

## CHAPITRE 2.1.2.

# PROGRÈS DE LA BIOTECHNOLOGIE DANS LE DIAGNOSTIC DES MALADIES INFECTIEUSES

---

## INTRODUCTION

*Les méthodes modernes de production animale et l'accroissement des échanges mondiaux nécessitent de développer des plateformes diagnostiques d'alerte précoce, des capacités à l'échelle mondiale, des épreuves efficaces et d'harmoniser le travail de diagnostic en vue d'améliorer la productivité et la santé animales et de faciliter le commerce d'animaux en bonne santé, ce qui doit servir de base à l'initiative mondiale Une seule santé.*

*Le risque que les agents pathogènes voyagent d'un pays à l'autre, voire d'un continent à l'autre, a considérablement augmenté ces dernières années, en raison de différents facteurs : augmentation des déplacements nationaux et internationaux de personnes, d'animaux, de denrées alimentaires, de produits destinés à l'alimentation des animaux et de biens de consommation divers ; changement climatique, à l'origine de nouveaux scénarios et de nouvelles menaces épidémiologiques. Ce nouveau contexte met en évidence la nécessité de développer et d'utiliser toutes sortes de méthodes diagnostiques puissantes et novatrices, à même de détecter très rapidement les agents pathogènes se propageant et dotées d'une spécificité et d'une sensibilité diagnostiques élevées.*

*L'objectif de ce chapitre est de donner des informations générales et actualisées sur les principales méthodes biotechnologiques actuellement utilisées dans nos laboratoires diagnostiques. Pour de plus amples informations, deux numéros de la Revue scientifique et technique de l'OMSA consacrés aux biotechnologies et au diagnostic des maladies animales sont disponibles sur le site Internet de l'OMSA. (<https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/publications/revue-scientifique-et-technique/> ; *Utilisations potentielles de la génomique des agents pathogènes*: Volume 35, Numéro 1, 2016; *La biotechnologie appliquée à la santé et la production animales*: Volume 24, Numéro 1, 2005).*

## A. TECHNIQUES DE DETECTION ET D'ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES

Les avantages considérables de la détection directe et de l'amplification de séquences spécifiques d'acides nucléiques présentes dans le génome des agents pathogènes ont été démontrés. Les technologies basées sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont révolutionné le diagnostic des maladies infectieuses. Les plateformes d'amplification de l'ADN sont extrêmement sensibles, spécifiques, rapides et robustes. Elles sont en outre d'un bon rapport coût/efficacité et susceptibles d'être automatisées, donc idéales pour le criblage à haut débit. Les équipements requis s'adaptent facilement à la détection de nombreuses cibles différentes, même si la qualité des échantillons est cruciale pour le succès de l'emploi de ces technologies.

### 1. Extraction des acides nucléiques

Une étape initiale importante de la plupart des procédures de diagnostic moléculaire réside dans l'extraction de mélanges d'acides nucléiques purifiés à partir des échantillons cliniques. Alors qu'il est relativement facile d'extraire l'ADN du sang ou des cultures bactériennes, il est techniquement plus compliqué de préparer le matériel adéquat à partir des échantillons de terrain, tels que les fèces, les organes internes ou les fœtus avortés. L'attention portée au prélèvement des échantillons sur le terrain et à leur traitement dans le laboratoire lors de l'extraction des acides nucléiques est importante pour éviter une contamination croisée des échantillons, ce qui entraînerait des résultats faux positifs. C'est pour cette raison que l'extraction des acides nucléiques doit se faire selon des procédures de travail strictes, dans une salle séparée, à l'écart des procédures d'amplification de l'acide nucléique.

L'isolation et la purification de l'acide nucléique comportent trois étapes principales : désintégration des cellules, élimination des protéines et des contaminants et récupération de l'acide nucléique propice à l'analyse. Les méthodes d'extraction de l'acide nucléique sont nombreuses : extraction manuelle au moyen de phénol-chloroforme et de thiocyanate de guanidinium pour concentrer l'ADN dans une phase hydrophile, élution sur colonne de centrifugation lors de laquelle l'acide nucléique se lie à une phase solide (matrice en silice par exemple) et où les protéines sont éliminées par centrifugation, extraction sur billes magnétiques lors de laquelle l'acide nucléique se lie à des particules magnétiques tandis que les protéines sont lessivées. Même si les méthodes d'extraction peuvent varier en termes de rendement et de pureté des acides nucléiques ciblés, l'efficacité et la reproductibilité de l'extraction constituent des éléments essentiels de la détection des acides nucléiques et donc, de celle des agents pathogènes. La PCR, tout comme d'autres méthodes décrites ci-après, est à même d'amplifier et de détecter une cible spécifique, mais la qualité du matériau de départ reste un paramètre intrinsèque du processus de détection.

De nombreuses méthodes spécialisées d'extraction sont aujourd'hui disponibles dans le commerce sous forme de systèmes manuels ou automatiques pour postes de travail robotisés. Le développement et l'accessibilité des plateformes robotisées d'extraction permettent non seulement de minimiser le risque de contamination, mais aussi de traiter un grand nombre d'échantillons dans des conditions réactionnelles stables et avec un minimum de manipulations à effectuer par le technicien. Par conséquent, ces plateformes ont contribué à l'adoption du haut débit, donc à des épreuves de diagnostic solides, faisant passer le temps de traitement nécessaire par échantillon de plusieurs heures à quelques minutes (Belák *et al.*, 2009; Oberacker *et al.*, 2019). Elles doivent permettre d'améliorer la fiabilité de l'extraction des acides nucléiques à partir de différents échantillons, mais il s'agit encore d'un domaine où les défis sont de taille.

Comme méthode substitutive à l'extraction des acides nucléiques, les biotechnologistes se concentrent de plus en plus sur les polymérases résistantes aux inhibiteurs de la PCR et sur des épreuves d'amplification innovantes, désormais disponibles pour une amplification directe des acides nucléiques des échantillons pathologiques sans nécessiter d'extraction (Pavsic *et al.*, 2016).

## 2. Amplification en chaîne par polymérase (PCR) conventionnelle et PCR en temps réel

La PCR est un outil diagnostique extrêmement sensible et largement utilisé pour détecter les séquences d'acide nucléique spécifiques à un agent pathogène dans les tissus de l'hôte et dans les vecteurs. Ces 30 dernières années, la PCR a révolutionné le processus diagnostique, permettant la détection rapide, très sensible et très spécifique d'un large éventail d'agents pathogènes.

La PCR est en mesure d'identifier et d'amplifier une région cible d'un acide nucléique spécifique choisi à partir d'un mélange complexe de séquences hétérogènes (Saiki *et al.*, 1988). La PCR effectue une amplification *in vitro* en utilisant des mécanismes de réplication naturels de l'ADN, grâce à une succession cyclique d'incubations à différentes températures. L'amplification permet la détection de séquences de l'acide nucléique cible dans un échantillon, même si seul un petit nombre de cibles est présent à l'origine.

La PCR diagnostique est réalisée avec des acides nucléiques extraits d'échantillons cliniques. L'échantillon hétérogène d'ADN est d'abord dénaturé thermiquement pour séparer les deux brins complémentaires, produisant ainsi une matrice simple brin. Des amorces spécifiques sont ensuite utilisées pour identifier les régions qui seront ciblées par l'amplification. Les amorces sont de courtes molécules d'ADN de synthèse simple brin, complémentaires aux séquences cibles. Si la séquence cible est présente dans l'échantillon, les amorces s'apparient par appariement à ces régions, à mesure que la température du cycle redescend. Suite à cet appariement, le cycle entame une phase de température intermédiaire durant laquelle les amorces fixées permettent l'élongation de la séquence cible par l'ADN polymérase. Une fois que la polymérase a synthétisé un nouveau brin d'ADN complémentaire, le produit est séparé de la matrice par chauffage à une température plus élevée et le cycle reprend.

Ces cycles sont généralement répétés 35 à 50 fois pour permettre l'amplification des séquences d'ADN cibles. Chaque cycle a le potentiel de doubler le nombre de cibles issues du cycle précédent, menant à une augmentation exponentielle de l'ADN cible, ce qui confère sa sensibilité élevée à cette méthode. La clé de l'amplification de ces séquences par la PCR réside dans la sélection des oligonucléotides qui, une fois prolongés, vont générer des sites d'hybridation complémentaires pour l'extension des amorces lors des cycles ultérieurs. Pour détecter l'ARN (ex. : ARN viral), une copie d'ADN complémentaire (ADNc) à l'ARN doit d'abord être réalisée en faisant appel à la transcription inverse (*reverse transcription*, RT). L'ADNc sert ensuite de matrice pour l'amplification par la PCR. Cette technique est communément appelée RT-PCR (*reverse transcription PCR*).

Une fois amplifiée, la séquence cible peut être détectée. Les produits amplifiés sont généralement détectés à l'aide de méthodes qui contribuent à confirmer l'identité des produits de la PCR, dont :

- i) les méthodes qui définissent leur taille caractéristique (électrophorèse sur gel par exemple)
- ii) les sondes ADN (voir ci-dessous)
- iii) la fusion à haute résolution (voir paragraphe A.2.1)
- iv) les systèmes de détection basés sur la fluorescence (technologies en temps réel)
- v) les technologies de séquençage des nucléotides

Depuis l'introduction de techniques automatisées de séquençage en cycles, l'identification est de plus en plus souvent réalisée au moyen des techniques PCR et la caractérisation de l'agent par séquençage direct des produits de la PCR.

Pour fournir des résultats robustes et reproductibles, les protocoles de PCR doivent être soigneusement conçus, optimisés et entièrement validés. Le Chapitre 2.2.3 *Développement et optimisation des méthodes de détection de l'acide nucléique* fournit des conseils et des informations complètes sur ce type d'essais.

Afin d'augmenter son utilité dans les analyses diagnostiques vétérinaires et l'identification des agents pathogènes, la PCR a été largement modifiée au fil des années. La PCR traditionnelle qui nécessite une détection en point final de la réaction, typiquement par une électrophorèse sur gel d'agarose, a été largement supplantée par une détection en cours de réaction, à savoir la PCR en temps réel. Les variantes les plus courantes, les principaux avantages et les limites des technologies PCR sont résumées dans le Tableau 1.

**Tableau 1. Résumé des variantes couramment utilisées dans les techniques PCR, de leurs avantages et de leurs inconvénients**

La PCR: amplifie une région sélectionnée d'un acide nucléique dans un échantillon			
Variantes	Détails	Avantages	Inconvénients
PCR nichée	Deux PCR successives, la seconde amplifiant encore un fragment génomique pré-amplifié lors de la première PCR. Supplante de manière générale par la PCR en temps réel	Sensibilité élevée	Risque important de contamination car il ne s'agit pas d'un système fermé et des contaminations croisées ou des débordements peuvent survenir lors de la manipulation des produits amplifiés
PCR consensuelle	Cible une région génomique conservée dans un groupe d'agents pathogènes	Susceptible d'identifier des agents pathogènes nouveaux mais étroitement apparentés	Pas spécifique, peut nécessiter une caractérisation complémentaire
PCR en temps réel	Les résultats de l'amplification sont détectés en temps réel, par la fluorescence d'une sonde spécifique à une région. La quantification est possible, si des étalons dont le nombre de copies est connu sont utilisés dans l'essai (d'où son autre appellation de PCR quantitative)	Extrêmement sensible et extrêmement spécifique; risque moindre de contamination car le système est fermé et il n'y a pas de manipulations post-amplification	Coûts (sondes; plateforme). Risque de faux négatifs chez les agents à fort taux de mutation: des ensembles de sondes amorces peuvent être conçus, soit très spécifiques à la cible, soit universels pour détecter, des séquences conservées entre souches et lignées
PCR en temps réel multiplexe	Détecte simultanément plusieurs cibles	Permet le criblage de plusieurs agents pathogènes en un seul essai	Sa sensibilité peut être compromise. Le nombre de colorants fluorescents différents disponibles est un facteur limitant

## 2.1. Fusion haute résolution

Pour les organismes à ADN comme les parasites et les bactéries ainsi que pour les virus à ADN, l'utilisation de la fusion haute résolution (FHR) permet le génotypage des sous-types d'un agent pathogène à partir de différences dans leurs nucléotides. La FHR est une méthode d'analyse post-PCR permettant d'analyser la fusion (dissociation) des produits PCR en présence de colorants améliorés se fixant à l'ADN double brin. Comme la plupart des machines de PCR en temps réel ont intégré cette fonction, la FHR constitue une méthode d'un bon rapport coût/efficacité, aucune sonde marquée n'étant requise. Il est possible d'augmenter la spécificité et la précision du génotypage par les méthodes de FHR en utilisant des sondes non marquées pour interroger un segment court d'amplicon PCR portant la mutation ciblée. Les sondes non marquées doivent être bloquées à leur extrémité 3' pour éviter une élongation par la polymérase. Les techniques de FHR peuvent être utilisées dans un format simplexe ou multiplexe pour la détection et la différenciation simultanées d'espèces au sein d'un même genre (Banowary *et al.*, 2015; Gelaye *et al.*, 2013), pour le criblage de résistances aux médicaments (Loiacono *et al.*, 2017) ou pour le diagnostic différentiel (Gelaye *et al.*, 2017).

