

Observation d'un cas de transmission maternelle de la tremblante chez le mouton

Observation of a maternal transmission of scrapie in sheep

Par C. COUQUET⁽¹⁾, M.J. CORNUEJOLS⁽¹⁾, A. FREMONT⁽¹⁾, S. ALLIX, K.H. EL HACHIMI⁽³⁾, K.T. ADJOU⁽²⁾, M.O. OUIDJA⁽²⁾, H. BRUGERE⁽²⁾, J. BRUGERE-PICOUX⁽²⁾
(communication présentée le 4 novembre 2004)

RÉSUMÉ

Dans le cadre du programme d'éradication de la tremblante en France, nous avons reçu une brebis gestante suspecte de tremblante le 11 janvier 2002, au laboratoire vétérinaire départemental de Limoges (confirmée ultérieurement par un Western Blot). Dix jours plus tard, la brebis agnela avec difficulté et nous avons dû intervenir pour l'aider. Cette assistance à l'agnelage nous permit d'isoler immédiatement le nouveau-né, en évitant tout contact ultérieur avec sa mère, en particulier sans la possibilité d'absorber le colostrum. L'agnelle fut placée dans un endroit isolé sans qu'il n'y ait de possibilité de transmission horizontale de la tremblante et fut nourrie avec des lactoreplaceurs. En août 2002, les premiers symptômes de la tremblante sont apparus chez l'agnelle née de cette brebis. Du fait d'une évolution vers le décubitus, l'euthanasie de l'agnelle fut décidée le 18 décembre 2002. La confirmation d'une tremblante naturelle chez l'agnelle a été obtenue par le Western-Blot et les examens immunohistochimiques. Le génotype de l'agnelle était ARQ/VRQ. Cette première confirmation d'une transmission maternelle de la tremblante chez le mouton s'accompagne aussi d'un temps d'incubation particulièrement court (6 mois) dans les conditions naturelles.

Mots-clés : tremblante, prion, transmission maternelle.

SUMMARY

A pregnant ewe with suspected scrapie was referred to the Regional Veterinary Laboratory in Limoges on 11 January 2002, in compliance with the French scrapie eradication program. Western Blot confirmed the diagnosis of scrapie. Ten days later, the ewe gave birth. As we had to help the ewe, we were able to isolate the ewe lamb before she had any contact with her mother, and especially no colostrum. The ewe lamb was fed with milk replacers and isolated to prevent all possibility of horizontal transmission of scrapie. In August 2002, the first symptoms of scrapie appeared in the ewe lamb. Euthanasia was decided on 18 December 2002, as the animal was no longer able to stand. Western Blot and immunohistochemistry tests confirmed natural scrapie in the ewe lamb. PrP genotyping of this lamb was ARQ/VRQ. This first confirmed case of maternal transmission of scrapie in sheep is associated with a particularly short incubation time (6 months) in natural conditions.

Key words : scrapie, prion, maternal transmission.

(1) Laboratoire Vétérinaire Départemental, Limoges, France.

(2) Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Pathologie du Bétail, Maisons-Alfort, France.

(3) EPHE/INSERM 106, Hôpital de la Salpêtrière, Paris, France.

• INTRODUCTION

Pour lutter contre la tremblante, il importe surtout de connaître les modes de transmission dans les conditions naturelles. Depuis les travaux de CUILLE et CHELLE (1938), dans les années trente, on sait que la tremblante peut être transmise du mouton au mouton ou du mouton à la chèvre au sein du troupeau. De nombreuses études ont suggéré une transmission latérale (ou horizontale), en particulier la publication en 1996 des observations de HOURRIGAN et KLINGSPORN (1996) constatant que le maintien des agneaux dans un troupeau contaminé augmentait de façon significative le risque de survenue de tremblante⁽⁴⁾. Cette transmission latérale pourrait être liée à la contamination de l'environnement ou résulter d'un contact étroit entre les animaux. D'autres modes de contamination peuvent aussi exister telle une contamination iatrogène : des vaccins ont pu être à l'origine de cas de tremblante en Ecosse dans les années soixante et en Italie, il y a une décennie. La transmission latérale (d'animal à animal) de la tremblante ovine a été démontrée récemment par RYDER *et al.* (2004) avec l'introduction de brebis néo-zélandaises âgées de 26 ou 30 mois dans un troupeau atteint. Ces brebis ont été contaminées ainsi que leur progéniture (présence de la protéine prion pathologique dans le tissu lymphoïde des mères et mortalité due à la tremblante chez leurs agneaux). Cette observation, confirmant une transmission latérale, n'exclut pas une possibilité de transmission maternelle.

