

JOURNÉES SCIENCES & INNOVATIONS ÉQUINES

20 ET 21 MAI 2021



www.ifce.fr



INRAE

RESPE

idete

hippola

VEF

IFCE

IFCE

SFET

INSEP

LeTROT

FCC

IFCE

FRANCE GALOP

IFCE



Thomas Thibault

Thomas a obtenu son doctorat en biologie moléculaire et cellulaire à l'université d'Orléans en 2012. Après deux post-doctorats effectués à l'étranger, il a rejoint l'équipe recherche et développement d'Enalees afin de créer des tests de diagnostic équin basés sur la technologie LAMP.

thomas.thibault@enalees.com

Partenaire(s)

Financier(s)

Technologie LAMP : amplification d'ADN au chevet de l'animal

Thomas THIBAUT¹, Laurine VALOT¹, Mégane SIMONNET¹, Delphine SCHIEB¹, Camille LAMARCHE¹, Laurent THIÉRY¹

¹ Enalees

Type de présentation : Poster – promotion de l'innovation¹

Ce qu'il faut retenir

La technologie LAMP (Loop mediated isothermal AMPLification) est une technologie récente d'amplification d'ADN qui, contrairement à la PCR, a l'avantage de se dérouler à température constante. Ceci permet l'utilisation d'un appareil moins onéreux et rend possible son utilisation pour le diagnostic lors d'une consultation vétérinaire.

Cette technologie a l'avantage d'être plus rapide, ce qui permet de prendre des décisions vétérinaires de façon plus précoce (isolement d'un animal, administration d'un traitement) et d'effectuer un suivi de la santé de l'animal.

La présence d'un contrôle endogène dans les kits LAMP déjà disponibles sur le marché permet de s'assurer de la qualité du prélèvement biologique.

Il est à noter que quel que soit le type de test d'amplification d'ADN utilisé (LAMP ou PCR), le vétérinaire doit absolument s'assurer qu'il effectue le bon type de prélèvement (Exemple : écouvillon nasopharyngé ou lavage ; suivre les recommandations du RESPE) en fonction du pathogène recherché.



Illustration de l'utilisation de la technologie LAMP. A gauche : lecteur isothermale de fluorescence. A droite : exemple de kit LAMP disponible sur le marché

¹ Posters issus de travaux de recherche et développement portés par des entreprises. Ces présentations ne constituent ni une promotion ni une validation de ces outils par l'IFCE ou ses partenaires.

1 Contexte et objectifs

Actuellement, les tests de diagnostic équin pour les maladies infectieuses sont réalisés :

- Soit par PCR, ce qui conduit à des résultats très sensibles mais nécessite l'envoi auprès de laboratoires spécialisés qui ne pourront donner un résultat qu'après un ou plusieurs jours (ce qui retarde le choix du traitement pour l'animal) ;
- Soit par la détection d'anticorps ou d'antigènes présents dans le sérum, ce qui a pour inconvénient la génération de résultats généralement moins spécifiques qu'en PCR.

Récemment, une nouvelle technologie d'amplification d'ADN, la technologie LAMP (Loop mediated isothermal AMPlification), est apparue sur le marché. Contrairement à la PCR, elle a l'avantage de se dérouler à température constante [1]. Ceci permet l'utilisation d'un appareil moins onéreux et rend possible son utilisation diagnostique lors d'une consultation vétérinaire.

Cette technologie a déjà été recommandée par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) pour le diagnostic de la tuberculose [2]. Plus récemment, le ministère de la santé en France a validé son utilisation pour le diagnostic de patients atteints du SARS-CoV-2 [3].

Il est ainsi possible d'utiliser cette technologie pour amplifier l'ADN de pathogènes au chevet du patient/de l'animal. Les travaux présentés auront pour objectif de montrer l'intérêt de la technologie LAMP appliquée au diagnostic équin.

1.1 Discrimination de EHV-1 et EHV-4 et intérêt d'une détection rapide pour éviter les épizooties

EHV-1 et EHV-4 sont deux virus très proches génétiquement qui sont responsables de la Rhinopneumonie chez les chevaux.

