

# Les avortements chez la jument : bilan de trois années d'étude dans le Calvados

## *Equine abortions: review of a three-year study in Calvados (France)*

Par Guillaume FORTIER<sup>(1)</sup>, Albertine LEON<sup>(1)</sup>, Jacky TAPPREST<sup>(2)</sup>,  
Pierre-Hugues PITEL<sup>(1)</sup> et Stéphane PRONOST<sup>(1)</sup>  
(communication présentée le 20 avril 2006)

### RÉSUMÉ

Les causes indéterminées d'avortement en Basse Normandie représentaient environ 25 % des cas confiés aux laboratoires spécialisés. Le but de ce travail a consisté à améliorer les outils de dépistage sur avortons en utilisant des méthodes de biologie moléculaire sensibles et spécifiques, et à évaluer l'importance de certains pathogènes encore peu recherchés dans les avortements équins. Le protocole retenu comprenait des extractions d'ADN et ARN sur plusieurs organes cibles de l'avorton et le placenta ; des tissus fœtaux étaient conservés en vue d'analyse anatomopathologique de confirmation. Nous présentons ici les résultats préliminaires obtenus en PCR sur quelques causes d'avortement, ainsi que les premiers résultats français portant sur l'identification des leptospires, du virus de l'artérite virale et de *Neospora caninum* chez plus de 400 avortons. L'amélioration des méthodes de détection permet de montrer que les herpès virus demeurent les principaux pathogènes mis en cause et représentent 5 % des causes précédemment non déterminées, les leptospires, le parasite *Neospora caninum* et le virus de l'artérite virale, représentant quant à eux 2,25 % de ces causes. Certaines analyses sont en cours pour d'autres pathogènes et l'ensemble de ce travail devrait permettre de descendre à moins de 15 % le pourcentage des causes indéterminées d'avortement chez la jument.

**Mots-clés :** cheval, avortement infectieux, biologie moléculaire, PCR.

### SUMMARY

Specialist laboratories in Lower Normandy found that approximately 25% of equine abortions are of unknown aetiology. The objective of the present study was to improve diagnostic tools on aborted foetuses using sensitive and specific molecular biology methods, and to evaluate the impact of pathogens so far given little consideration in equine abortion studies. The chosen protocol included DNA and RNA extractions from different foetal organs and placenta, as well as the storage of foetal tissues for pathology analyses. We present here preliminary PCR results identifying a few abortion-inducing pathogens, and the first French results on *Leptospira*, viral arteritis virus and *Neospora caninum* obtained from over 400 foetuses. Herpesviruses remain the main pathogens detected, due to improved detection methods (5%), whereas *Leptospira*, *Neospora caninum* and the EVA virus together account for 2.25% of newly identified cases. Further analyses on other pathogens are ongoing. This study is expected to reduce to less than 15% the rate of equine abortions of unknown origin.

**Key words:** horse, infectious abortion, molecular biology, PCR.

(1) Laboratoire Frank Duncombe, 14053 Caen  
(2) AFSSA LERPE, 14430 Dozulé.

## • INTRODUCTION

Les avortements représentent une cause de perte économique majeure pour l'élevage du cheval. Chez la jument, l'avortement désigne, de façon consensuelle, l'expulsion d'un fœtus mort ou non viable entre le 40<sup>e</sup> et le 300<sup>e</sup> jour de gestation, pour une durée normale de gestation de 340 jours.

Le vétérinaire est l'acteur principal du processus à mettre en œuvre lors d'avortement dans un élevage. Ses missions sont de :

- protéger l'exploitation de la contagiosité éventuelle du fœtus,
- traiter la jument,
- obtenir rapidement des informations sur les causes,
- examiner attentivement les congénères de la jument ayant avorté.

La connaissance rapide des causes d'avortement est importante car un certain nombre d'agents infectieux responsables sont contagieux et aussi potentiellement responsables de zoonoses (salmonellose, listériose, leptospirose, chlamydie...)