La transmission maternelle a souvent été évoquée comme un dogme. Dès 1965, DICKINSON *et al.* (1965) avaient conclu à la possibilité d'une transmission maternelle de la tremblante chez le mouton de race Suffolk. On a d'abord établi que cette transmission dépend de la sensibilité génétique des individus, puis on a constaté que cette sensibilité ne résulte que de la détermination de la durée de l'incubation de la maladie : elle est plus courte chez les animaux plus sensibles présentant un polymorphisme VRQ du gène prion ovin sur les codons 136, 154 et 171 respectivement. La sélection génétique des animaux les plus résistants ARR/ARR (A-136, R-154, R-171) est actuellement remise en cause à long terme, depuis que des animaux homozygotes ARR, c'est-à-dire « résistants », ont montré leur sensibilité à l'agent de l'ESB dans les conditions expérimentales, par inoculation intracérébrale, ou ont présenté des cas « atypiques » de tremblante dans les conditions naturelles.

La nature infectieuse de l'agent de la tremblante a rapidement amené les scientifiques à rechercher les modalités de la transmission verticale de la tremblante. Une première expérience de PATTISON *et al.* (1972), a permis de démontrer l'infectiosité des placentas ovins. Ce fut la première étape dans la recherche d'une meilleure compréhension de la transmission maternelle de la tremblante, celle-ci pouvant atteindre une incidence de 10% dans un troupeau contaminé si l'on se rapporte aux études de HOURRIGAN et KLINGSPORN (1996). La transmission de la

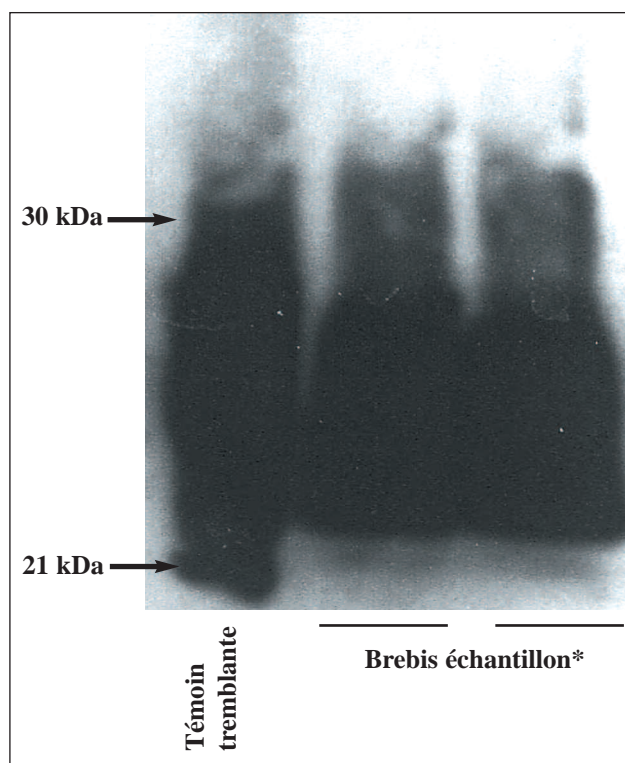


Figure 1 : Détection de la PrPres dans l'encéphale de la brebis, par Western Blot (Test Prionics). La PrPres est révélée, après action de la protéinase K, entre les deux marqueurs de poids moléculaire de 21 et 30 kDa. Le résultat obtenu sur les deux bandes de droite (*l'échantillon de la brebis a été déposé deux fois) est comparable à celui montré par la bande de gauche, obtenu à partir de l'encéphale d'un mouton atteint de tremblante, pris comme témoin.

mère à l'agneau est fréquemment suggérée dans les conditions de l'élevage, mais sa démonstration formelle se heurte à des biais inhérents au contagage qui a pu se produire dès les premiers instants après la mise-bas.

