

CRIBLAGE D'AGENTS INFECTIEUX RESPIRATOIRES AVIAIRES PAR PCR À HAUT DEBIT : PREMIÈRE APPLICATION À L'ÉTUDE DE LA PATHOLOGIE RESPIRATOIRE DE LA DINDE

**Croville Guillaume¹, Senet Alexis¹, Foret Charlotte¹, Ducatez Mariette¹,
Kichou Faouzi², Mouahid Mohammed² et Guérin Jean-Luc¹**

¹Université de Toulouse, INP, ENVT and INRA, UMR 1225, 31076 Toulouse

²Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, MAROC

g.croville@envt.fr

RÉSUMÉ

Les syndromes respiratoires (SR) sont parmi les maladies les plus fréquemment rencontrées en élevage et peuvent être associés à des syndromes de type « chutes de pontes » chez les volailles reproductrices, avec des pertes en production d'œufs et de poussins d'un jour. Les metapneumovirus aviaires, *Mycoplasma spp*, *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) et ou *Escherichia coli* sont considérés comme des agents majeurs responsables de SR. Les virus Influenza aviaires faiblement pathogènes et *Aspergillus sp.*, *Pasteurella multocida* ou *Chlamydia psittaci* peuvent aussi être rencontrés lors d'épisodes respiratoires chez la dinde.

Un outil innovant de PCR quantitative en temps réel (RTqPCR), basé sur la technologie nanofluidique, a été développé pour la détection d'agents pathogènes respiratoires de la volaille : 22 agents (virus, bactéries et champignons) associés à des infections respiratoires de la volaille ont été ciblés. Les amorces de PCR ont ensuite été appliquées à la RTqPCR nanofluidique (Biomark, Fluidigm). L'originalité de cet outil repose sur sa capacité à cribler jusqu'à 96 échantillons contre 96 couples d'amorces en une seule réaction de RTqPCR.

Des écouvillonnages trachéaux de dindes effectués en France et au Maroc entre 2011 et 2013 dans des élevages présentant des SR ont été soumis à une analyse par RTqPCR Biomark. En parallèle d'une présence systématique d'*E. coli*, ce criblage a notamment mis en évidence de fréquentes infections à metapneumovirus aviaire, *Mycoplasma gallisepticum* et *M. synoviae*, avec des profils de co-infections différents entre la France et le Maroc.

ABSTRACT

Screening of avian respiratory pathogens using a high-throughput real-time PCR platform: application to respiratory pathology of turkey

Respiratory syndromes (RS) are among the most prevalent pathological conditions in farm animals and are also associated with egg-drop syndromes in layers and breeders with losses in both egg and day-old-chick production. Avian metapneumoviruses, *Mycoplasma spp.* *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) and/or *Escherichia coli* are considered as key co-infectious agents of respiratory syndromes. Low pathogenic avian influenza viruses and *Aspergillus sp.*, *Pasteurella multocida* or *Chlamydia psittaci* may also be involved in respiratory outbreaks in turkeys. An innovative quantitative PCR method, based on a nanofluidic technology, was applied to the detection of avian respiratory pathogens: 22 respiratory pathogens (viruses, bacteria and aspergillus) associated with respiratory infections of poultry were targeted. These primers were subsequently used in a high throughput PCR nanofluidic platform (Biomark, Fluidigm®). The singularity of this tool relies on its ability to screen up to 96 samples with 96 pathogen-specific PCR primers, at the same time, in one RTqPCR run. Tracheal swabs were sampled from 2011 to 2013 on turkey flocks facing respiratory syndromes and submitted to this screening assay. Beside systematic detection of *E. coli*, this screening showed frequent infections of turkeys by avian metapneumovirus, *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* with distinctive co-infection patterns between French and Moroccan samples.

INTRODUCTION

Les syndromes respiratoires (RS) sont parmi les plus fréquemment rencontrés en élevage de volailles de chair. Ils sont critiques en fin de croissance chez le poulet et la dinde de chair. Ils sont aussi associés à des syndromes de type « chute de pontes » chez les volailles reproductrices, avec des pertes en production d'œufs et de poussins d'un jour. Chez les volailles de chair, les syndromes respiratoires n'impactent pas seulement la croissance et la viabilité des animaux, mais mènent également à des arthrites bactériennes secondaires. Les métapneumovirus aviaires, *Mycoplasma spp.*, *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) et/ou *Escherichia coli* sont considérés comme des agents majeurs responsables de syndromes respiratoires. Les virus Influenza aviaires faiblement pathogènes et *Aspergillus sp.*, *Pasteurella multocida* ou *Chlamydia psittaci* peuvent aussi être rencontrés lors d'épisodes respiratoires chez la dinde.