## 2.2. PCR par balisage de masse

Jusqu'à récemment, la détection de séquences cibles amplifiées dans une épreuve de PCR en temps réel reposait sur l'utilisation de nombreux produits chimiques comme les colorants intercalants, les sondes d'hydrolyse, les balises moléculaires (« molecular beacons »), le transfert d'énergie avec sonde-amorce (PriProET), les amorces Scorpion, l'hybridation de deux sondes et la ligature d'oligonucléotides marqués par des chromophores (Belák *et al.*, 2009). La disponibilité des méthodes de détection limitait le nombre de cibles différentes (et donc, de pathogènes différents) susceptibles d'être détectés simultanément par une PCR multiplexe. Les épreuves de PCR reposant sur le balisage de masse ont été développées pour pallier cette contrainte.

Dans une épreuve de PCR multiplexe reposant sur le balisage de masse, les différentes amorces sont marquées par des balises de poids moléculaires connus mais différents. Après l'amplification des fragments d'ADN ciblés, les balises sont libérées en utilisant une lumière UV, puis mesurées en utilisant la spectrométrie de masse. Cette approche permet la détection d'un éventail beaucoup plus large de cibles d'ADN amplifiées qu'il n'était possible jusqu'ici, car l'épreuve n'est pas limitée au nombre de colorants disponibles. L'utilisation de l'épreuve de PCR par balisage de masse a déjà prouvé son efficacité pour le diagnostic différentiel de maladies syndromiques (respiratoires, hémorragiques, agents pathogènes entériques, syndrome méningé) et pour la détection de nouveaux clades d'agents pathogènes (Lipkin, 2010). Une autre version de cette méthode fait appel à la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI), qui mesure directement les poids moléculaires des produits de PCR et les compare aux bases de données connues (Angeletti, 2017; Jang & Kim, 2018).

## 2.3. Digital PCR (dPCR)

Ces dernières années ont été témoins d'un regain d'intérêt pour l'utilisation de la PCR numérique (*digital PCR*, dPCR) avec laquelle des copies uniques d'ADN ou d'ARN cible sont isolées et amplifiées par PCR. Cette technique a été décrite pour la première fois dans les années 90 et a retrouvé un nouveau souffle grâce aux progrès de la chimie et à l'évolution des équipements. La caractéristique distinctive de la dPCR est la séparation du mélange réactionnel en milliers, voire en millions de fractions, suivie par la détection en temps réel ou en point final (PCR conventionnelle) de l'amplification. Les séquences cibles sont réparties dans les fractions selon le modèle de distribution de Poisson, permettant ainsi la quantification précise et absolue de la cible à partir du ratio de fractions positives sur l'ensemble des fractions à la fin de la réaction. Ceci dispense de l'utilisation de matériel de référence avec une concentration connue de cible et augmente, par rapport à la PCR en temps réel, la précision de la quantification à des concentrations de cible basses. La dPCR montre également une résilience supérieure aux inhibiteurs présents dans de nombreux types d'échantillons (Gutierrez-Aguirre *et al.*, 2015). Plusieurs articles de recherche concernant l'application de la dPCR à la détection et à la quantification des agents pathogènes des animaux, tels que le virus de la peste porcine africaine ou celui de la maladie d'Aujeszky, ont été publiés et font état d'une sensibilité et d'une linéarité accrues (Ren *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018).

## 2.4. Machines de PCR en temps réel portables

Le développement des épreuves et des machines de PCR en temps réel portables ouvre des perspectives quant à l'utilisation de ces techniques pour le diagnostic rapide (moins de 2 heures) de foyers de maladies sur le terrain. Cependant, les techniques d'amplification isotherme décrites plus bas pourraient s'avérer meilleures, dans la mesure où elles requièrent des équipements moins complexes et moins coûteux.

## 3. Amplification isotherme

Les méthodes d'amplification isotherme présentent l'avantage de se passer du thermocyclage et de permettre une amplification de l'ADN à une température constante. De ce fait, l'équipement requis est moins complexe et donc, moins cher. Le principe de base de cette technologie a fait l'objet d'une évolution pour aboutir à plusieurs méthodologies distinctes (Gill et Ghaemi, 2008).

La méthode la plus largement utilisée est la méthode d'amplification isotherme médiée par des boucles (*loop-mediated isothermal amplification*, LAMP) qui déploie quatre amorces ou plus formant un ADN tige-boucle par synthèse auto-amorcée de l'ADN et une ADN polymérase ayant une activité de déplacement du brin. Le résultat du processus d'amplification est la production de boucles aux extrémités des brins complémentaires, qui sont continuellement prolongés. Le processus d'amplification est indiqué soit par l'apparition d'une turbidité dans le mélange réactionnel, soit par la génération d'un signal fluorescent au moyen de colorants fluorescents (Gill et Ghaemi, 2008) soit, si les amorces sont biotinylées, par la visualisation des produits de la réaction au moyen de dispositifs de flux latéral (voir paragraphe B.3 Immunochromatographie). Ce processus est également moins exposé à une inhibition par des contaminants que la PCR ; cependant, les protocoles reposant sur cette technologie peuvent être difficiles et complexes à élaborer. L'amplification isotherme se prête moins bien que la PCR aux épreuves multiplexes, le risque de formation de dimères avec les amorces et/ou de réactions compétitives étant plus élevé et la conception de l'épreuve plus difficile dans certains cas.

## 4. Analyse par polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et approches liées basées sur l'ADN

La méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) permet d'identifier des génomes individuels sur la base de motifs uniques issus du clivage, par des enzymes de restriction, de régions spécifiques de l'ADN. L'approche par RFLP est basée sur le fait que les génomes d'agents pathogènes même étroitement apparentés sont définis par une variation des séquences. Par exemple, l'ordre linéaire des nucléotides adjacents comprenant la séquence de reconnaissance d'une enzyme de restriction spécifique d'un génome peut être absent du génome d'une souche ou d'un isolat étroitement apparenté. La procédure RFLP consiste à faire digérer l'acide nucléique des agents pathogènes (ADN ou produits d'une PCR) par une ou plusieurs enzymes de restriction et, ensuite, à séparer les fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose afin de déterminer le nombre de fragments et leur taille relative. Une enzyme de restriction est une endonucléase qui reconnaît et clive l'ADN à double brin au niveau de séquences de nucléotides spécifiques appelées sites de restriction (Loza-Rubio et al., 1999).

L'électrophorèse sur gel en champ pulsé (*Pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) peut être utilisée pour séparer de grands fragments d'ADN (jusqu'à une taille de l'ordre de la mégabase) et peut compléter utilement l'analyse de base par RFLP. Ces méthodes sont de plus en plus utilisées dans les programmes officiels de détection et de discrimination des agents pathogènes d'origine alimentaire (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* ou *Campylobacter*) dans le monde entier (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>).

Le RFLP est d'une utilité indéniable pour les études épidémiologiques, bien qu'une différence de RFLP puisse n'avoir aucune importance fonctionnelle. Même si les techniques de RFLP et de PCR-RFLP sont bien moins puissantes que les technologies de séquençage modernes, elles sont relativement peu coûteuses, faciles à mettre en œuvre et suffisamment descriptives pour mener des enquêtes épidémiologiques sur les foyers et identifier des souches particulières d'agents pathogènes.

## 5. Séquençage du génome

Ces derniers temps, le coût du séquençage a diminué et le séquençage du génome a gagné en importance pour la détection et la caractérisation de l'acide nucléique des agents pathogènes dans les échantillons diagnostiques. Lors du séquençage génomique, l'ordre dans lequel les bases d'acide nucléique apparaissent dans le gène est

également déterminé. Le séquençage de produits de la PCR ciblant une région informative d'un gène est particulièrement utile pour le pathotypage de nombreux organismes. Ainsi, l'analyse des séquences du gène de l'hémagglutinine du virus de l'influenza A est couramment utilisée pour localiser les sites de clivage et ainsi déterminer si le virus est hautement ou faiblement pathogène. Le séquençage complet du génome est actuellement la meilleure procédure pour procéder à l'identification différenciée d'un agent pathogène. Depuis 1977, la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) a dominé le séquençage de l'ADN mais des avancées récentes dans le séquençage à haut débit de nouvelle génération sont en passe de révolutionner cette approche.

Le séquençage du génome est un processus complexe dont le principe de base est le séquençage cyclique de fragments d'ADN ciblés avec des didésoxynucléotides marqués, qui enrayerent l'élongation lors des liaisons. Chacun des quatre didésoxynucléotides est marqué avec un colorant fluorescent différent, ce qui permet de les distinguer entre eux. Pendant le processus de PCR, ces didésoxynucléotides se lient aux fragments d'ADN partout où ils trouvent des paires de bases complémentaires. Une fois liés, ils bloquent la poursuite de l'élongation du fragment d'ADN. Ce processus génère un mélange de fragments d'ADN, chacun se terminant par un didésoxynucléotide défini. Le mélange réactionnel est ensuite analysé par électrophorèse capillaire, qui sépare les fragments par longueur et lit la fluorescence de chaque fragment. Un logiciel d'analyse est ensuite utilisé pour convertir les signaux de fluorescence spécifique en une séquence de nucléotides.

Le séquençage génomique permet l'analyse des pathogènes détectés durant le processus diagnostique. Ces analyses comprennent :

- i) L'identification de souches pathogènes afin d'ouvrir la voie à la mise en œuvre de mesures et de politiques de contrôle appropriées et, le cas échéant, à l'actualisation des vaccins ou au développement de tests diagnostiques spécifiques (Beerens *et al.*, 2017; Busquets *et al.*, 2019).
- ii) L'évaluation de la similarité génétique des isolats avec d'autres agents pathogènes de la même espèce (sous-type), pour déterminer leurs propriétés phylogénétiques ou pour définir l'origine d'un foyer/d'une infection. Cela peut être utile à l'analyse épidémiologique des épidémies.

Chose importante, les méthodes de séquençage conventionnelles peuvent être utilisées pour détecter et caractériser de nouvelles souches pathogènes émergentes. Cela repousse les limites imposées par les méthodes reposant sur la PCR, celles-ci ayant besoin d'amorces connues pour détecter l'agent pathogène. Ainsi, le séquençage est couramment utilisé pour identifier un nouveau virus au sein d'une famille à l'aide d'amorces dites dégénérées (un mélange d'amorces similaires, mais pas identiques) permettant d'amplifier un gène commun à cette famille de virus avant de procéder au séquençage de l'amplicon PCR. De manière analogue, des amorces universelles se fixant par anelage à une séquence conservée peuvent être utilisées pour amplifier et séquencer des gènes dans toutes les espèces de bactéries ; l'utilisation du gène ARNr 16S pour l'identification des bactéries en est l'application la plus courante (Cai *et al.*, 2014).

Les avantages et les limites des différentes techniques de séquençage couramment utilisées pour les analyses diagnostiques sont résumés dans le Tableau 2.