L'objet de notre communication concerne un cas de transmission maternelle de la tremblante rencontré dans des conditions naturelles chez le mouton où tout a été fait pour empêcher une contamination post-natale.

• COMMÉMORATIFS

Dans le cadre du programme d'éradication de la tremblante en France, nous avons reçu une brebis gestante suspecte de tremblante le 11 janvier 2002, au laboratoire vétérinaire départemental de Limoges.

Les symptômes observés étaient principalement de l'amaigrissement, une perte de laine et des tremblements. Dix jours plus tard, la brebis agnела avec difficulté et nous avons dû intervenir pour l'aider. Cette assistance à l'agnelage nous permit d'isoler immédiatement le nouveau-né, en évitant tout contact ultérieur avec sa mère, en particulier sans la possibilité d'absorber le colostrum. L'agnelle fut placée dans un endroit isolé, sans qu'il n'y ait de possibilité de transmission horizontale de la tremblante et elle fut nourrie avec des lactoreplaceurs.

(4) Selon la date de la séparation de l'agneau de sa mère (ou, après le sevrage, du troupeau), le risque d'apparition de la tremblante augmente progressivement : 10% à la naissance, 16% à 4 mois (au sevrage), 29% à 9 mois, 41% à 20 mois.



Figures 2 à 4 : Symptômes de la tremblante chez l'agnelle : prurit (figure 2), ataxie (figure 3) et évolution vers le décubitus (figure 4).

L'état de la brebis s'est détérioré progressivement, avec des troubles locomoteurs conduisant progressivement à un décubitus. Pour cette raison, nous avons décidé l'euthanasie de l'animal le 6 février 2002.

La confirmation de la tremblante naturelle chez cette brebis fut obtenue par la technique du Western-Blot avec le test Prionics (figure 1) et par la méthode ELISA de BioRad (densité optique : 3000) (voir ci-dessous la description des méthodes).

En août 2002, soit à l'âge de 6 mois, les premiers symptômes de la tremblante sont apparus chez l'agnelle issue de cette brebis. Ces symptômes, discrets, étaient des tremblements et un léchage excessif. Quelques semaines plus tard, les signes cliniques étaient plus évidents : prurit (figure 2), troubles locomoteurs avec ataxie (figure 3) et amaigrissement. Du fait d'une évolution vers le décubitus (figure 4), l'euthanasie de l'agnelle fut décidée le 18 décembre 2002 avec une forte suspicion de tremblante.

• MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les Western Blot ont été pratiqués soit selon la méthode « Prionics » au laboratoire vétérinaire départemental de Limoges (figure 1), soit selon la méthode « Bio-Rad » (figure 5)⁽⁵⁾. Les échantillons prélevés dans le système nerveux central (moelle cervicale de l'agnelle, *medulla* de moutons atteints de tremblante ou de témoins) ont été purifiés en utilisant la trousse de purification « Bio-Rad ». Les échantillons ont été repris dans un tampon (tampon de Laemli), puis les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire apparent par une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose et la PrPsc détectée par un anticorps monoclonal (SAF37, CEA, DSV/DRM/GIDTIP).

Les examens immunohistochimiques ont été pratiqués au laboratoire de pathologie du bétail de l'école nationale vétérinaire d'Alfort, dans quatre régions du système ner-



veux central : la moelle épinière (parties cervicale, thoracique et lombaire) et le striatum, après fixation dans une solution de formaldéhyde à 10 p. cent (additionnée de 7 p. cent de saccharose) et inclusion dans la paraffine. Les coupes, de 7 μ m d'épaisseur, ont été colorées par l'hématoxyline-éosine et le trichrome de Masson. Les examens immunohistochimiques ont été pratiqués sur des coupes sériées avec les anticorps anti-PrP 8G8 et SAF32⁽⁶⁾. Le génotypage de la protéine prion a été réalisé chez l'agnelle par le laboratoire Labogéna⁽⁷⁾.