Les herpèsvirus sont très contagieux et se transmettent par les sécrétions nasales. Une infection par EHV-1 peut entraîner la mort du cheval. Il est ainsi utile de pouvoir identifier de façon très rapide quel type d'herpèsvirus peut contaminer un cheval afin de pouvoir l'isoler rapidement. Ceci est d'autant plus vrai lors de grands rassemblements de chevaux (du type rassemblement lié à une course hippique) afin de s'assurer très rapidement que les chevaux participants ne sont pas porteurs de ce type de virus.

1.2 Détection de EHV-2 et EHV-5 : intérêt du choix du prélèvement : écouvillon nasopharyngé ou lavage ?

EHV-2 et EHV-5 sont deux gamma herpèsvirus très proches génétiquement, responsables de troubles respiratoires à l'échelle individuelle avec peu de contagion rapportée⁴. Dans le cas d'une infection par EHV-2, de rares avortement ont été rapportés mais les épizooties sévères ont surtout été décrites chez les jeunes chevaux (5). Une contamination par EHV-5 a été associée au syndrome de fibrose multi-nodulaire pulmonaire (SFMP) qui se caractérise par une mauvaise condition physique, de la fièvre, de l'anorexie, une toux, un jetage nasal persistant et une détresse respiratoire [4,5].

EHV-2 et EHV-5 sont fréquemment détectés « au nez du cheval ». En effet, une publication [6] montre que lors d'un prélèvement nasopharyngé : 50% sont positifs à EHV-2, 63.4% sont positifs à EHV-5 et 40.1% présentent une co-positivité EHV-2/EHV-5. Ces pourcentages ne reflètent pas un taux d'infection réel mais tendent plutôt à montrer que ce virus est très présent dans l'environnement et peut donc être présent « au nez du cheval » sans pour autant être responsable d'une pathologie chez l'animal. C'est pour cette raison que le RESPE recommande de rechercher EHV-2 sur liquide de lavage trachéal et de rechercher EHV-5 sur liquide de lavage bronchoalvéolaire [4].

1.3 Intérêt de l'intégration d'un contrôle endogène lors d'un prélèvement nasopharyngé

Lors d'un prélèvement nasopharyngé sur un cheval présentant des troubles respiratoires, le potentiel pathogène responsable est prélevé et sera amplifié par la technologie LAMP. De plus, des cellules du cheval sont également prélevées puisque l'écouvillon est en contact avec la paroi nasopharyngée. Ainsi, si l'on amplifie par la technologie LAMP un gène spécifique du cheval, il est possible de vérifier que le prélèvement a bien été effectué. Il s'agit donc d'un contrôle endogène.

Or, de façon classique, les laboratoires de PCR utilisent un contrôle exogène : il s'agit d'un ADN synthétique ajouté à l'exprimat issu de l'échantillon, qui permettra de vérifier que l'amplification d'ADN s'est bien déroulée. Or, cette technique ne permet pas de vérifier que le prélèvement a été correctement effectué. La conséquence est que si un prélèvement a été mal effectué, le rendu de résultat sera négatif alors que le pathogène est potentiellement présent mais non correctement prélevé, ceci conduisant donc à un résultat faux négatif.

A notre connaissance, seuls les tests commercialisés LAMP utilisent un contrôle endogène permettant ainsi la vérification du bon prélèvement lors d'un écouvillonnage nasopharyngé.

Les retours des utilisateurs des kits LAMP permettent donc d'estimer le taux d'erreur de prélèvement.

1.4 Discrimination de *Theileria equi*, *Babesia caballi* et *Anaplasma phagocytophilum*

Theileria equi, *Babesia caballi* et *Anaplasma phagocytophilum* peuvent être responsables du syndrome Piro-like chez le cheval. Si le Carbésia® est traditionnellement utilisé pour traiter la piroplasmose (infection par *Theileria equi* ou *Babesia caballi*), son utilisation pour traiter une anaplasmose (infection par *Anaplasma phagocytophilum*) n'est pas recommandée. La discrimination rapide du pathogène causant l'infection est alors utile. La technologie LAMP est parfaitement adaptée pour effectuer cette identification rapide.