**Tableau 2. Résumé des variantes couramment utilisées dans les techniques de séquençage de l'acide nucléique, de leurs avantages et de leurs inconvénients**

<b>Le séquençage: détermine la composition de nucléotides d'une région sélectionnée d'un acide nucléique cible dans un échantillon</b>			
<b>Variantes</b>	<b>Détails</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
Séquençage Sanger (aussi appelé séquençage des didésoxys)	Les fragments d'ADN d'un produit PCR sont marqués avec des didésoxynucléotides détectables par fluorescence	Extrêmement spécifique D'un bon rapport coût/efficacité pour des morceaux d'ADN courts Réalisation et analyse rapides et simples	La longueur de la séquence est limitée et sans profondeur. Une seule lecture de séquence est générée par réaction de séquençage.
Séquençage à haut débit (SHD), aussi appelé séquençage de	Les génomes sont fragmentés, des amorces et des adaptateurs universels sont utilisés pour générer les séquences. Le HTS permet les types d'études suivants:	Une connaissance préalable de la cible n'est pas requise, la réaction n'étant pas dépendante d'une amorce	Coût Nécessite un vaste stockage de données et des analyses bioinformatiques approfondies, la quantité de

Le séquençage: détermine la composition de nucléotides d'une région sélectionnée d'un acide nucléique cible dans un échantillon			
Variantes	Détails	Avantages	Inconvénients
nouvelle génération (SNG) et séquençage massif en parallèle (SMP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Séquençage du génome entier</li> <li>• Découverte d'agents pathogènes (séquençage <i>de novo</i>)</li> <li>• Métagénomique</li> <li>• Analyse du microbiote</li> <li>• Analyse du transcriptome</li> </ul>	Analyse multiplexe d'échantillons possible, à l'aide de barcodes, ce qui en diminue le coût,	<p>données générées étant énorme</p> <p>Le résultat peut prendre plusieurs jours, mais cela est compensé par la quantité de données générées (p. ex. génome entier)</p> <p>L'accès aux compétences bioinformatiques et aux bibliothèques de données peut être problématique</p>

### 5.1. Séquençage à haut débit (SHD) et technologies mobiles

Le séquençage à haut débit (SHD) est le terme utilisé pour décrire les méthodes de séquençage massivement parallèles. Ces méthodes produisent des données au niveau du génome et offrent des possibilités diagnostiques supérieures au séquençage conventionnel (Belák *et al.*, 2009; Lipkin, 2010). Même si différents instruments existent, chacun ayant ses propres méthodes de séquençage, les technologies de séquençage dites de seconde génération reposent toutes sur la même stratégie générale d'amplification clonale de matrices d'ADN, suivie de leur séquençage lors de réactions de séquençage massivement parallèles produisant des milliers ou des millions de lectures, d'une longueur allant de 50 à 700 paires de bases. Ces lectures sont ensuite assemblées en séquences plus longues, appelées contigs, à l'aide d'outils bioinformatiques (voir Chapitre 1.1.7 *Normes pour le séquençage à haut débit, la bioinformatique et la génomique computationnelle*). L'existence de versions pour plan de travail de ces instruments, aux coûts réduits, a rendu le SHD accessible aux laboratoires de taille moyenne pour l'identification et la caractérisation des agents pathogènes. Ces nouvelles technologies ont non seulement augmenté la vitesse du séquençage, mais également diminué radicalement son coût. De ce fait, ces méthodes de séquençage deviennent des outils toujours plus importants pour la détection et l'identification des agents pathogènes.

Le séquençage du génome entier des agents infectieux constitue une autre application du SHD. Celui-ci permet d'assembler le génome entier ou un segment de génome et de mettre en évidence des phénomènes de réassortiment ou de recombinaison ainsi que des marqueurs de virulence. Le SHD peut être utilisé pour effectuer un re-séquençage approfondi de séquences virales au sein d'échantillons uniques afin d'évaluer la dynamique évolutive (Granberg *et al.*, 2016). Des études phylogénétiques et le traçage de la source d'une infection peut également être effectués au moyen du SHD. Toutefois, la plupart des plateformes de SHD produisent des lectures courtes et ont ainsi des limites largement reconnues dans l'assemblage *de novo* de nouveaux génomes. Dans ce contexte, une troisième génération de méthodologie de séquençage produisant des lectures plus longues mais à un débit inférieur offre la possibilité d'augmenter la résolution de l'assemblage du génome, permettant ainsi un séquençage *de novo* plus efficace des génomes microbiens (Levy & Myers, 2016). À l'heure actuelle, il existe des dispositifs portables de la taille d'un disque flash produisant des lectures de 5-50 kb (Granberg *et al.*, 2016). Même si le taux d'erreur de ces instruments, qui va de 5 à 20%, peut sembler très élevé, l'assemblage hybride de lectures courtes qu'offrent les plateformes de séquençage de seconde génération permet l'assemblage *de novo* de nouveaux génomes microbiens. Aujourd'hui, les dispositifs de séquençage portables utilisent une technologie commune qui repose sur les principes du séquençage par nanopore où sont mesurés les changements de propriétés électriques observés lorsque la molécule d'ADN traverse un pore. Ces changements électriques sont ensuite utilisés pour identifier la base ADN exacte qui traverse le pore.

### 5.2. Typage par séquençage multilocus

Le typage par séquençage multilocus (*Multilocus sequence typing*, MLST) est une méthode de séquençage utilisée pour le typage des agents pathogènes et les études épidémiologiques. Avec cette approche, les fragments de plusieurs gènes cibles sont amplifiés par PCR et séquencés. Pour chaque

locus retenu, un chiffre est attribué de manière arbitraire à chacun des allèles et le type de séquence est déterminé sur la base du profil allélique. La plupart des méthodes de MLST fournissent des résultats extrêmement reproductibles grâce à l'harmonisation internationale de la nomenclature ; les séquences et les profils alléliques sont accessibles dans de grandes bases de données centrales, accompagnées d'outils d'analyse en ligne.

## 6. Métagénomique

La métagénomique désigne les applications culture-indépendantes du SHD à l'analyse de la composition génétique virale et microbienne complète (microbiote) des échantillons (Bexfield & Kellam, 2011). Chose importante, il s'agit d'une approche non biaisée, les organismes n'étant pas sélectionnés par des méthodes de culture propices (ou non sélectionnés lorsque les conditions sont défavorables), et qui ne nécessite pas de connaissances préalables. Il est important de prendre en compte que, sans amplification ciblée, les technologies métagénomiques sont moins sensibles pour la détection des agents pathogènes que les méthodes reposant sur la PCR. Néanmoins, elles sont utilisées plus fréquemment dans les laboratoires diagnostiques du fait que, permettant la détection simultanée d'un large éventail d'agents infectieux, elles constituent des outils diagnostiques puissants. Ces technologies ont également permis d'identifier des agents pathogènes plus rapidement, y compris des agents potentiellement difficiles à identifier en les cultivant *in vitro* (Hoper *et al.*, 2017).

D'un point de vue diagnostique, la capacité à détecter simultanément un large éventail d'agents infectieux (Belák *et al.* 2013) constitue un avantage significatif des technologies métagénomiques. Certains des agents identifiés peuvent être nouveaux et les approches métagénomiques, appuyées par la bioinformatique, ont conduit à la découverte d'un grand nombre d'agents infectieux, dont de nouveaux bocavirus, des virus Torque Teno, des astrovirus, des rotavirus et des kobuvirus dans des syndromes de maladies porcines ainsi que de nouveaux variants viraux dans les populations d'abeilles mellifères. Il convient de relever que la puissance des technologies métagénomiques pour identifier tous les organismes présents dans un échantillon de manière non biaisée peut mettre le laboratoire diagnostique au défi d'identifier quel est, parmi plusieurs organismes détectés dans un échantillon, l'organisme susceptible d'être l'agent responsable de la maladie.

Ces résultats, en plus de l'expérience récente acquise dans plusieurs centres diagnostiques dans le monde, montrent que la détection métagénomique des agents infectieux est en passe de devenir un outil diagnostique précieux et puissant, culture-indépendant, en médecine vétérinaire comme en médecine humaine (Granberg *et al.*, 2016; Wylezich *et al.*, 2018).

## B. TECHNIQUES D'IMMUNODIAGNOSTIC

Tous les immunoessais exploitent la capacité innée des anticorps à se lier à un antigène (ou à un ou plusieurs épitopes de l'antigène), ceci avec une spécificité et une affinité élevées. Les anticorps sont souvent qualifiés de monoclonaux ou polyclonaux. Les anticorps monoclonaux (AcM) sont dérivés d'un lymphocyte B unique, ce qui signifie que chaque anticorps produit est identique au suivant et, de ce fait, ne se liera qu'à un seul épitope ou antigène spécifique. Les anticorps polyclonaux (AcP) constituent un ensemble de AcM différents dérivés d'une population de lymphocytes B, chaque anticorps étant différent de son voisin, leur permettant ainsi de se lier spécifiquement à différents épitopes de l'antigène.

Les anticorps monoclonaux sont produits par des clones de lymphocytes B immortalisés, appelés hybridomes, formés par la fusion d'une cellule de myélome avec un lymphocyte B individuel prélevé dans la rate d'un animal immunisé. Les anticorps polyclonaux sont produits par des animaux qui ont été exposés à un antigène étranger, tel un agent pathogène ou un vaccin ; ils représentent l'intégralité de la réponse en anticorps à cet antigène. C'est pourquoi les sérums à tester contiendront des anticorps polyclonaux tandis que les anticorps utilisés comme réactifs dans un test seront de nature monoclonale ou polyclonale.

Les immunoessais sont conçus pour détecter, dans les échantillons testés, un antigène ou un anticorps spécifiques à un agent pathogène et indicateurs d'une infection active ou antérieure. L'agent pathogène lui-même, l'une ou plusieurs de ses sous-unités ou protéines, une protéine recombinante ou un polypeptide de synthèse peuvent être des antigènes. Les anticorps seront ceux provenant de l'hôte et ciblés par l'essai comme indicateurs d'une infection et/ou les anticorps du réactif utilisés pour fixer les marqueurs des antigènes ou des anticorps spécifiques à la maladie. Les anticorps du réactif sont généralement décrits selon leur fonction. Ainsi, un anticorps primaire est utilisé pour se lier directement à un antigène tandis qu'un anticorps secondaire se liera à l'anticorps primaire et véhiculera le marqueur utilisé pour la détection et qu'un anticorps de capture servira à immobiliser un antigène.

Selon le format de l'immunoessai, l'anticorps ou l'antigène est d'abord lié à une phase solide – généralement la surface de microbilles, une membrane ou les puits d'une plaque d'un essai d'immunoabsorption enzymatique (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Ceci constitue un point fixe auquel la cible spécifique se lie ou par lequel elle est capturée. C'est pourquoi un immunoessai conçu pour détecter une réponse en anticorps dans un échantillon de sérum d'un animal infecté pourra utiliser un antigène fixé sur une surface solide, auquel l'anticorps spécifique au pathogène présent dans le sérum à tester se liera et qui sera détecté à son tour au moyen d'un anticorps secondaire marqué. Lorsque la cible, dans l'échantillon testé, est un antigène, on utilise un anticorps sur une phase solide pour capturer celui-ci via un épitope spécifique tandis qu'un second anticorps (souvent marqué) dirigé contre un autre épitope prend l'antigène en sandwich et sert à sa détection. Il existe de nombreuses variations de ces formats d'essai mais, dans tous les cas, la spécificité des anticorps pour un antigène donné constitue le fondement de l'immunoessai. La littérature regorge de compte-rendus précieux comparant les différents systèmes diagnostiques et fournissant des recommandations aux laboratoires diagnostiques quant à la spécificité, la sensibilité et l'utilité de différents essais immunodiagnostiques (Kittelberger *et al.*, 2011).

## 1. Essai d'immunoabsorption enzymatique (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA)

Les essais d'immunoabsorption enzymatiques (ELISA) sont les outils immunodiagnostiques majoritairement utilisés dans les laboratoires diagnostiques vétérinaires du monde entier. L'ELISA exploite des interactions antigène-anticorps spécifiques pour détecter les anticorps spécifiques à un agent pathogène ou à un antigène spécifique de l'agent pathogène. Le design conventionnel de l'ELISA a été largement modifié pour répondre à toutes sortes d'exigences diagnostiques.

### 1.1. Principes de fonctionnement

La liaison spécifique d'un antigène à un anticorps constitue le principe de base de tous les essais ELISA. Chaque type d'ELISA exploite cette interaction de manière différente.

#### 1.1.1. ELISA indirect

Les ELISA indirects (I-ELISA) sont utilisés pour la détection des anticorps à un antigène dans un échantillon de sérum. Lors d'un I-ELISA, l'antigène cible (entier ou purifié) est fixé à la surface solide des puits de la plaque ELISA (phase solide). Pour réaliser le test, les étapes suivantes sont exécutées:

- i) Les échantillons de sérum sont déposés dans les puits à la dilution indiquée. Si le sérum contient des anticorps spécifiques dirigés contre l'antigène revêtant le puits, ceux-ci se lient à l'antigène.
- ii) Les plaques ELISA sont ensuite rincées pour éliminer tout anticorps non lié.
- iii) Les anticorps produits contre les immunoglobulines de l'espèce animale examinée sont ensuite ajoutés dans les puits. Ces anticorps anti-espèce (ou parfois la protéine A ou G) sont conjugués avec une enzyme (généralement une peroxidase).
- iv) Comme tous les anticorps non liés présents dans l'échantillon de sérum ont été éliminés durant la phase de rinçage initiale, les anticorps conjugués ajoutés lors de l'étape (iii) ne peuvent se lier qu'aux anticorps déjà fixés à la phase solide de l'ELISA au cours de l'étape (i) (à savoir les anticorps spécifiques à l'antigène d'intérêt).
- v) Une seconde étape de rinçage est effectuée pour éliminer tout anticorps conjugué non lié.
- vi) Le substrat enzymatique, associé à un chromogène idoine dans un tampon, est alors ajouté. Si le puits (puits contenant les anticorps d'intérêt) héberge des anticorps conjugués liés, la présence de l'enzyme conjugué provoquera un changement de couleur du tampon de substrat.
- vii) Ce changement de couleur est mesuré à une longueur d'onde définie au moyen d'un spectrophotomètre. La densité optique augmente proportionnellement à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon.