• RÉSULTATS

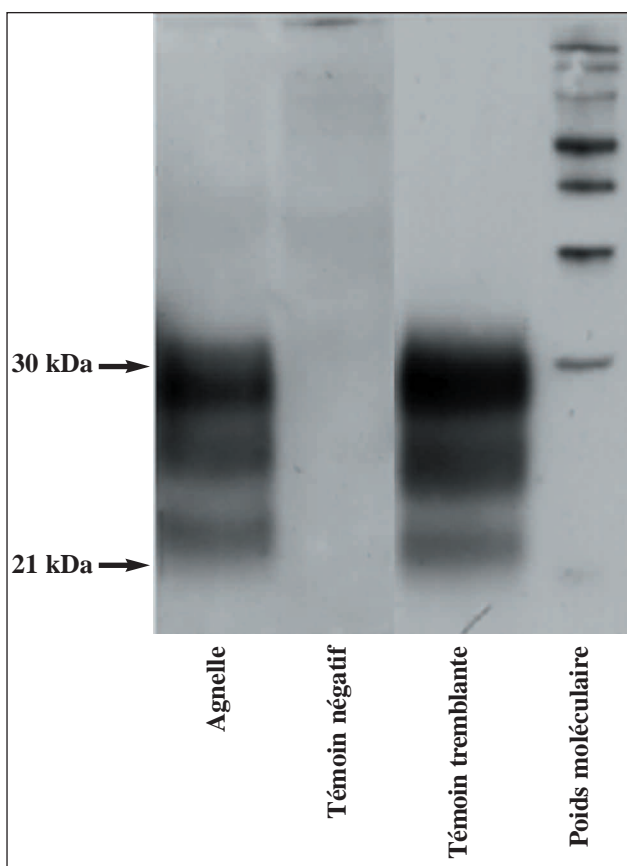
La confirmation d'une tremblante naturelle chez l'agnelle a été obtenue par la technique du Western-Blot (figure 5) et les examens immunohistochimiques (figures 6 à 10). Le génotype de l'agnelle était ARQ/VRQ.

L'examen histologique n'a pas permis de noter de spongieuse du neuropile ni de vacuolisation intraneuronale dans les régions étudiées. Cependant, la réaction astrocytaire était modérée dans la moelle épinière et plus évidente dans le striatum. Tous les prélèvements de la moelle épinière et

(5) Cette méthode a été réalisée au CEA par E. COMOY et J-P. DESLYS au « CEA, DSV/DRM/GIDTIP » de Fontenay aux Roses .

(6) Dr J. Grassi (CEA Saclay) et SpiBio.

(7) Laboratoire Labogéna, INRA, Jouy-en-Josas.



Figures 5 : Détection de la PrPres dans l'encéphale de l'agneau, par Western-Blot (Test Bio-Rad) (bande 1) : le résultat est comparable à celui obtenu à partir de l'encéphale d'un mouton atteint de tremblante (bande 3). La bande 2 correspond à un témoin négatif, la PrP normale ayant été dégradée par le traitement par la protéinase K.

du striatum ont permis de noter des amas de PrPres* (figures 6 à 10). Cette réaction immunohistochimique, surtout importante avec l'anticorps 8G8, concernait toutes les parties de la substance grise de la moelle épinière. Des dépôts de PrP périneuronaux ont été aussi observés autour des motoneurons (figures non présentées). La substance blanche présentait des réactions immunohistochimiques plus discrètes. Les dépôts de PrPres étaient plus abondants au niveau de la substance grise de la moelle épinière et de nombreuses parties de cette région cérébrale montraient des dépôts granulaires et des dépôts de type astrocytaire. Des dépôts importants de PrPres sont aussi observés dans la couche épendymaire du ventricule latéral.

• DISCUSSION

Cette observation correspond à la première description d'un cas de transmission maternelle de la tremblante dans les conditions naturelles avec, par ailleurs, un temps d'incubation exceptionnellement court.

Transmission maternelle

La nature infectieuse de l'agent de la tremblante a amené les scientifiques à rechercher les modalités de la