La détection simultanée de plusieurs agents infectieux dans un même échantillon est un enjeu diagnostique majeur, notamment en pathologie respiratoire (Hu et al, 2011 ; Xie et al, 2014).

Un outil innovant de PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative en temps réel (RT-PCRq), basé sur la technologie nanofluidique, a été développé pour la détection d'agents pathogènes respiratoires de la volaille : plus de 20 agents (virus, bactéries et champignons) associés à des infections respiratoires de la volaille (poulets, dindes ou canards) ont été ciblés; des réactions de RT-PCRq SYBR Green individuelles ont été réalisées pour chaque agent, afin d'optimiser la sensibilité et la spécificité de l'outil. Les amorces de PCR ont ensuite été appliquées à la RT-PCRq nanofluidique (Biomark, Fluidigm).

Des écouvillonnages trachéaux de dindes ont été effectués en France et au Maroc entre 2011 et 2013 dans des élevages présentant des syndromes respiratoires. Ces prélèvements ont ensuite été soumis à une analyse par RT-PCRq Biomark®.

MATERIEL ET METHODES

Recrutement des cas

Les prélèvements ont été effectués sur des lots de dindes de chair inclus sur les critères suivants : (1) troubles respiratoires observés depuis moins de cinq jours ; (2) au moins 10% du lot affecté ; (3) lot n'ayant pas reçu un traitement antibiotique depuis l'identification des signes cliniques et depuis au moins une semaine. Un écouvillonnage trachéal était effectué sur 5 à 20 sujets présentant des signes cliniques respiratoires. Les écouvillons ont été acheminés sous froid positif dans un délai de 24 heures vers un congélateur -80°C en attente des analyses. Un questionnaire était renseigné à l'occasion de chaque prélèvement, afin de relever les

caractéristiques de l'élevage et l'historique sanitaire du lot.

Extraction des acides nucléiques et transcription inverse.

L'extraction des ADN et ARN a été réalisée à l'aide d'un kit commercial (Total RNA isolation, NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel), les acides nucléiques ont été élués dans 50µL d'eau nanopure puis conservés à -80°C.

Une transcription inverse aléatoire a été effectuée sur les ARN avec le kit RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) selon les recommandations du fabricant.

Sélection de couples d'amorces et validation en PCR quantitative en temps réel SYBR Green sur des génomes de référence

Les amorces ont été sélectionnées dans la littérature existante ou dessinées dans le cadre de cette étude, à l'aide du logiciel Primer3®, sur la base d'un alignement de séquences disponibles dans les banques de données publiques.

Le tableau 1 liste les agents pathogènes et les gènes ciblés. Les couples d'amorces choisis en première intention ont été testés par RT-PCRq en utilisant le kit SYBR Green I Master (Roche), selon les recommandations du constructeur sur un thermocycleur Light Cycler 480 (Roche). Les matrices de référence ont également fait l'objet de clonages en bactéries compétentes et les plasmides extraits ont été utilisés pour constituer les gammes de quantification plasmidiques.

PCR quantitative en temps réel Biomark®

Les plaques de PCR nanofluidique utilisées dans cette étude sont dites « 96x96 », soit 96 échantillons criblés par 25 couples d'amorces en triplicat les réactions (dans une optique de validation de l'outil).

Les puits dédiés aux amorces contenaient 5 µL d'un mélange constitué de (1) 2 µL de chaque amorce (concentration initiale de 20 µM) et de (2) 6 µL d'un pré-mélange contenant 440 µL de 2X Assay Loading Reagent et 220 µL de TE (tampon low EDTA : 10mM Tris-HCl et 0,1 mM EDTA). Les puits dédiés aux échantillons contenaient 5 µL d'un mélange constitué de (1) 2 µL de matrice et (2) 6 µL d'un pré-mélange contenant 440 µL de 2X TaqMan Gene Expression Master Mix, 44 µL de 20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent, 44 µL de 20X EvaGreen et 132 µL de TE.

Enfin, lors de la réaction de PCR nanofluidique, les canaux de la plaque convergeant, 6,3 nL d'échantillon et 0,3 nL du mélange d'amorces vont constituer la réaction de PCR dans la chambre réactionnelle.

La PCR consistait en une dénaturation initiale de 10 minutes à 95°C suivie de 35 cycles composés d'une

étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C puis d'une étape commune d'hybridation des amorces et d'amplification par la polymérase de 60 sec à 60°C.

Analyse des résultats

L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel Fluidigm Real-Time PCR Analysis version 4.1.2.