L'I-ELISA est très sensible pour la détection des anticorps, du fait que les réactifs sont ajoutés en excès (l'excédent étant ensuite rincé), ce qui favorise des réactions rapides et une amplification du signal en raison de l'activité continue de l'enzyme qui génère le changement de couleur lors de

la phase finale de l'essai. Il est possible d'augmenter encore la sensibilité de ce format en ajoutant plus d'enzyme par molécule de conjugué. Ceci peu se faire avec des anticorps biotinylés auxquels sont ajoutés des enzymes conjugués à la streptavidine ou avec des réactifs dotés de structures auxquelles sont attachés beaucoup plus d'enzymes, comme la streptavidine poly-HRP (peroxidase de raifort, *horseradish peroxidase*).

### 1.1.2. ELISA avec capture d'antigène

Les ELISAs avec capture d'antigène (Ag-ELISA) sont utilisés pour détecter la présence d'antigènes spécifiques à l'agent pathogène dans un échantillon et sont utiles pour le diagnostic avant ou pendant une maladie clinique.

Les Ag-ELISA utilisent généralement un format d'essai en sandwich. Des AcM ou des AcP spécifiques aux antigènes d'intérêt sont fixés à la surface solide des puits d'une plaque ELISA. L'échantillon est ensuite ajouté au puits et les antigènes cibles potentiellement présents sont capturés par les anticorps fixés. Les antigènes capturés sont ensuite détectés en ajoutant un second AcM ou AcP marqué avec un enzyme. Les puits sont ensuite rincés afin d'éliminer tous les anticorps conjugués non fixés, puis les substrats enzymatiques et les tampons sont ajoutés. Comme pour les I-ELISA, ceci résulte dans un changement de couleur détectable dans les puits positifs. À noter que, si l'anticorps utilisé pour la détection n'est pas marqué, on utilisera alors un anticorps conjugué à une enzyme ciblant cet anticorps.

Les caractéristiques souhaitées d'un anticorps de capture sont une forte affinité avec l'agent pathogène, la reconnaissance d'un épitope conservé hautement spécifique de l'agent pathogène ciblé et la capacité à se fixer à une plaque ELISA sans perte de réactivité. L'anticorps utilisé pour la détection devrait, quant à lui, reconnaître un épitope autre que celui reconnu par l'anticorps de capture fixé à la plaque ELISA. Il peut être difficile d'identifier des AcM ayant une réactivité intratypique complète et des antiserums polyclonaux peuvent être préférés pour augmenter la probabilité d'une réaction à tous les variants antigéniques.

Des Ag-ELISA ont été développés pour la détection de nombreux agents infectieux, comme le virus de la diarrhée virale bovine (DVB, voir Mignon *et al.*, 1991), les virus de la peste bovine et de la peste des petits ruminants (PPR) (Libeau *et al.*, 1994). Les méthodes apparentées avec capture d'antigène qui ont recours à des billes immunomagnétiques enrobées d'anticorps sont désormais importantes et bien acceptées pour détecter certaines infections bactériennes, notamment celles causées par *Listeria*, *Salmonella* et *E. coli*. Le principe de cette technique repose sur la séparation immunomagnétique, en utilisant des petites particules superparamagnétiques ou des billes recouvertes d'anticorps dirigés contre les antigènes de surface des bactéries. Les propriétés magnétiques de ces billes leur permettent d'être retenues lorsqu'elles sont lessivées et d'être transférées dans différents tampons d'une manière analogue aux méthodes décrites plus haut pour l'ELISA. Les antigènes (bactéries intactes ou leurs déterminants antigéniques solubles) peuvent être détectés après extraction magnétique à partir de l'échantillon de test au moyen d'un second anticorps au format sandwich. Les essais de capture d'antigène utilisant des billes immunomagnétiques peuvent accélérer la cinétique de la réaction antigène-anticorps, les billes étant mélangées à l'échantillon, ce qui réduit le temps d'incubation.

### 1.1.3. ELISA bloquant

L'ELISA bloquant (B-ELISA), utilisé pour la détection des anticorps sériques, présente certaines similitudes avec l'Ag-ELISA. Des anticorps spécifiques à l'antigène cible sont fixés à la phase solide de la plaque ELISA. Avant d'être ajouté à la plaque tapissée d'anticorps, l'antigène sera incubé avec l'échantillon. Si l'échantillon contient des anticorps contre cet antigène, ceux-ci se lieront à l'antigène (et le bloqueront). Lors de l'ajout dans les puits, l'antigène bloqué sera incapable de se lier aux anticorps qui tapissent les parois. Par conséquent, lorsque l'anticorps de détection sera ajouté dans les puits, il ne reconnaîtra aucun antigène lié (aucune coloration). En revanche, si l'échantillon provient d'un cas négatif, la liaison aura lieu et il y aura apparition d'une coloration.

### 1.1.4. ELISA compétitif

L'ELISA compétitif (C-ELISA) est une variante de l'ELISA utilisée pour détecter ou pour quantifier des anticorps ou des antigènes selon une méthode compétitive. Le principe d'un essai compétitif pour la détection des anticorps repose sur une compétition entre les anticorps susceptibles d'être présents dans le sérum à tester et les anticorps de détection (qui, dans ce cas, se lient directement à l'antigène). La liaison spécifique de l'anticorps de détection est mise en évidence au moyen d'un conjugué anti-espèce approprié, à moins que l'anticorps ne soit lui-même marqué. La liaison d'anticorps spécifiques à l'antigène et présents dans le sérum à tester se traduit par une réduction de la couleur attendue, ces anticorps étant en concurrence avec les anticorps de détection pour les sites de liaison de l'antigène. Le C-ELISA offre de nombreux avantages par rapport au I-ELISA ; il permet par exemple de tester des échantillons d'espèces différentes sans nécessiter de conjugué marqué d'une enzyme spécifique à l'espèce pour chaque espèce à tester ; il permet également d'utiliser des antigènes moins purifiés et peut se révéler plus rapide à réaliser puisqu'il requiert un temps d'incubation réduit. Dans certains cas, les C-ELISAs peuvent présenter une sensibilité analytique moindre que les ELISAs indirects. Ainsi, lorsqu'il repose sur la compétition entre anticorps du sérum à tester et AcM (de détection) pour se lier à un épitope unique sur l'antigène, le C-ELISA peut fournir des résultats faux négatifs si la réponse humorale de l'hôte à l'agent pathogène a ciblé sur l'antigène des épitopes qui diffèrent de l'épitope cible de l'AcM.

## 2. Immunotransfert

L'immunotransfert est réalisé dans les laboratoires de diagnostic pour identifier et/ou caractériser les agents infectieux sur la base de leur spécificité antigénique ou en utilisant des antigènes connus pour détecter une réponse sérologique spécifique. L'immunotransfert combine la haute résolution de l'électrophorèse sur gel avec la spécificité de l'immunodétection et offre un moyen d'identifier les protéines immunodominantes reconnues par les anticorps d'animaux infectés ou par des anticorps dirigés contre l'agent ciblé. Un bon exemple de la détection d'antigènes est l'emploi de l'immunotransfert à grande échelle comme principale méthode de dépistage de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et de la tremblante du mouton ; cette technique a été utilisée sur des millions d'échantillons de tronc cérébral en Europe et ailleurs afin de détecter la protéine prion (Schaller *et al.*, 1999). Pour les tests de dépistage, l'immunotransfert est aujourd'hui largement remplacé par l'Ag-ELISA ou par les méthodes basées sur des dispositifs de flux latéral, mais il demeure un test de confirmation important complet, essentiel pour différencier les souches transmissibles d'encéphalopathies spongiformes en ESB et tremblantes typiques ou atypiques.

Les résultats faux positifs et faux négatifs obtenus avec d'autres épreuves diagnostiques peuvent souvent être résolus grâce à l'immunotransfert (Molina Caballero *et al.*, 1993). L'immunotransfert peut également être utilisé pour déterminer la spécificité d'AcM particuliers. Des polypeptides purifiés pris isolément (ou des protéines recombinantes exprimées) peuvent aussi être transférés sur des membranes de nitrocellulose ou de difluorure de polyvinylidène par immunotransfert afin d'examiner la réactivité des sérums à tester à ces protéines individuelles. Ce profil caractéristique de réactivité peut servir à distinguer des animaux vaccinés ou infectés ; c'est le cas du transfert électro-immuno-enzymatique (EITB), un test « Western blot » pour la fièvre aphteuse (FA) largement répandu en Amérique du Sud (Bergmann *et al.*, 1993).

Le principal facteur susceptible de faire échouer la technique de l'immunotransfert réside dans la nature des épitopes reconnus par les anticorps. La plupart des techniques à haute résolution de séparation sur gel vont de pair avec une certaine dénaturation de l'antigène, ce qui détruit les déterminants conformationnels et permet uniquement la détection des épitopes linéaires ou non conformationnels. La majorité des sérums polyclonaux contiennent des anticorps dirigés à la fois contre des épitopes linéaires et conformationnels. Or les AcM reconnaissent un seul épitope. Par conséquent, s'ils ciblent des épitopes conformationnels, ils ne réagiront pas en présence d'une protéine dénaturée.

## 3. Immunochromatographie (dispositifs de flux latéral)

L'immunochromatographie est une méthode pratique pour détecter des antigènes, des anticorps (ou toute molécule marquée pour laquelle un ligand a été déposé sur la membrane chromatographique, comme par exemple les produits d'une LAMP biotinylés [voir paragraphe A.3 Amplification isotherme]), en quelques minutes et sans appareillage spécial (Fowler *et al.*, 2014; Hanon *et al.*, 2016; Waters *et al.*, 2014).

L'échantillon est déposé (généralement avec un tampon) à une extrémité d'une membrane où se trouve un coussinet contenant des microbilles conjuguées à un anticorps ou à un antigène (billes de latex ou d'or colloïdal par exemple). L'antigène ou l'anticorps (selon le format du test) présent dans l'échantillon forme un immunocomplexe avec les microbilles marquées. Ce complexe migre le long de la membrane par capillarité, jusqu'à entrer en contact avec un anticorps, un antigène ou un ligand correspondant, immobilisé sur la membrane, pour former alors un immunocomplexe et générer un produit coloré qu'il est possible de visualiser, soit à l'œil nu, soit au moyen d'un lecteur portable. Les dispositifs de flux latéral présentent un grand potentiel de développement vers des tests diagnostiques portables, au chevet du patient. Des microbilles incorporant des fluorophores peuvent être utilisées pour produire des dispositifs de flux latéral qui, utilisés avec des détecteurs portables spécifiques, offrent alors une sensibilité analytique accrue (Liang *et al.*, 2017). La microfluidique papier, d'un faible coût, pourrait être amenée à jouer un rôle croissant dans le futur, notamment en contexte de terrain (p. ex. Yang *et al.*, 2018).

#### 4. Tests de neutralisation avec un virus rapporteur

Les virus rapporteurs peuvent être dérivés à partir de virus manipulés génétiquement qui ont été totalement atténués et qui sont porteurs d'un gène codant pour un marqueur, du type protéine verte fluorescente ou luciférase de *Renilla* ou de luciole. Une autre solution consiste à exprimer les glycoprotéines de l'enveloppe du virus à étudier sur une particule d'une espèce virale hétérologue porteuse d'un gène marqueur et dont la réplication est déficiente, comme c'est le cas des glycoprotéines lyssavirales exprimées sur des particules rétrovirales (pseudotypes viraux). Ces approches novatrices réduisent le biorisque pour le vétérinaire diagnosticien et augmentent la sensibilité des tests de neutralisation virale ; elles ont été développées pour toute une gamme d'agents pathogènes viraux, dont le virus de la rage (Wright *et al.*, 2008), le virus de l'influenza A (Carnell *et al.*, 2015), les virus de la PPR, de la peste bovine ou de la maladie de Carré (Logan *et al.*, 2016a; 2016b), ainsi que pour le virus de la fièvre de la vallée du Rift (Schreier *et al.*, 2017). Ces technologies permettent une quantification rapide des anticorps neutralisants puisqu'elles dispensent d'attendre l'apparition de plaques ou d'autres effets cytopathiques. Elles sont susceptibles d'être multiplexées pour développer des épreuves de neutralisation virale capables de détecter des anticorps neutralisants contre des antigènes distincts (Molesti *et al.*, 2014).