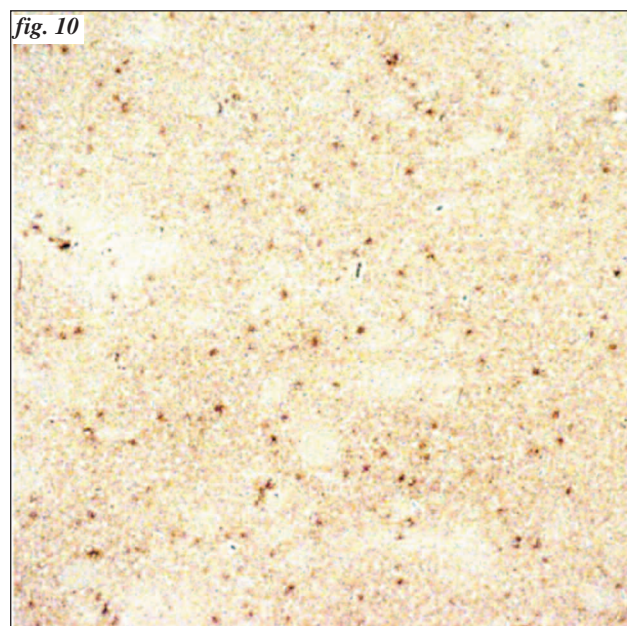
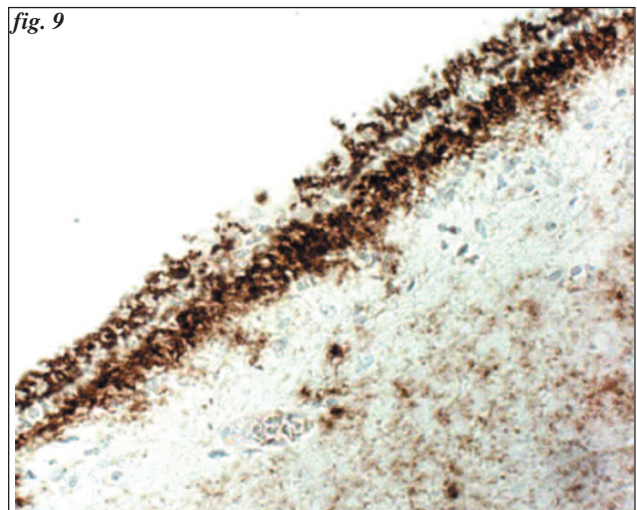
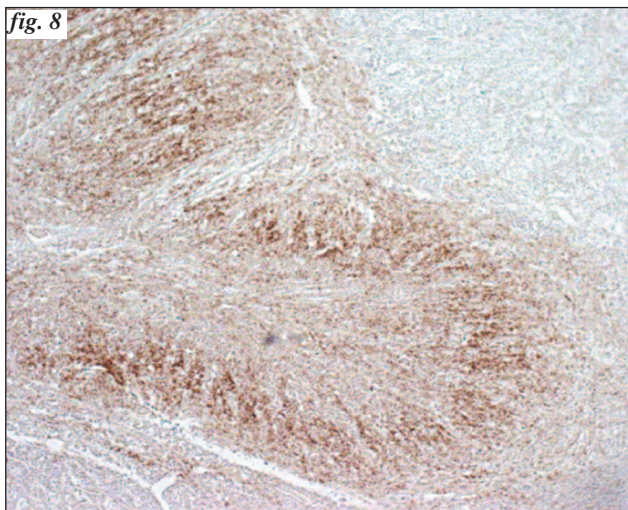
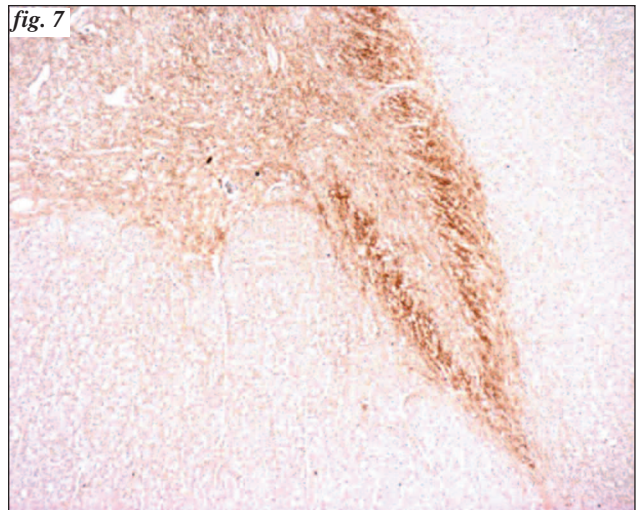
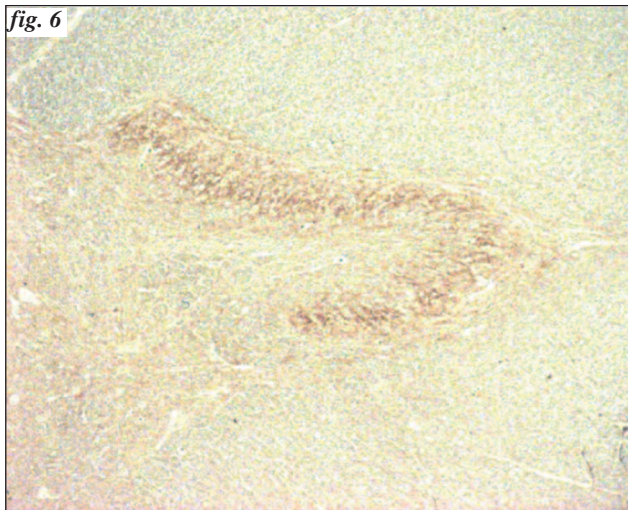
transmission verticale de cette affection. Après les expériences de PATTISON *et al.* (1972, 1974), qui ont démontré l'infectiosité des placentas ovins et la contamination intra-espèce par voie orale, d'autres études ont confirmé soit cette infectiosité des placentas, soit la présence de la protéine prion pathologique dans les tissus de l'appareil génital (TUO *et al.*, 2002 ; ANDREOLETTI *et al.*, 2002). Par inoculation à la souris, HOURRIGAN et KLINGSPORN (1996) ont montré le caractère infectieux du liquide amniotique, de l'utérus, de l'ovaire, des cotylédons et du fœtus. L'infectiosité des placentas est proportionnelle à l'importance du dépôt de la protéine prion pathologique et était associée à la présence d'une tremblante chez la brebis (RACE, JENNY et SUTTON, 1998).