Les échantillons ont été considérés positifs ou négatifs sur la base (1) du profil de la courbe d'amplification, (2) de la température de fusion des amplicons de PCR qui doit correspondre à celle du témoin positif et (3) de la quantification réalisée grâce à un plasmide de référence.

RESULTATS ET DISCUSSION

Validation du test PCR biomark

La sélection de couples d'amorces de référence a consisté à déterminer les séquences cibles pertinentes, spécifiques de l'agent pathogène ciblé. À l'issue de la phase de validation des couples d'amorces de PCRq, 25 couples d'amorces, correspondant à 22 agents infectieux, ont été sélectionnés et validés sur la plateforme Biomark® sur des acides nucléiques extraits de matériel biologique de référence et de produits de PCR clonés correspondant à chaque cible (Tableau 1).

Analyse de prélèvements clinique sur des lots de dindes

Après cette phase de validation de la plateforme de PCR Biomark, 88 échantillons, correspondant à neuf lots de dindes de chair françaises (Région Pays de la Loire) et 88 échantillons, correspondant à cinq lots de dindes de chair marocaines (Région de Rabat - Témara), ont été soumis à l'analyse.

Un exemple de résultat est présenté sous forme de « heat map » dans la Figure 1 : pour chaque échantillon analysé, une analyse très rapide permet d'identifier les cibles pour lesquelles un signal positif est détecté et pour les réactions positives, d'estimer le Ct (le Ct est le nombre de cycles correspondant au franchissement du seuil de positivité).

Le Tableau 2 représente la répartition des co-infections, exprimée pour chaque lot analysé (14 lots au total, dont neuf français et cinq marocains).

La détection de *E.coli* est systématique, comme attendu et la combinaison des couples d'amorces inclus dans le test de criblage a permis de génotyper et de mettre ainsi en évidence une grande majorité de *E. coli* de génotype B2 (données non montrées ; Clermont et al, 2000).

En plus d'une présence systématique d'*E. coli*, ce criblage a notamment mis en évidence des infections à metapneumovirus aviaire, *Pasteurella multocida*,

Mycoplasma gallisepticum, *M. synoviae*, voire à *Riemerella anatipestifer*.

Certains résultats, comme la détection de virus de la laryngotrachéite infectieuse (ILTV) chez la dinde, sont moins attendus et mériteront une étude approfondie (Portz et al, 2008).

La détection très fréquente de PMV-1 chez les dindes doit être reliée à la persistance de virus vaccinal. Le séquençage des produits de PCR PMV-1 sur ces échantillons a confirmé que les virus détectés sont de type vaccinal (données non montrées).

La technique employée dans cette étude repose sur la PCR quantitative en temps réel. L'intérêt majeur de cet outil réside dans (1) sa sensibilité (limite de détection fixée à moins de 100 copies de génome par échantillon), (2) sa reproductibilité et (3) sa spécificité par l'utilisation de la température de fusion qui est une valeur propre à chaque cible de PCR.

Avant leur application en RT-PCRq nanofluidique, chaque couple d'amorces a été validé en interne par RT-PCRq sur LightCycler 480 (Roche) ; ces expériences ont en outre permis de valider le fonctionnement de chaque couple d'amorces à une température d'hybridation de 60°C (contrainte imposée par la technologie Biomark®), de confirmer l'absence de réactions croisées, de valider les matrices de contrôle, de mettre au point les gammes plasmidiques de quantification et de déterminer la température de fusion de chacune des cibles.

Le criblage des échantillons sur la plateforme Biomark® a été validé grâce aux matrices de contrôle et une semi-quantification absolue a pu être réalisée grâce aux plasmides de référence contenant les séquences cibles.

En plus des avantages de la PCR quantitative en temps réel, la RT-PCRq nanofluidique présente l'intérêt de pouvoir cribler respectivement de 48 à 96 échantillons contre 48 à 96 couples d'amorces en une seule réaction de RT-PCRq (soit 2304 ou 9216 réactions simultanées), dans des volumes réactionnels de l'échelle du nanolitre, ce qui permet de limiter les volumes de prise d'essai.

Perspectives

Cet outil diagnostic pourra être utilisé à plus grande échelle pour décrire les co-infections respiratoires chez les volailles, en tant qu'outil de surveillance épidémiologique.

La sélection d'amorces incluses dans le test est évolutive : certains couples d'amorces seront ajoutés dans un avenir proche, afin d'affiner et compléter le spectre de détection en fonction du contexte épidémiologique et de l'émergence de nouveaux agents ou de leurs variants.