#### 5. Système d'immunoprécipitation sur luciférase

Le système d'immunoprécipitation sur luciférase (*luciferase immunoprecipitation system*, LIPS) peut lui aussi être utilisé pour la détection des anticorps spécifiques à un agent pathogène. Une application récente de cette approche a été décrite pour la détection des anticorps spécifiques au virus de la PPR (Berguido *et al.*, 2016). Dans cet essai, une enzyme rapporteuse, la luciférase de *Renilla* (Ruc), est fusionnée à un antigène d'intérêt et exprimée dans des cellules de mammifère. La protéine de fusion Ruc-antigène est ensuite reconnue par des anticorps spécifiques à l'antigène et le complexe antigène-anticorps capturé par des billes de protéine A/G qui reconnaissent la région Fc de l'anticorps IgG. La proportion d'anticorps lié à l'antigène marqué avec Ruc est déterminée au moyen d'un luminomètre qui mesure la lumière produite lors de l'adjonction de coelentérazine, le substrat de Ruc. Cette approche est indépendante de l'espèce, offre une détection très spécifique et très sensible tout en nécessitant un volume minime de sérum à tester.

#### 6. Tests rapides homogènes

Les tests rapides homogènes sont ceux où les réactifs sont mélangés ensemble pour former une solution ou une suspension homogène dans laquelle les réactions anticorps-antigène se font rapidement. Ces tests se passent de toute étape de séparation ou de rinçage et peuvent être lus sans autre étape impliquant la manipulation de liquides. Les exemples de tests de ce type comprennent les tests d'agglutination où un échantillon de sérum est mélangé avec un antigène particulaire en suspension et où la présence d'anticorps sériques contre cet antigène provoque son agglutination (en raison de la nature multivalente des anticorps). Parmi les méthodes plus sophistiquées figurent les tests de polarisation en fluorescence (*fluorescence polarisation assay*, FPA) qui mesurent comment la valeur de spin d'une molécule, par exemple d'un antigène, change lorsque la taille de la molécule augmente suite à sa liaison avec un anticorps. Le test FPA pour *Brucella* qui utilise des polysaccharides O conjugués à la fluorescéine est un bon exemple de cette approche (Nielsen *et al.*, 1996). Celle-ci est toutefois limitée par le fait qu'elle nécessite un antigène hautement purifié et suffisamment petit pour avoir un spin rapide en l'absence de liaison avec un anticorps. Deux lectures sont nécessaires, la première pour mesurer la fluorescence de fond de l'échantillon et la seconde pour mesurer la fluorescence de la réaction après ajout de l'antigène. D'autres méthodes utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour le criblage à haut débit des composés comprennent des méthodes compétitives où des ligands complémentaires, analogues aux antigènes et aux anticorps, sont marqués avec des balises qui interagissent entre elles de façon mesurable selon leur proximité, les signaux allant croissant plus elles se rapprochent (indiquant que la liaison s'est faite). L'ajout de réactifs concurrents, comme des anticorps sériques non

marqués, entrave cette réaction, ce qui se traduit par une réduction mesurable du signal (McGiven *et al.*, 2009). Comparé à d'autres méthodes diagnostiques, les tests de polarisation en fluorescence affichent une sensibilité élevée, comme c'est le cas pour le diagnostic de la brucellose bovine (Praud *et al.*, 2016).

## C. APPROCHES BIOTECHNOLOGIQUES POUR LA PRODUCTION DE REACTIFS DIAGNOSTIQUES

### 1. La technologie de l'ADN recombinant pour produire des réactifs diagnostiques

Ces technologies sont désormais aussi utilisées pour produire des polysaccharides conjugués à des protéines (Cuccui & Wren, 2015) puisque le code génétique pour la protéine porteuse, les protéines nécessaires à la synthèse des glycanes et le code des protéines nécessaires pour conjuguer les glycanes au porteur peuvent tous être insérés dans des cellules bactériennes hôtes (p. ex. *E. coli*). Bien qu'initialement destinées à la production de vaccins, ces glycoprotéines recombinantes peuvent également être utilisées pour le sérodiagnostic, par exemple pour la détection d'anticorps anti-*Brucella* chez les bovins et les porcs (Ciocchini *et al.*, 2014; Cortina *et al.*, 2016). Ces antigènes offrent les avantages traditionnels des protéines recombinantes, telle la pureté du produit, ne nécessitent pas de cultiver l'organisme concerné (en l'occurrence un agent zoonotique hautement infectieux) et permettent la production d'antigènes diagnostiques non protéiques de première importance, tels les glycanes, ceci sous une forme (conjuguée) qui simplifie leur utilisation comme produits diagnostiques ou comme vaccins.

La technologie de l'ADN recombinant permet la production d'antigènes pour de multiples applications diagnostiques : tests ELISA, tests d'agglutination, tests d'inhibition de l'hémagglutination, tests d'immunodiffusion sur gel d'agarose, tests de fixation du complément, biopuces et technologies reposant sur des billes.

Des anticorps recombinants sont utilisés comme alternative à la technologie traditionnelle utilisant des hybridomes pour la production d'anticorps de qualité élevée. Expression phagique, expression sur levures, expression ribosomique constituent quelques-unes des approches utilisées pour produire des anticorps dans des systèmes procaryotiques, eucaryotiques ou *in vitro*, respectivement (Sutandy *et al.*, 2013).

### 2. Biologie des antigènes de synthèse

Éludant totalement les systèmes biologiques, la création *de novo* d'une structure antigène par synthèse offre de nombreux avantages par rapport à l'extraction d'antigènes natifs. Parmi ces avantages figurent un degré de pureté et de reproductibilité élevé, un potentiel à une production à large échelle ainsi que le design personnalisé des antigènes.

La tendance actuelle dans la production d'antigènes destinés à un emploi dans les essais est le développement d'antigènes peptidiques de synthèse. Les antigènes servant de réactifs diagnostiques peuvent être testés sur la base de leur séquence génétique ; l'expression de la protéine entière n'est pas nécessaire, ce qui raccourcit le processus. Il est également possible de synthétiser des peptides glycosylés (Bednarska *et al.*, 2017). Les coûts et les bénéfices des systèmes de production recombinants sont tels que ceux-ci conservent leur position dominante pour la production des protéines de grande taille. Toutefois, pour les antigènes non protéiques dont la base génétique indispensable à une production n'est pas claire et pour lesquels une production recombinante n'est donc pas possible, la synthèse constitue une option très fructueuse et rentable pour produire des antigènes diagnostiques. Cela a été montré pour la brucellose, les épitopes existant dans la structure originale des polysaccharides O de *B. abortus* S99 et de *B. melitensis* 16M ayant été synthétisés et s'étant avérés très efficaces pour le sérodiagnostic (Guiard *et al.*, 2013; McGiven *et al.*, 2015).

L'ADN de synthèse peut être produit à partir de données de séquences puis, grâce aux technologies recombinantes, être utilisé pour produire des protéines, voire compléter des virus pour la production rapide de vaccins, contre l'influenza par exemple (Dormitzer *et al.*, 2013).

## D. TECHNOLOGIES APPLICABLES À LA DÉTECTION ET À L'ANALYSE DES ANTIGÈNES, DES ANTICORPS ET DES ACIDES NUCLÉIQUES

### 1. Technologie des biopuces

Une biopuce (également appelée micromatrice ou microréseau) est un agencement bidimensionnel de sondes biologiques spécifiques (p. ex. ADN, protéines, peptides, glycanes) immobilisées sur un substrat solide comme une lame de verre, une surface de verre, de plastique, de nitrocellulose ou autre, recouverte de polymère (Barbulovic-Nad *et al.*, 2006). L'aptitude des biopuces au multiplexage est élevée, permettant ainsi des centaines ou des milliers de détections simultanées. Des biopuces peuvent être créées pour identifier la cause de maladies syndromiques, une puce ciblant par exemple un groupe d'agents responsables de pathologies encéphaliques ou un groupe de maladies propres à une espèce, p. ex. puces pour les maladies porcines. De manière analogue, des puces dotées d'une spécificité très élevée peuvent être conçues pour détecter plusieurs cibles d'un même agent pathogène. La manipulation et l'analyse des immenses ensembles de données qui sont produits par l'emploi de biopuces peut présenter certaines difficultés. L'appareillage et les consommables peuvent également être d'un coût prohibitif pour certains laboratoires.

#### 1.1. Biopuces à ADN

Les biopuces à ADN exploitent la faculté des brins complémentaires d'acides nucléiques à s'hybrider et fonctionnent selon les étapes suivantes:

- i) Les acides nucléiques isolés à partir de sources biologiques sont amplifiés et marqués avec un colorant fluorescent.
- ii) Des produits ADN simple brin marqués sont ensuite ajoutés à la surface de la biopuce à ADN. Il en résulte une hybridation des acides nucléiques de l'échantillon avec ces sondes biologiques complémentaires dans la micropuce et la création d'une structure double brin marquée à la surface de la biopuce.
- iii) La biopuce est ensuite rincée pour éliminer les molécules non spécifiquement liées à la cible, avant d'être lue au moyen d'un scanner laser.

La technologie des biopuces à ADN est utilisable pour une multitude d'applications diagnostiques. Cette technologie offre la possibilité de détecter et d'identifier, dans l'échantillon cible, des agents pathogènes d'importance en termes de santé publique et de santé animale (Ojha & Kostrynska, 2008). Elle peut également être utilisée pour les enquêtes épidémiologiques et pour le génotypage des agents pathogènes. Au gré des avancées technologiques, les biopuces à ADN ont également permis la découverte de nouveaux agents pathogènes émergents. Ainsi, une biopuce constituée de sondes 70mer largement conservées puisées dans l'ensemble des génomes viraux de référence séquencés a été utilisée pour démontrer qu'un coronavirus était responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (*severe acute respiratory syndrome*, SARS).

Les biopuces à ADN sont particulièrement utiles pour les essais multiplexes et ont été utilisées pour détecter et déterminer tous les sous-types HA et NA possibles du virus de l'influenza aviaire (Belák *et al.*, 2009). La dernière génération de micropuces permet l'analyse de séquences ADN, fournissant souvent des séquences entières du génome en une seule expérience.

#### 1.2. Biopuces à protéines

De manière analogue aux biopuces à ADN, la production de biopuces à protéines commence par l'immobilisation, à une densité élevée, de protéines sur une surface solide (Sutandy *et al.*, 2013). Les biopuces contiennent des sondes moléculaires spécifiques (antigènes ou anticorps), susceptibles d'être reconnues par des marqueurs fluorescents ou détectées par spectrométrie de masse (SELDI-TOF [surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight] ou MALDI-TOF [matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight]) (Sutandy *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2006). Le principe de la réaction entre une molécule de capture immobilisée et un analyte protéique cible présent dans l'échantillon repose sur la reconnaissance anticorps/antigène ou sur l'interaction protéine/protéine. Les biopuces à protéines sont utilisés pour la détection d'antigènes ou d'anticorps dans les échantillons sanguins, pour la découverte de biomarqueurs de maladies et pour la compréhension des mécanismes pathogéniques ou de la réponse immunitaire à un agent pathogène générée par différents hôtes. Ainsi, une biopuce à

protéines contenant 1406 protéines potentielles de *Brucella melitensis* a été utilisée pour cribler les sérums de chèvres ayant fait l'objet d'une infection expérimentale et d'humains victimes d'une infection naturelle et a permis de démontrer les différences de réponse immunitaire entre la chèvre et l'homme suite à une infection par *B. melitensis* (Liang *et al.*, 2010). Par ailleurs, les biopuces à protéines peut être utilisées pour la détection d'anticorps dirigés contre des agents pathogènes spécifiques et pour le suivi des changements dans l'expression des protéines cellulaires.

La spectrométrie de masse SELDI-TOF (*Surface-enhanced laser desorption/ionisation-time of flight*)

Les progrès technologiques ayant permis une impression des sondes, une manipulation des liquides et une visualisation du signal efficaces, ils ont conféré aux biopuces une standardisation et une validation méthodologiques suffisantes. La nécessité de disposer d'anticorps très spécifiques pour éviter les résultats faux positifs tout comme la nécessité de produire de grandes quantités d'anticorps, selon un mode haut débit, représentent quelques-unes des difficultés majeures de l'utilisation des biopuces à protéines dans les analyses de routine

## 2. Les microréseaux à billes

Les microréseaux à billes ou à billes cytométriques sont des variantes des tests utilisant des sondes ; elles permettent un profilage multi-analytes ciblant les acides nucléiques, les antigènes ou les anticorps (Christopher-Hennings *et al.*, 2013). Avec ces techniques, l'acide nucléique, l'antigène ou l'anticorps spécifique à l'agent pathogène fait l'objet d'une liaison covalente aux billes microsphériques. Un avantage de ces technologies est leur aptitude au multiplexage provenant de la signature fluorescence propre aux différentes billes (chaque bille étant susceptible de porter une sonde spécifique). Les méthodes à billes sont de plus en plus utilisées pour les tests de détection de pathogènes multiples, ciblant les acides nucléiques de plusieurs agents pathogènes (Boyd *et al.*, 2015) ou les anticorps produits en réponse à différents agents pathogènes dans un échantillon unique (Sánchez-Matamoros *et al.*, 2016). S'il est nécessaire de tester plusieurs échantillons de sérum au regard de plusieurs maladies (et donc de plusieurs antigènes différents), avec la possibilité qu'il y ait plusieurs antigènes par maladie, alors les microréseaux à billes multiplexes offrent un moyen efficace de le faire. Le génotypage du virus de la peste porcine africaine (LeBlanc *et al.*, 2013) et les tests DIVA (différentiation entre les animaux vaccinés et les animaux infectés) pour la fièvre aphteuse (Chen *et al.*, 2016) sont des exemples récents de l'emploi des facultés de multiplexage de ces technologies.

