a permis de détecter en un seul essai 28/30 des génomes viraux des souches de référence et des ADN/ARN fournis ou synthétisés. Les lignées 1 (WNV France 2004), 2 (WNV Hongrie 2004) et 3 (Rabensburg, souche non pathogène) de WNV ont été correctement discriminées (Figure 1).

Un défaut de détection a uniquement été noté pour les virus rabique et MVEV et un défaut de spécificité analytique observé pour les virus Highlands et Hendra. Sur les échantillons de terrain à étiologie connue, le génome du rotavirus, du WNV lignée 1 ainsi que l'EHV2 (pour un animal sur deux) ont été correctement détectés. Enfin, concernant les échantillons à étiologie inconnue, 35/36 prélèvements se sont révélés négatifs pour l'ensemble des virus testés. Le résultat positif concerne un EHV2 détecté sur écouvillon nasal et confirmé par PCR temps réel mono-cible. Des analyses complémentaires sont en cours pour confirmer ou infirmer le rôle de ce virus dans les encéphalites virales.

Figure 1 : Validation de couples amorces et sondes du LC1536 (cibles) sur des souches de référence (échantillons)



4 Applications pratiques

La technique de PCR à haut débit développée permet d'offrir une approche syndromique des affections nerveuses infectieuses chez les équidés et améliorera le diagnostic des pathologies équine inexplicées. Cette amélioration du diagnostic des encéphalites virales équine sera une aide précieuse à la détection d'une émergence ou de la résurgence d'un virus potentiellement zoonotique (ex : WNV, JEV, EEEV) et au suivi sanitaire de virus à importance économique majeure pour la filière (ex : EHV1).

5 Perspectives

Afin d'avoir un outil complet, investiguant tous les agents infectieux, la recherche des agents pathogènes neurotropes par PCR haut débit sera complétée avec les bactéries, parasites et protozoaires connus comme responsables de méningo-encéphalites ainsi que tout nouvel agent pathogène neurotrope découvert grâce à la technique de séquençage de nouvelle génération sans a priori (NGS)[5].



Cheval avec symptôme d'encéphalite (source : M. Long, Université de Floride)

6 Références

1. Tritz, P., et al., *Cheval suspect d'affection nerveuse d'origine infectieuse : de l'examen aux premières mesures sanitaires*. PRATIQUE VÉTÉRINAIRE ÉQUINE, 2014. N° Spécial Les maladies infectieuses chez les équidés adultes(chapitre 7): p. ISBN NSE201410.
2. Laugier, C. and J. Tapprest, *Fréquence de la pathologie nerveuse et de ses différentes causes dans un effectif de 4319 chevaux autopsiés*. Bull. Epidémio., 2012. 5(49): p. 9.
3. Durand, B., et al., *Identification of hotspots in the European union for the introduction of four zoonotic arboviroses by live animal trade*. PLoS One, 2013. 8(7): p. e70000.
4. Bahuon, C., et al., *Les encéphalomyélites virales : quels risques pour les équidés français ?* . le nouveau Praticien vétérinaire, 2014. 9(34): p. 12-20.
5. Lecollinet, S., et al., *Case investigation of unexplained infectious meningoencephalitis in animals - a new rotavirus in horses ?* 11th Annual meeting EPIZONE, Paris, 2017.