2 Méthode

2.1 Discrimination de EHV-1 et EHV-4 et intérêt d'une détection rapide pour éviter les épizooties

Les retours des utilisateurs du kit d'aide au diagnostic des maladies respiratoires équines permettant la détection de EHV-1 et EHV-4 basé sur la technologie LAMP ont été étudiés.

2.2 Détection de EHV-2 et EHV-5, intérêt du choix du prélèvement : écouvillon nasopharyngé ou lavage ?

Des tests ont été effectués auprès de cinq cliniques vétérinaires partenaires afin d'évaluer l'efficacité d'un test LAMP détectant EHV-2 et EHV-5 sur prélèvement nasopharyngé ou sur lavage sur les mêmes chevaux.

2.3 Intérêt de l'intégration d'un contrôle endogène lors d'un prélèvement nasopharyngé

Les retours des utilisateurs des kits d'aide au diagnostic des maladies respiratoires équines basés sur la technologie LAMP ont été analysés. Le taux d'amplification du contrôle endogène par rapport au nombre de tests effectués a été évalué pour plusieurs cliniques.

2.4 Discrimination de *Theileria equi*, *Babesia caballi* et *Anaplasma phagocytophilum*

Les retours des utilisateurs du kit d'aide au diagnostic du syndrome Piro-like basé sur la technologie LAMP ont été analysés.

3 Résultats

3.1 Discrimination de EHV-1 et EHV-4 et intérêt d'une détection rapide pour éviter les épizooties

Pour créer un test LAMP, il est indispensable de designer six amorces spécifiques de la séquence d'ADN à amplifier. Ceci donne la particularité à la technologie LAMP de pouvoir amplifier l'ADN de façon très spécifique. Ainsi, les tests LAMP amplifiant les pathogènes EHV-1 et EHV-4 sont très spécifiques de leur cible. Cette spécificité a été confirmée par un laboratoire indépendant. Lors de la conception de ces tests LAMP ciblant EHV-1 et EHV-4, il a été montré que les limites de détection de ces tests étaient en adéquation avec ce qui est attendu pour ce type de test amplifiant l'ADN (cf. poster présenté aux JSIE en 2019). Ceci indique que les sensibilités de ces tests sont bonnes. Après deux ans d'utilisation sur le terrain, les retours effectués par les vétérinaires sont très satisfaisants, notamment grâce à la rapidité du test et sa facilité d'utilisation. La possibilité de tester rapidement l'animal apporte l'avantage de pouvoir prendre une décision d'isolement immédiate si cette mesure s'avère nécessaire, mais elle permet également d'apporter une aide au suivi de l'état de santé de l'animal jour après jour afin de voir si une infection se déclenche ou est en voie de guérison. Ce dernier point est à notre connaissance une première dans le diagnostic au chevet du cheval. Il s'agit d'une évolution importante qui peut être utile pour déterminer rapidement le statut infecté ou non d'un animal lors d'un rassemblement de chevaux de type course hippique.

3.2 Détection de EHV-2 et EHV-5, intérêt du choix du prélèvement : écouvillon nasopharyngé ou lavage ?

De nouveaux tests d'aide au diagnostic basés sur la technologie LAMP permettant la détection de EHV-2 et EHV-5 ont récemment été mis sur le marché. Préalablement à cette mise sur le marché, des tests ont été effectués auprès de cinq cliniques vétérinaires partenaires afin d'évaluer l'efficacité du test mais aussi pour évaluer le choix du prélèvement. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Résultats des tests détectant EHV-2 et EHV-5 selon le type de prélèvement sur 16 chevaux

	ENP	Lavage
EHV-2	5/16	1/16
EHV-5	5/16	1/16
Co-détection EHV-2+EHV-5	3/16	0/16

Pathogène détecté (Herpèsvirus-2 (EHV-2), Herpèsvirus-5 (EHV-5), co-détection EHV-2/EHV-5) chez 16 chevaux selon le type de prélèvement effectué (Ecouvillon NasoPharyngé (ENP) ou Lavage (trachéal, des poches gutturales ou broncho-alvéolaire)).