Cependant, il a toujours été difficile de connaître les modalités exactes de cette transmission maternelle (transmission *in utero* de la mère au fœtus ou transmission périnatale au moment de l'agnelage). Les annexes foetales souillent abondamment le périnée et la mamelle, ainsi que l'environnement. L'agneau peut alors se contaminer lors de la tétée ou par léchage. Des séries de transmissions expérimentales de la tremblante (souche SSBP/1) et de l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) à des moutons, sur plus de 8 années, ont permis de constater un faible taux de transmission maternelle par l'agent de la tremblante, ce qui ne semble pas le cas pour l'agent de l'ESB (FOSTER *et al.*, 2004a ; HUNTER et FOSTER, 2004). Récemment, FOSTER *et al.* (2004 b) ont démontré expérimentalement par transfert embryonnaire que la transmission maternelle était possible chez l'agneau avant la naissance, c'est-à-dire *in utero* (deux des cinq agneaux atteints de tremblante et nés de brebis porteuses ont été obtenus par césarienne). Il est admis que les embryons collectés au cours de leur vie libre, en vue de leur transfert, ne sont pas infectés : FOSTER *et al.* (1996) ont en effet montré que le transfert d'embryon permettait d'éviter la transmission de la tremblante : les brebis porteuses indemnes donnent naissance à des agneaux indemnes de tremblante à partir d'embryons issus de brebis malades. Une transmission *in utero* ne paraît donc devoir survenir qu'à partir du stade de l'implantation. Deux possibilités peuvent exister après franchissement du placenta par l'agent infectieux pour contaminer le conceptus, soit la voie sanguine foetale, soit la voie du liquide amniotique (dont l'infectiosité a été démontrée par HOURRIGAN et KLINGSPORN, 1996), ce liquide étant dégluti au cours de la vie foetale.

Temps d'incubation

Cette première confirmation d'une transmission maternelle de la tremblante chez le mouton s'accompagne aussi d'un temps d'incubation particulièrement court (6 mois). Habituellement, le temps d'incubation de la tremblante ovine est d'environ une à deux années (avec une diminution de cette durée dans les troupeaux très atteints du fait de l'adaptation des souches de l'agent transmissible à la génétique des animaux de ces élevages). Les durées minimales d'incubation signalées dans la littérature sont généralement proches de 10 mois (JOUBERT *et al.*, 1972 ; ZLOTNIK et KATIYAR, 1961).

* PrPres: abréviation pour « Protéine Prion résistante », qui désigne la forme pathologique (résistante aux protéases) de la Protéine Prion cellulaire (PrPc) détruite pas ces mêmes enzymes, qui constitue la forme normale.