Cet outil se positionne en complément de la PCR temps réel d'une part, et du séquençage à haut débit, utilisé pour la détection sans *a priori* de pathogènes non connus d'autre part.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hu Q., Tu J., Han X., Zhu Y., Ding C. et S. Yu, 2011. J. Microbiol. Methods. 87, 64–69.
2. Clermont O., Bonacorsi S. et E. Bingen, 2000. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4555–4558.
3. Portz C., Beltrao N., Furian T.Q., Junior A.B., Macagnan M., Griebeler J, Carlos, Lima Rosa A.V., Colodel E.M., Driemeier D, Back A., Barth Schatzmayr O.M. et C. Wageck Canal, 2006. Vet. Microbiol. 131 (2008) 57–64.
4. Xie Z, Luo S, Xie L, Liu J, Pang Y, Deng X, Xie Z, Fan Q, Khan M. J Virol Methods 207 (2014) 188–195.

Tableau 1 – Liste des agents pathogènes recherchés et gènes ciblés.

Agents pathogènes cibles	Gènes ciblés
Virus influenza A	M
H1	HA
H5	HA
H6	HA
H7	HA
H9	HA
aMPV ¹	G
PMV-1 ²	F
IBV ³	N
ILT ⁴	UL15a
ARN16S bactérien	16S
ARN16S <i>Archaea</i>	16S
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	16S
<i>M. synoviae</i>	16S
<i>Chlamydia psittaci</i>	Ribospacer
<i>Bordetella avium</i>	Fimbrial subunit gene
<i>Escherichia coli</i>	GadA
<i>E. coli</i>	ChuA
<i>E. coli</i>	YjaA
<i>E. coli</i>	TspE4C2
<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	DNA Gyrase A
<i>Pasteurella multocida</i>	Gyrase B
<i>Riemerella anatipestifer</i>	Gyrase
<i>Avibacterium paragallinarum</i>	Unknown gene
<i>Aspergillus spp.</i>	18 S

¹ Metapneumovirus aviaire. ² Paramyxovirus de type 1. ³ Virus de la bronchite infectieuse.

⁴ Virus de la laryngotrachéite infectieuse

Tableau 2 Répartition des co-infections, pour chaque lot échantillonné en France (F-x) et au Maroc (M-y).

	M	ILT	PMV1	aMPV	MG	MS	PM	RA	ORT	Asp Fum	coli A	coli D	coli E	coli F
F-1		4/9	7/9	5/9		5/9			4/9	9/9	6/9	9/9	4/9	9/9
F-2			1/3	1/3		2/3				3/3	3/3	3/3		3/3
F-3			8/12	2/12		11/12				12/12	11/12	11/12	1/12	7/12
F-4			2/9			2/9			4/9	9/9	1/9	7/9		7/9
F-5			6/11	8/11	10/11	8/11			5/11	11/11	9/11	11/11	10/11	10/11
F-6			2/8	6/8	6/8	4/8			2/8	8/8	6/8	8/8	5/8	8/8
F-7			9/15		7/15			3/15		15/15	3/15	10/15	7/15	7/15
F-8		1/10		10/10	6/10	8/10	1/10			10/10	5/10	9/10	4/10	3/10
F-9		11/11							11/11	10/11	11/11	11/11	11/11	11/11
M-1			1/15	12/15	3/15		13/15		8/15	15/15	11/15	15/15	4/15	11/15
M-2			3/14	1/14	12/14	3/14	14/14		3/14	14/14	11/14	12/14	4/14	11/14
M-3				6/15	15/15		10/15		3/15	15/15	13/15	15/15	10/15	15/15
M-4			7/28	2/28					7/28	28/28	14/28	21/28	11/28	17/28
M-5					1/5					5/5	1/5	4/5	5/5	2/5

M : virus Influenza, gène de matrice, ILT : laryngotrachéite infectieuse, PMV : paramyxovirus, aMPV : Metapneumovirus aviaire, MG : *Mycoplasma gallisepticum*, MS : *Mycoplasma synoviae*, PM : *Pasteurella multocida*, RA : *Riemerella anatipestifer*, ORT : *Ornithobacterium rhinotracheale*, AF : *Aspergillus fumigatus*, Coli : *Escherichia coli*. Résultats exprimés sous la forme n échantillons positifs / n échantillons analysés.

Figure 1. Exemple de résultats de PCR quantitative en temps réel nanofluidique. La première ligne représente les cibles recherchées, la première colonne représente les échantillons. Plus la couleur est proche du jaune, plus le Ct est bas, plus l'échantillon présente une charge élevée en cible. Résultats issus de cinq élevages français, donnés à titre d'illustration. Les lignes sont nommées selon le numéro de l'élevage (chiffre) et la référence de l'échantillon (lettre).