Ces résultats confirment que les résultats obtenus sur ENP ou sur lavage sont différents et montrent l'intérêt de choisir le bon type de prélèvement lors de la recherche d'un pathogène. Par conséquent, pour EHV-2 et EHV-5, le lavage correspond au meilleur prélèvement possible pour la détection significative du pathogène, comme l'indique le RESPE.

3.3 Intérêt de l'intégration d'un contrôle endogène lors d'un prélèvement nasopharyngé

Les retours des utilisateurs des kits d'aide au diagnostic des maladies respiratoires équines basés sur la technologie LAMP ont été analysés. Le taux d'amplification du contrôle endogène par rapport au nombre de tests effectués a été évalué pour plusieurs cliniques. Il est apparu que ce taux est très variable selon les cliniques, allant d'un taux d'amplification de 70% à 100%.

Ainsi, pour les cliniques ayant un taux d'amplification du contrôle positif de 70%, ceci signifie que 30% de leurs prélèvements sont inexploitable : que ce soit par technologie LAMP (dans ce cas, l'utilisateur sait immédiatement qu'il doit refaire le prélèvement) ou par technologie PCR (dans ce cas, l'utilisateur recevra un résultat négatif pour le pathogène testé, ce qui ne sera pas forcément représentatif de la réalité et pourrait même l'induire en erreur concernant le traitement à administrer à l'animal).

Pour les cliniques ayant un taux d'amplification plus élevé, l'amplification du contrôle endogène par technologie LAMP permet la vérification immédiate de la qualité du prélèvement et permet à l'utilisateur de refaire immédiatement le prélèvement en cas de nécessité.

3.4 Discrimination de *Theileria equi*, *Babesia caballi* et *Anaplasma phagocytophilum*

La possibilité de pouvoir tester rapidement l'animal apporte l'avantage de pouvoir connaître le traitement adéquat immédiatement mais permet également de pouvoir effectuer un suivi de l'état de santé de l'animal jour après jour afin de voir l'évolution de la pathologie. Ce dernier point est à notre connaissance une première dans le diagnostic au chevet du cheval.

4 Conclusions et applications pratiques

La technologie LAMP permet, comme la PCR, d'amplifier l'ADN d'un pathogène. Cette technologie a l'avantage d'être plus rapide, ce qui permet de prendre des décisions vétérinaires de façon plus précoce (isolement d'un animal, administration d'un traitement). La présence d'un contrôle endogène dans les kits LAMP disponibles sur le marché permet de s'assurer de la qualité du prélèvement, ce qui n'est pas garanti par les laboratoires de PCR classiques. Il est à noter que, quel que soit le type de test d'amplification d'ADN utilisé (LAMP ou PCR), le vétérinaire doit absolument s'assurer qu'il effectue le bon type de prélèvement (Exemple : ENP ou lavage ; suivre les recommandations du RESPE) en fonction du pathogène recherché.

5 Pour en savoir plus

[1] Notomi, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**, E63 (2000).

[2] Global Tuberculosis Programme. *The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: policy guidance.* (2016).

[3] Plateforme COVID-19. <https://covid-19.sante.gouv.fr/tests>.

[4] Herpèsvirus équins de type 2 et 5 (HVE2 et HVE5) - Respe - Réseau d'Epidémiologie-Surveillance en Pathologie Équine. <https://respe.net/maladie-equine/respiratoire/herpes-virus-2-et-5/>.

[5] Pronost, S. *et al.* HERPÈSVIROSES DES ÉQUIDÉS: INTÉRÊTS ET LIMITES DES OUTILS DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE. *Bull. Académie Vét. Fr.* 305 (2011) doi:10.4267/2042/48101.

[6] Hue, E. S. *et al.* Detection and quantitation of equid gammaherpesviruses (EHV-2, EHV-5) in nasal swabs using an accredited standardised quantitative PCR method. *J. Virol. Methods* **198**, 18–25 (2014).

Thibault, T. *et al.* *Santé des équidés, Session 3. Nouveaux tests de diagnostic équin par amplification isotherme.* (IFCE, 2019).