## 3. Biosenseurs

Les biosenseurs se servent d'un élément biosenseur immobilisé (ADN, ARN, antigène/anticorps ou glycane), aussi appelé biorécepteur, pour reconnaître un biomarqueur caractéristique de l'agent pathogène. L'interaction biochimique entre le biomarqueur et le biorécepteur qui en résulte est convertie en un signal mesurable à l'aide d'un transducteur, puis affichée (Vidic *et al.*, 2017). La biodétection repose sur des méthodes de transduction optique, électrochimique ou mécanique (Alahi & Mukhopadhyay, 2017). Cette approche a été utilisée pour la détection de l'antigène de l'influenza A (Hideshima *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013) et pour celle des anticorps en réponse à *Mycoplasma bovis* (Fu *et al.*, 2014).

## 4. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (*mass spectrometry*, MS) est en mesure de détecter des biomarqueurs présents dans un échantillon sur la base de leur masse. Une infection par un micro-organisme peut être détectée en comparant le profil de biomarqueurs présents dans un échantillon avec une base de données d'échantillons connus pour être positifs en regard de l'organisme d'intérêt. C'est le postulat de nombreuses modalités diagnostiques, dont la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cette approche a été utilisée pour *Staphylococcus intermedius* ainsi que pour l'identification directe de bactéries dans les hémocultures (Guardabassi *et al.*, 2017). Parmi les approches développées, certaines permettent d'identifier des biomarqueurs protéiques à des fins d'identification virale. La spectrométrie de masse MALDI-TOF peut également être utilisée pour séquencer de courts fragments d'ADN et sert d'alternative au séquençage conventionnel lorsque la recherche de mutations requiert un criblage automatisé à haut débit.

Une plateforme utilisant l'ionisation par électronébulisation a été développée pour une identification rapide des agents pathogènes ; elle associe la précision et la sensibilité du typage par séquençage multilocus à la rapidité et au débit de la spectrométrie de masse (Kailasa *et al.*, 2019). De même, de nombreuses applications utilisant la

spectrométrie de masse MALDI-TOF existent pour le génotypage, le typage et le reséquençage des polymorphismes de nucléotides individuels (*single nucleotide polymorphisms*, SNP).

#### 4.1. Protéomique

La spectrométrie de masse est également utilisée en protéomique. Le protéome est l'effectif total de protéines exprimées dans une cellule, un tissu ou un organisme. La protéomique est l'étude de ces protéines, notamment de leur niveau d'expression, de leur modification post-traductionnelle et de leurs interactions avec les autres protéines. Dans la mesure où toutes les protéines ne sont pas exprimées à chaque instant, mais dépendent de facteurs physiologiques et environnementaux, la protéomique peut fournir une excellente vue d'ensemble des processus liés à une maladie au niveau des protéines. Par exemple, le diagnostic définitif de l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) chronique repose encore sur la biopsie du foie, mais l'analyse protéomique des échantillons de sérum montre que l'expression d'au moins sept protéines sériques change significativement chez les patients chroniques. De la même manière, la protéomique peut être une aide pour le diagnostic différentiel ante mortem de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), car les données préliminaires montrent que sept protéines du liquide cébrospinal (LCS) sont exprimées différemment chez les patients atteints d'une MCJ variante ou d'une MCJ sporadique (Choe et al., 2002). Dans le domaine vétérinaire, diverses maladies animales ou zoonotiques ont fait l'objet d'études où les méthodes de protéomique ont trouvé leur application (Katsafadou et al., 2015; Patramool et al., 2012; Torre-Escudero et al., 2017).

### 5. Détection *in situ* d'antigènes et d'acides nucléiques

Il existe différentes techniques pour la détection directe des protéines, des antigènes ou des acides nucléiques d'un agent pathogène dans les tissus ou les fluides corporels d'un animal. Dans certains cas, la même technologie peut être appliquée à la détection des anticorps dans le sérum.

#### 5.1. Immunofluorescence

Les tests d'immunofluorescence (IF) sont utilisés pour la détection d'agents pathogènes dans les tissus ou les fluides corporels des animaux au moyen d'anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes cibles. Comme la méthode repose sur la liaison directe des anticorps marqués aux antigènes de l'agent infectieux présents dans l'échantillon, elle est communément appelée immunofluorescence directe. Cette méthode est couramment utilisée dans les laboratoires diagnostiques, par exemple pour la détection du virus rabique dans le cerveau d'animaux péris ou pour celle du virus de la peste porcine classique dans les tissus de porcs suspects.

Une modification de l'IF peut être utilisée pour la détection d'anticorps spécifiques, produits par le système immunitaire contre divers pathogènes au cours de l'infection. Pratiquement, cette modification consiste à utiliser un anticorps secondaire spécifique aux anticorps de l'espèce examinée. Cette procédure est communément appelée immunofluorescence indirecte. Elle est couramment utilisée dans les laboratoires diagnostiques pour la détection des anticorps produits comme toute une série d'agents pathogènes tels que le virus de la peste porcine africaine (Cubillos et al., 2013), *Coxiella burnetii*, l'agent responsable de la fièvre Q (Roest et al., 2013) ou de nombreux autres agents infectieux en médecine vétérinaire.

Une autre modification de l'immunofluorescence directe se sert d'un anticorps primaire non marqué, dérivé d'une espèce spécifique, pour reconnaître un antigène spécifique à un agent pathogène, cet anticorps étant ensuite lié à un anticorps secondaire dirigé contre une immunoglobuline de l'espèce cible et conjugué à un fluorophore. Cette procédure est aussi couramment désignée par le terme d'immunofluorescence indirecte.

#### 5.2. Immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) consiste en la détection *in situ* des antigènes dans des tissus fixés, au moyen d'anticorps marqués. En complément à l'isolation dans les tissus du micro-organisme en cause, l'immunohistochimie est désormais un outil standard permettant l'identification des agents pathogènes dans les tissus et la confirmation des résultats obtenus à l'aide d'autres technologies diagnostiques. Plus sensible que l'examen histopathologique standard, l'immunohistochimie est couramment utilisée pour la détection des protéines prions anormales (PrP<sup>Sc</sup>) dans les tissus cérébraux en vue de confirmer un

diagnostic de tremblante, d'ESB ou d'autre encéphalopathie spongiforme transmissible (Thorgeirsdottir *et al.*, 2002). Récemment, des tests diagnostiques reposant sur l'immunohistochimie ont été développés avec succès et appliqués à la détection du virus rabique dans des échantillons cliniques (Rahmadane *et al.*, 2017). L'utilisation de l'immunohistochimie pour l'identification d'organismes ou d'autres marqueurs spécifiques à des maladies autoimmunes ou à des néoplasies augmente parallèlement à l'augmentation du nombre d'anticorps dirigés contre des antigènes définis.

En raison de l'utilisation de fixateurs pour préparer les échantillons, l'IHC offre de nombreux avantages par rapport aux méthodes d'isolation des agents pathogènes, dont :

- i) l'expédition facile des échantillons;
- ii) la manipulation sans risque d'agents pathogènes zoonotiques;
- iii) l'étude rétrospective d'échantillons conservés;
- iv) la rapidité; et
- v) la détection d'organismes non viables (Haines & Clark, 1991).

La fixation au formol pouvant dénaturer les épitopes antigéniques (c'est-à-dire la structure tridimensionnelle reconnue par certains anticorps), le facteur limitant à l'application de l'immunohistochimie réside dans l'identification d'une combinaison anticorps/antigène appropriée susceptible de se faire dans les tissus fixés au formol. Cette difficulté peut être contournée en ayant recours à des coupes congelées ou à des techniques permettant de démasquer l'antigène (p.ex. digestion par une enzyme protéolytique, utilisation de micro-ondes) avant l'immunocoloration.

### 5.3. Hybridation *in situ* (HIS)

Cette technologie exploite deux phénomènes naturels : le code ou la signature génétique unique qu'un agent pathogène contient dans son génome et la faculté des séquences d'acides nucléiques simple brin (ADN ou ARN) à s'hybrider ou à se lier à des séquences d'acides nucléiques simple brin complémentaires pour former des molécules hybrides double brin. Dans sa forme la plus simple, l'hybridation *in situ* (HIS) utilise des sondes ADN ou ARN simple brin d'origine synthétique et conçues pour être complémentaire à une courte région spécifique du génome d'un agent pathogène. Ces sondes sont couplées à des marqueurs faciles à détecter au microscope, tels que colorants fluorescents, nanoparticules fluorescentes ou enzymes, aptes à produire un produit chromogène lorsqu'ils sont traités avec un substrat.

La fourniture commerciale récente de réactifs pour l'HIS a rendu cette technique plus accessible et pourrait conduire, dans le futur, à son adoption plus large par les laboratoires diagnostiques. L'HIS pourrait trouver une application intéressante dans le développement rapide de tests pour la détection de nouveaux agents pathogènes émergents. Dès que les données de séquences générées par séquençage à haut débit (voir paragraphe D.vi) lors de l'identification d'un nouvel agent pathogène sont disponibles, des sondes peuvent être conçues et des essais développés. La production des réactifs anticorps/antigène nécessaires au développement d'immuno-essais prend, pour sa part, nettement plus de temps.

## E. INCIDENCE DES NOUVELLES TECHNOLOGIES

Il existe un certain nombre de tendances dans le développement des technologies diagnostiques, telles que le multiplexage des essais ou l'évaluation de la complexité biologique de l'infection, qui influenceront l'approche du diagnostic des maladies dans l'avenir ainsi que l'environnement du laboratoire, l'analyse des données et le contrôle des maladies.

- i) Le développement mondial de la technologie des puces a créé une tendance forte à la miniaturisation des formats de tests, à la fois dans les épreuves de détection moléculaire et protéique. Ces formats vont de quelques millimètres à plusieurs centimètres. En parallèle, toute une série d'outils diagnostiques simples, tels les dispositifs de flux latéral, ont été développés pour améliorer le diagnostic sur site (au chevet du patient) de nombreuses maladies. Cette évolution favorise la réalisation des tests sur site, permettant le diagnostic rapide et abordable de certaines maladies infectieuses. L'adéquation des infrastructures ainsi qu'une bonne