Figures 6 à 10 : Détection de la PrPres par immunohistochimie dans le système nerveux central de l'agneau : dans la moelle épinière cervicale (figure 6, Gx50), dans la moelle épinière thoracique où la réaction immunohistochimique est plus marquée dans la substantia gelatinosa (figure 7, Gx120), dans la moelle épinière lombaire (figure 8, Gx120), dans le striatum, au niveau du ventricule latéral, avec une forte réaction de la couche épendymaire (Fig. 9, Gx5) et des dépôts granulaires avec réaction astrocytaire (figure 10, Gx120). Les coupes sont colorées par l'hématoxyline.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre du contrat européen Fair CT98-7021 avec le soutien financier de « McDonald's France Services ».

BIBLIOGRAPHIE

- ANDREOLETTI O, LACROUX C, CHABERT A, MONNEREAU L, TABOURET G, LANTIER F, BERTHON P, EYCHENNE F, LAFOND-BENESTAD S, ELSEN JM, SCHELCHER F (2002) PrPSc accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission, *J. General Virol.*, **83**, 2607-2616.
- CUILLE J, CHELLE PL (1938) Transmission expérimentale de la tremblante à la chèvre *C. R. Acad. Sci.*, **206**, 1058-1060.
- DICKINSON AG, YOUNG GB, STAMP JT, RENWICK CC (1965) An analysis of natural scrapie in Suffolk sheep. *Heredity*, **20**, 485-503.
- FOSTER JD, HUNTER N, WILLIAMS A, MYLNE MJA, MCKELVEY WAC, HOPE J, FRASER H, BOSTOCK C (1996) Observation on the transmission of scrapie in experiment using embryo transfer. *Vet. Rec.*, **138**, 559-562.
- FOSTER J, GOLDMANN W, PARNHAM D, DRUMMOND D, EATON S, MCKENZIE C, FERNIE K, CHONG A, MYLNE MJA, HUNTER N (2004a) Maternal transmission studies of BSE in sheep. *J. Gen. Virol.*, **85**, 3159-3163.
- FOSTER J, GOLDMANN W, PARNHAM D, DRUMMOND D, EATON S, MCKENZIE C, FERNIE K, CHONG A, MYLNE MJ, HUNTER N (2004b) Evidence for the in utero transmission of scrapie in sheep. In: *abstracts Prion 2004, 1st international conference of Neuroprion*, 24-28 mai, AbstractPosterA-O6, p 85.
- HOURRIGAN JL, KLINGSPORN AL (1996) Scrapie : Studies on vertical and horizontal transmission. In: Gibbs CJ, Editor. *Bovine spongiform encephalopathy. The BSE dilemma. Serono Symposia USA, Norwell, Massachusetts*. Springer, New York, 59-83.
- HUNTER N, FOSTER J (2004) Experimental evidence on maternal transmission of scrapie and BSE in sheep. In: *abstracts Prion 2004, 1st international conference of Neuroprion*, 24-28 mai, Abstract Oral-O6, p 36.
- JOUBERT L, LAPRAS M, GASTELLU J, PRAVE M, LAURENT D (1974) Un foyer de tremblante du mouton en Provence. *Bull. Soc. Méd. Vét. Méd. Comp.*, **74**, 165-184.
- PATTISON IH, HOARE MN, JEBBETT JN, WATSON WA (1972) Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Vet. Rec.*, **90**, 465-468.
- PATTISON IH, HOARE MN, JEBBETT JN, WATSON WA (1974) Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Brit. Vet. J.*, **130** (4), lxxv-lxxvii.
- RACE R, JENNY A, SUTTON D (1998) Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis. *J. Infectious Diseases*, **178**, 949-953.
- RYDER S, DEXTER G, BELLWORTHY S, TONGUE S (2004) Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy. *Research in Veterinary Sciences*, **761**, 211-217.
- TUO W, O'ROURKE KI, ZHUANG D, CHEEVERS WP, SPRAKER TR, KNOWLES DP (2002) Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrPSc accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. *PNAS*, **99**, 6310-6315.
- ZLOTNIK I, KATIYAR RD (1961) The occurrence of scrapie disease of the remote Himalayan foothills. *Vet. Rec.*, **73**, 543-544.