- préparation font partie intégrante de l'évolution technologique et doivent s'accompagner d'une formation à l'utilisation et à l'interprétation de ces méthodes.
- ii) La simplification des technologies, le développement de dispositifs plus petits, plus simples et plus abordables sont également observés dans d'autres domaines de la microbiologie diagnostique vétérinaire, par exemple dans les technologies de séquençage à haut débit. Le développement de dispositifs simples et l'amélioration des technologies de préparation des échantillons simplifieront l'analyse directe des séquences des échantillons cliniques, non seulement dans les instituts centraux, mais également sur site ou dans des laboratoires à l'équipement plus modeste, sur le terrain. Tout au long de ce chantier, il faudra veiller à ne pas se focaliser uniquement sur le développement technique rapide de l'équipement de séquençage mais, en parallèle, à renforcer les connaissances en bioinformatique et à entretenir les connaissances générales en médecine vétérinaire et en épidémiologie.
  - iii) Le développement de nouvelles sources de production et d'amplification du signal, qui remplacent la lumière par un mesurage de masse, par l'effet piézoélectrique ou encore par la concentration du ligand, mèneront au développement de nouvelles plateformes technologiques complètes.
  - iv) Même si le développement de nouvelles technologies est souvent synonyme de résultats plus rapides et de capacité améliorée, il faut toujours tenir compte de la valeur réelle et du rôle du test de confirmation dans le diagnostic ainsi que des manières de réagir des Autorités compétentes concernées. Dans ce contexte, l'expertise présente dans les laboratoires garde toute son importance pour expliquer la pertinence et les limites des résultats d'analyses.
  - v) Les méthodes traditionnelles et bien comprises qui utilisent des équipements à bas coût sont de plus en plus remplacées par des méthodes plus complexes nécessitant des investissements accrus. Ces méthodes plus récentes requièrent souvent une plus grande diversité de compétences parmi le personnel de laboratoire et sont associées à un renouvellement plus fréquent des plateformes, dans la mesure où des systèmes relativement récents deviennent redondants. Ceci a des répercussions en termes de financement des laboratoires et de structure des réseaux de laboratoires, à l'intérieur d'un pays ou entre pays, au gré de la spécialisation accrue des laboratoires.
  - vi) Il est toujours plus attendu des laboratoires de référence que l'analyse approfondie des agents pathogènes, par exemple par le séquençage à haut débit, fasse partir de leurs opérations. Comme expliqué ci-dessus, les plateformes de diagnostic sont en constante évolution, ce qui aura une incidence sur plusieurs éléments de la chaîne de contrôle des maladies. Il faudra développer des technologies de communication/systèmes d'information adéquats afin de collecter, de stocker et d'analyser systématiquement les grandes quantités de données produites par les nouvelles technologies, et ce, en relativement peu de temps. Ainsi, il y aura probablement une tendance croissante à la saisie en temps réel des résultats grâce aux plateformes mobiles. Ces tendances nécessiteront un développement continu de la bioinformatique, des systèmes d'information et des systèmes de traitement des données.
  - vii) Des méthodes dotées d'une sensibilité et d'une spécificité analytiques élevées sont de plus en plus couramment disponibles dans les laboratoires et permettent une identification rapide et une réponse tout aussi rapide aux maladies infectieuses des animaux, améliorant ainsi l'efficacité des méthodes de contrôle et d'éradication. Ces évolutions offrent de nouvelles possibilités d'identification et de caractérisation des agents infectieux ainsi qu'une amélioration du contrôle des maladies infectieuses en médecine vétérinaire.
  - viii) Les méthodologies nouvelles, basées sur les biotechnologies, ouvrent un large éventail de possibilités et de défis nouveaux en microbiologie diagnostique. C'est pourquoi, il est vivement conseillé de prendre en compte de nouvelles méthodes puissantes et d'introduire ces nouvelles technologies dans nos laboratoires diagnostiques. Néanmoins, il est important de définir quelles sont les capacités diagnostiques et la valeur de ces nouvelles technologies ainsi que la mesure dans laquelle elles sont susceptibles de remplacer les approches diagnostiques classiques. De manière générale, la manière la plus sûre est de maintenir un ensemble multidisciplinaire d'approches et de capacités diagnostiques dans nos laboratoires, afin d'offrir une combinaison pratique de technologies classiques et de nouvelles technologiques puissantes ainsi qu'un équilibre adéquat des connaissances en médecine vétérinaire de laboratoire, en infectiologie et en épidémiologie.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALAH M.E.E. & MUKHOPADHYAY S.C. (2017). Detection Methodologies for Pathogen and Toxins: A Review. *Sensors*, **17**, pii: E1885. doi: 10.3390/s17081885.
- ANGELETTI S. (2017). Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J. Microbiol. Methods*, **138**, 20–29. doi: 10.1016/j.jm.
- BANOWARY B., SARKER S., CONNOLLY J.H., CHENU J., GROVES P., AYTON M., RAIDAL S., DEVI A., VANNIASINKAM T. & GHORASHI S.A. (2015). Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using multiplex-PCR and high resolution melt curve analysis. *PLoS One*, **10**, p.e0138808.
- BARBULOVIC-NAD I., LUCENTE M., SUN Y., ZHANG M., WHEELER A.R. & BUSSMANN M. (2006). Bio-microarray fabrication techniques – a review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **26**, 237–259.
- BEDNARSKA N.G., WREN B.W. & WILLCOCKS S.J. (2017). The importance of the glycosylation of antimicrobial peptides: natural and synthetic approaches. *Drug Discov. Today*, **22**, 919–926. doi: 10.1016/j.drudis.2017.02.001. Epub 2017 Feb 16.
- BEERENS N., HEUTINK R., BERGERVOET S.A., HARDERS F., BOSSERS A. & KOCH G. (2017). Multiple Reassorted Viruses as Cause of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Epidemic, the Netherlands, 2016. *Emerg. Infect. Dis.*, **23**, 1974–1981.
- BELÁK S., KARLSSON O.E., BLOMSTRÖM A.L., BERG M. & GRANBERG F. (2013). New viruses in veterinary medicine, detected by metagenomic approaches. *Vet. Microbiol.*, **165**, 95–101. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.01.022.
- BELÁK S., THORÉN P., LEBLANC N. & VILJOEN G (2009). Advances in viral disease diagnostic and molecular epidemiological techniques. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **9**, 367–381.
- BERGMANN I.E., DE MELLO P.A., NEITZERT E. & GOMEZ I. (1993). Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bio-engineered non-structural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 825–832
- BERGUIDO F.J., BODJO S.C., LOITSCHE A. & DIALLO A. (2016). Specific detection of peste des petits ruminants virus antibodies in sheep and goat sera by the luciferase immunoprecipitation system. *J. Virol. Methods*, **227**, 40–46.
- BEXFIELD N. & KELLAM P. (2011): Metagenomics and the molecular identification of novel viruses. *Vet. J.*, **190**, 191–198.
- BOYD V., SMITH I., CRAMERI G., BURROUGHS A.L., DURR P.A., WHITE J., COWLED C., MARSH G.A. & WANG L.F. (2015). Development of multiplexed bead arrays for the simultaneous detection of nucleic acid from multiple viruses in bat samples. *J. Virol. Methods*, **223**, 5–12.
- BUSQUETS N., LARANJO-GONZÁLEZ M., SOLER M., NICOLÁS O., RIVAS R., TALAVERA S., VILLALBA R., SAN MIGUEL E., TORNER N., ARANDA C., NAPP S. (2019). Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia). *Transbound. Emerg. Dis.*, **66**, 617–621.
- CAI H.Y., CASWELL J.L. & PRESCOTT J.F. (2014). Nonculture molecular techniques for diagnosis of bacterial disease in animals: a diagnostic laboratory perspective. *Vet. Pathol.*, **51**, 341–350.
- CARNELL G.W., FERRARA F., GREHAN K., THOMPSON C.P. & TEMPERTON N.J. (2015). Pseudotype-based neutralization assays for influenza: a systematic analysis. *Front. Immunol.*, **6**, 161.
- CHEN T.H., LEE F., LIN Y.L., PAN C.H., SHIH C.N., TSENG C.H. & TSAI H.J. (2016). Development of a multiplex Luminex assay for detecting swine antibodies to structural and nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **49**, 196–207.
- CHOE L.H., GREEN A., KNIGHT R.S., THOMPSON E.J. & LEE K.H. (2002). Apolipoprotein E and other cerebrospinal fluid proteins differentiate ante mortem variant Creutzfeldt-Jakob disease from ante mortem sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Electrophoresis*, **23**, 2242–2246.

- CHRISTOPHER-HENNINGS J., ARAUJO K.P., SOUZA C.J., FANG Y., LAWSON S., NELSON E.A., CLEMENT T., DUNN M. & LUNNEY J.K. (2013). Opportunities for bead-based multiplex assays in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **25**, 671–691.
- CIOCCHINI A.E., SERANTES D.A., MELLI L.J., GUIDOLIN L.S., IWASHKIW J.A., ELENA S., FRANCO C., NICOLA A.M., FELDMAN M.F., COMERCI D.J. & UGALDE J.E. (2014). A bacterial engineered glycoprotein as a novel antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, **172**, 455–465.
- CORTINA M.E., BALZANO R.E., REY SERANTES D.A., CAILLAVA A.J., ELENA S., FERREIRA A.C., NICOLA A.M., UGALDE J.E., COMERCI D.J. & CIOCCHINI A.E. (2016). A Bacterial Glycoengineered Antigen for Improved Serodiagnosis of Porcine Brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, **54**, 1448–1455.
- CUBILLOS C., GÓMEZ-SEBASTIAN S., MORENO N., NUÑEZ M.C., MULUMBA-MFUMU L.K., QUEMBO C.J., HEATH L., ETTER E.M., JORI F., ESCRIBANO J.M. & BLANCO E. (2013). African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples. *Virus Res.*, **173**, 159–67. doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.021.
- CUCCUI J. & WREN B. (2015). Hijacking bacterial glycosylation for the production of glycoconjugates, from vaccines to humanised glycoproteins. *J. Pharm. Pharmacol.*, **67**, 338–350.
- DORMITZER P.R., SUPHAPHIPHAT P., GIBSON D.G., WENTWORTH D.E., STOCKWELL T.B., ALGIRE M.A., ALPEROVICH N., BARRO M., BROWN D.M., CRAIG S., DATTILO B.M., DENISOVA E.A., DE SOUZA I., EICKMANN M., DUGAN V.G., FERRARI A., GOMILA R.C., HAN L., JUDGE C., MANE S., MATROSOVICH M., MERRYMAN C., PALLADINO G., PALMER G.A., SPENCER T., STRECKER T., TRUSHEIM H., UHLENDORFF J., WEN Y., YEE A.C., ZAVERI J., ZHOU B., BECKER S., DONABEDIAN A., MASON P.W., GLASS J.I., RAPPUOLI R. & VENTER J.C. (2013). Synthetic generation of influenza vaccine viruses for rapid response to pandemics. *Sci. Transl. Med.*, **5**(185), 185ra68.
- FOWLER V.L., BANKOWSKI B.M., ARMSON B., DI NARDO A., VALDAZO-GONZALEZ B., REID S.M., BARNETT P.V., WADSWORTH J., FERRIS N.P., MIOULET V. & KING D.P. (2014). Recovery of viral RNA and infectious foot-and-mouth disease virus from positive lateral-flow devices. *PLoS One*, **9**(10):e109322.
- FU P., SUN Z., YU Z., ZHANG Y., SHEN J., ZHANG H., XU W., JIANG F., CHEN H. & WU W. (2014). Enzyme linked aptamer assay: based on a competition format for sensitive detection of antibodies to *Mycoplasma bovis* in serum. *Anal. Chem.*, **86**, 1701–1709.
- GELAYE E., LAMIEN C.E., SILBER R., TUPPURAINEN E.S., GRABHERR R. & DIALLO A. (2013). Development of a cost-effective method for capripoxvirus genotyping using snapback primer and dsDNA intercalating dye. *PloS One*, **8**(10):e75971.
- GELAYE E., MACH L., KOŁODZIEJEK J., GRABHERR R., LOITSCH A., ACHENBACH J.E., NOWOTNY N., DIALLO A. & LAMIEN C.E. (2017). A novel HRM assay for the simultaneous detection and differentiation of eight poxviruses of medical and veterinary importance. *Sci. Rep.*, **7**, 42892.
- GILL P. & GHAEMI A. (2008). Nucleic acid isothermal amplification technologies – a review. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **27**, 224–243.
- GRANBERG F., BÁLINT Á. & BELÁK S. (2016). Novel technologies applied to the nucleotide sequencing and comparative sequence analysis of the genomes of infectious agents in veterinary medicine. *Rev. Sci. Tech.*, **35**, 25–42.
- GUARDABASSI L., DAMBORG P., STAMM I., KOPP P.A., BROENS E. M. & TOUTAIN P.L. (2017). Diagnostic microbiology in veterinary dermatology: present and future. *Vet. Dermatol.*, **28**, 146.
- GUIARD J., PASZKIEWICZ E., SADOWSKA J. & BUNDLE D.R. (2013). Design and synthesis of a universal antigen to detect brucellosis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **52**, 7181–7185.
- GUTIÉRREZ-AGUIRRE I., RAČKI N., DREO T. & RAVNIKAR M. (2015). Droplet digital PCR for absolute quantification of pathogens. *Methods Mol. Biol.*, **1302**, 331–347.
- HANON J.B., VANDENBERGE V., DERUELLE M., DE LEEUW I., DE CLERCQ K., VAN BORM S., KOENEN F., LIU L., HOFFMANN B., BATTEN C.A., ZIENTARA S., BREARD E. & VAN DER STEDE Y. (2016). Inter-laboratory evaluation of the performance

- parameters of a Lateral Flow Test device for the detection of Bluetongue virus-specific antibodies. *J. Virol. Methods*, **228**, 140–150. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.12.001. Epub 2015 Dec 11.
- HAINES D.M. & CLARK E.G. (1991). Enzyme immunohistochemical staining of formalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. *Can. Vet. J.*, **32**, 295–302.
- HIDESHIMA S., HINO H., EBHARA D., SATO R., KUROIWA S., NAKANISHI T., NISHIMURA S.I. & OSAKA T. (2013). Attomolar detection of influenza A virus hemagglutinin human H1 and avian H5 using glycan-blotted field effect transistor biosensor. *Anal. Chem.*, **85**, 5641–5644.
- HOPPER D., WYLEZICH C. & BEER M. (2017). Loeffler 4.0: Diagnostic Metagenomics. *Adv. Virus Res.*, **99**, 17–37. doi: 10.1016/bs.aivir.2017.08.001. Epub 2017 Sep 21. Review. PMID: 29029726
- JANG K.S. & KIM Y.H. (2018). Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *J. Microbiol.*, **56**, 209–216. doi: 10.1007/s12275-018-7457-0
- KAILASA S.K., KODURU J.R., PARK T.J., WU H.F. & LIN Y.C. (2019). Progress of electrospray ionization and rapid evaporative ionization mass spectrometric techniques for the broad-range identification of microorganisms. *Analyst*, **144**, 1073–1103. doi: 10.1039/c8an02034e.
- KATSAFADOU A.I., TSANGARIS G.T., BILLINIS C. & FTHENAKIS G.C. (2015). Use of proteomics in the study of microbial diseases of small ruminants. *Vet. Microbiol.*, **181**, 27–33. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.07.017.
- KITTELBERGER R., MCFADDEN A.M., HANNAH M.J., JENNER J., BUENO R., WAIT J., KIRKLAND P.D., DELBRIDGE G., HEINE H.G., SELLECK P.W., PEARCE T.W., PIGOTT C.J. & O'KEEFE J.S. (2011). Comparative evaluation of four competitive/blocking ELISAs for the detection of influenza A antibodies in horses. *Vet. Microbiol.*, **148**, 377–383. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.08.014
- LEBLANC N., CORTEY M., FERNANDEZ PINERO J., GALLARDO C., MASEMBE C., OKURUT A.R., HEATH L., VAN HEERDEN J., SÁNCHEZ-VIZCAINO J.M., STÄHL K. & BELÁK S. (2013). Development of a suspension microarray for the genotyping of African swine fever virus targeting the SNPs in the C-terminal end of the p72 gene region of the genome. *Transbound. Emerg. Dis.*, **60**, 378–383. doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01359.x.
- LEE C., GASTON M.A., WEISS A.A. & ZHANG P. (2013). Colorimetric viral detection based on sialic acid stabilized gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.*, **42**, 236–241.
- LEVY S.E. & MYERS R.M. (2016). Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **17**, 95–115.
- LIANG R.L., DENG Q.T., CHEN Z.H., XU X.P., ZHOU J.W., LIANG J.Y., DONG Z.N., LIU T.C. & WU Y.S. (2017). Europium (III) chelate microparticle-based lateral flow immunoassay strips for rapid and quantitative detection of antibody to hepatitis B core antigen. *Sci. Rep.*, **7**, 14093.
- LIANG L., LENG D., BURK C., NAKAJIMA-SASAKI R., KAYALA M.A., ATLURI V.L., PABLO J., UNAL B., FICHT T.A., GOTUZZO E., SAITO M., MORROW W.J., LIANG X., BALDI P., GILMAN R.H., VINETZ J.M., TSOLIS R.M. & FELGNER P.L. (2010). Large scale immune profiling of infected humans and goats reveals differential recognition of *Brucella melitensis* antigens. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **4**(5):e673. doi: 10.1371/journal.pntd.0000673.
- LIBEAU G., DIALLO A., COLAS F. & GUERRE L. (1994). Rapid differential diagnosis of rinderpest and pestes des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Vet. Rec.*, **134**, 300–304.
- LIPKIN W.I. (2010). Microbe hunting. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, **74**, 363–377.
- LOGAN N., DUNDON W.G., DIALLO A., BARON M.D., JAMES NYARABI M., CLEVELAND S., KEYJU J., FYUMAGWA R., HOSIE M.J. & WILLET B.J. (2016a). Enhanced immunosurveillance for animal morbilliviruses using vesicular stomatitis virus (VSV) pseudotypes. *Vaccine*, **11**, 5736–5743.
- LOGAN N., MCMONAGLE E., DREW A.A., TAKAHASHI E., McDONALD M., BARON M.D., GILBERT M., CLEVELAND S., HAYDON D.T., HOSIE M.J. & WILLET B.J. (2016b). Efficient generation of vesicular stomatitis virus (VSV)-pseudotypes bearing morbilliviral glycoproteins and their use in quantifying virus neutralising antibodies. *Vaccine*, **34**, 814–822.

- LOIACONO M., MARTINO P.A., ALBONICO F., DELL'ORCO F., FERRETTI M., ZANZANI S. & MORTARINO M. (2017). High-resolution melting analysis of gyrA codon 84 and grlA codon 80 mutations conferring resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine clinical samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **29**, 711–715.
- LOZA-RUBIO E., AGUILAR-SETIÉN A., BAHLOUL CH., BROCHIER B., PASTORET P.P. & TORDO N. (1999). Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico. *Arch. Med. Res.*, **30**, 144–149.
- MCGIVEN J., HOWELLS L., DUNCOMBE L., STACK J., GANESH N.V., GUIARD J. & BUNDLE D.R. (2015). Improved serodiagnosis of bovine brucellosis by novel synthetic oligosaccharide antigens representing the capping m epitope elements of *Brucella* O-polysaccharide. *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 1204–1210.
- MCGIVEN J.A., THOMPSON I.J., COMMANDER N.J. & STACK J.A. (2009). Time-resolved fluorescent resonance energy transfer assay for simple and rapid detection of anti-*Brucella* antibodies in ruminant serum samples. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 3098–3107.
- MIGNON B., DUBUISSON J., BARANOWSKI E., KOROMYSLOV I., ERNST E., BOULANGER D., WAXWEILER S. & PASTORET P.P. (1991). A monoclonal ELISA for bovine viral diarrhoea pestivirus antigen detection in persistently infected cattle. *J. Virol. Methods*, **35**, 177–188.
- MOLESTI E., WRIGHT E., TERREGINO C., RAHMAN R., CATTOLI G. & TEMPERTON N.J. (2014). Multiplex evaluation of influenza neutralizing antibodies with potential applicability to in-field serological studies. *J. Immunol. Res.*, **2014**, 457932. doi:10.1155/2014/457932.
- MOLINA CABALLERO J.M., ANGUIANO A., FERRER O., SERRANO E. & UCEDA A. (1993). Use of an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of clinical paratuberculosis in goats. Study by western blotting of false-positive reactions. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12**, 629–638.
- NIELSEN K., GALL D., JOLLEY M., LEISHMAN G., BALSEVICIUS S., SMITH P., NICOLETTI P. & THOMAS F. (1996). A homogeneous Fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J. Immunol. Methods*, **195**, 161–168.
- OBERACKER P., STEPPER P., BOND D.M., HÖHN S., FOCKEN J., MEYER V., SCHELLE L., SUGRUE V.J., JEUNEN G.-J., MOSER T., HORE S.R., MEYENN F. VON, HIPPE K., HORE T.A. & JURKOWSKI T.P. (2019). Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation. *PLoS Biol.*, **17**(1): e3000107. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000107>
- OJHA S. & KOSTRZYNSKA M. (2008). Examination of animal and zoonotic pathogens using microarrays. *Vet. Res.*, **39**, 4.
- PATRAMOOL S., CHOUMET V., SURASOMBATPATTANA P., SABATIER L., THOMAS F., THONGRUNGKIAT S., RABILLOU T., BOULANGER N., BIRON D.G. & MISSÉ D. (2012). Update on the proteomics of major arthropod vectors of human and animal pathogens. *Proteomics*, **12**, 3510–3523. doi: 10.1002/pmic.201200300.
- PAVSIC J., ŽEL J. & MILAVEC M. (2016). Digital PCR for direct quantification of viruses without DNA extraction. *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 67–75.
- PRAUD A., DURÁN-FERRER M., FRETIN D., JAÏ M., O'CONNOR M., STOURNARA A., TITTARELLI M., TRAVASSOS DIAS I. & GARIN-BASTUJI B. (2016). Evaluation of three competitive ELISAs and a fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. J.*, **216**, 38–44. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.06.014.
- RAHMADANE I., CERTOMA A.F., PECK G.R., FITRIA Y., PAYNE J., COLLING A., SHIELL B.J., BEDDOME G., WILSON S., YU M., MORRISY C., MICHALSKI W.P., BINGHAM J., GARDNER I.A. & ALLEN J.D. (2017). Development and validation of an immunoperoxidase antigen detection test for improved diagnosis of rabies in Indonesia. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **11**(11):e0006079. doi: 10.1371/journal.pntd.0006079.
- REN M., LIN H., CHEN S., YANG M., AN W., WANG Y., XUE C., SUN Y., YAN Y. & HU J. (2018). Detection of pseudorabies virus by duplex droplet digital PCR assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **30**, 105–112. doi: 10.1177/1040638717743281.
- ROEST H.I., BOSSERS A. & REBEL J.M. (2013). Q fever diagnosis and control in domestic ruminants. *Dev. Biol. (Basel)*, **135**, 183–189. doi: 10.1159/000188081. Review.

SAIKI R., GEFLAND D., STOFFEL S., SCHANF S., HIGUCHI R., HORN G., MULLIS K. & ERLICH H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, **293**, 487–491.

SÁNCHEZ-MATAMOROS A., BECK C., KUKIELKA D., LECOLLINET S., BLAISE-BOISSEAU S., GARNIER A., RUEDA P., ZIENTARA S. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2016). Development of a Microsphere-based Immunoassay for Serological Detection of African Horse Sickness Virus and Comparison with Other Diagnostic Techniques. *Transbound. Emerg. Dis.*, **63**, e270–e277. doi: 10.1111/tbed.12340

SANGER F., NICKLEN S. & COULSON A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **74**, 5463–5467.

SCHALLER O., FATZER R., STACK M., CLARK J., COOLEY W., BIFFIGER K., EGLI S., DOHERR M., VANDELDELDE M., HEIM D., OESCH B. & MOSER M. (1999). Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrPSc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **98**, 437–443.

SCHREUR P.J.W., PAWESKA J.T., KANT J. & KORTEKAAS J. (2017). A novel highly sensitive, rapid and safe Rift Valley fever virus neutralization test. *J. Virol. Methods*, **248**, 26–30.

SUTANDY F.X., QIAN J., CHEN C.S. & ZHU H. (2013). Overview of protein microarrays. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, Chapter 27, Unit 27.1. doi: 10.1002/0471140864.ps2701s72.

THORGEIRSDOTTIR S., GEORGSSON G., REYNISSON E., SIGURDARSON S. & PALSDOTTIR A. (2002). Search for healthy carriers of scrapie: an assessment of subclinical infection in an Icelandic scrapie flock by three diagnostic methods and correlation with PRP genotypes. *Arch. Virol.*, **147**, 709–722.

TORRE-ESCUADERO E., PÉREZ-SÁNCHEZ R., MANZANO-ROMÁN R. & OLEAGA A. (2017). Schistosoma bovis–host interplay: Proteomics for knowing and acting *Mol. Biochem. Parasitol.*, **215**, 30–39. doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.07.009.

VIDIC J., MANZANO M., CHANG C. M. & JAFFREZIC-RENAULT N. (2017). Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. *Vet. Res.*, **48**, 11.

WATERS R.A., FOWLER V.L., ARMSON B., NELSON N., GLOSTER J., PATON D.J. & KING D.P. (2014). Preliminary validation of direct detection of foot-and-mouth disease virus within clinical samples using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification coupled with a simple lateral flow device for detection. *PLoS One*, **9**(8):e105630. doi: 10.1371/journal.pone.0105630. eCollection 2014.

WRIGHT E., TEMPERTON N.J., MARSTON D.A., MCELHINNEY L.M., FOOKS A.R. & WEISS R.A. (2008). Investigating antibody neutralization of lyssaviruses using lentiviral pseudotypes: a cross-species comparison. *J. Gen. Virol.*, **89**, 2204–2013.

WU X., XIAO L., LIN H., CHEN S., YANG M., AN W., WANG Y., YANG Z., YAO X. & TANG Z. (2018). Development and application of a droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) for detection and investigation of African swine fever virus. *Can. J. Vet. Res.*, **82**, 70–74.

WYLEZICH C., PAPA A., BEER M. & HÖPER D. (2018). A Versatile Sample Processing Workflow for Metagenomic Pathogen Detection. *Sci. Rep.*, **8**(1):13108. doi: 10.1038/s41598-018-31496-1. PMID: 30166611

YANG Z., XU G., REBOUD J., ALI S.A., KAUR G., MCGIVEN J., BOBY N., GUPTA P.K., CHAUDHURI P. & COOPER J.M. (2018). Rapid Veterinary Diagnosis of Bovine Reproductive Infectious Diseases from Semen Using Paper-Origami DNA Microfluidics. *ACS Sens.*, **3**, 403–409. doi: 10.1021/acssensors.7b00825.

YU X., XU D. & CHENG Q. (2006). Label-free detection methods for protein microarrays. *Proteomics*, **6**, 5493–5503.

\*  
\* \*

**N. B. : ADOPTE POUR LA PREMIERE FOIS EN 1996 : LES BIOTECHNOLOGIES DANS LE DIAGNOSTIC DES MALADIES INFECTIEUSES. DERNIERES MISES A JOUR ADOPTEES EN 2021.**