La physiopathologie des avortements chez la jument relève des mécanismes classiques décrits chez les mammifères (figure 1) dont la placentation est indéciduaire et épithéliochoriale.

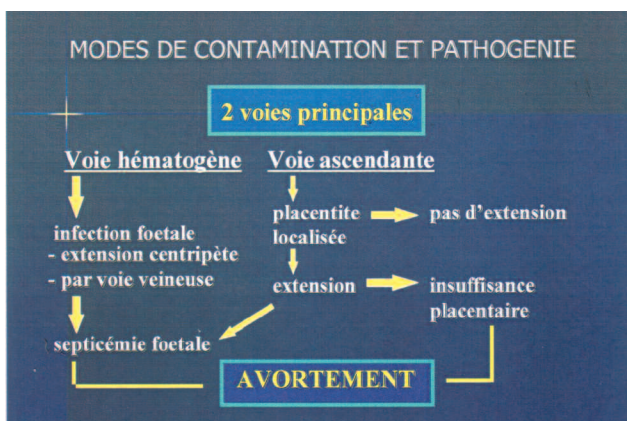


Figure 1 : Mécanismes principaux de déclenchement des avortements chez la jument.

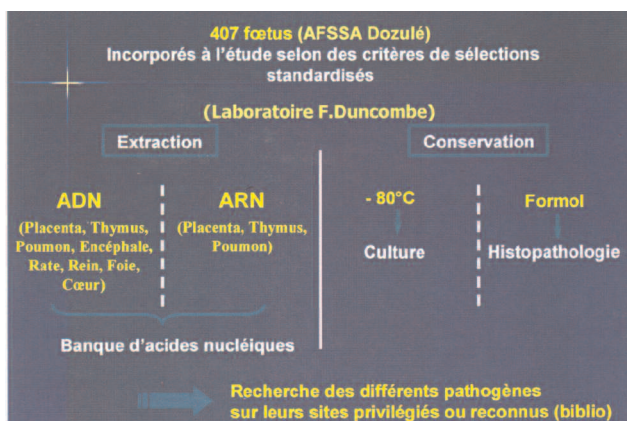


Figure 2 : Protocole technique utilisé pour l'exploitation des 407 fœtus retenus.

Avant 2003, des résultats synthétiques de l'AFSSA de Dozulé, portant sur plus de 900 avortons dans 7 départements du grand-Ouest, montraient que 25 % des causes d'avortement demeuraient inconnues, alors que 25 % des avortements pouvaient être attribués à des anomalies du développement (placenta, cordon, hydropisie des enveloppes, gémellité...) et 50 %, à des agents infectieux (bactéries, champignons, virus)

L'objectif du travail entrepris au laboratoire Frank Duncombe, entre 2003 et 2006, était de diminuer la part des causes indéterminées en utilisant de nouveaux outils de diagnostic. Les méthodes d'investigation ont beaucoup progressé sur le plan des examens systématiques macroscopiques et l'utilisation des outils de la biologie moléculaire, plus sensibles et spécifiques, permet de se « libérer » des contraintes d'acheminement des prélèvements, souvent responsables du déficit des résultats de terrain.

## • CONTEXTE DU PROJET

La fréquence des avortements est estimée entre 8 et 19 % selon les auteurs et les races de chevaux. Le pourcentage d'avortement d'origine indéterminée peut varier de 16 à 40 %, selon les moyens d'investigation mis en œuvre.

Le coût économique des recherches et le manque d'outils de dépistage adaptés aux laboratoires de diagnostic, ne permettent pas de réaliser l'ensemble des recherches souhaitées.

Le but de ce programme était d'essayer de réduire le pourcentage d'avortements inexplicables (en montrant le rôle joué par de nouveaux pathogènes pouvant être responsables d'avortements chez la jument ou des pathogènes connus pour lesquels les méthodes de diagnostic n'étaient pas adaptées), et de mettre en place de nouveaux outils de détection, facilement utilisables dans un laboratoire spécialisé en biologie équine.

Certains agents abortifs, bien connus chez l'Homme et les bovins, n'ont été que très peu décrits dans l'espèce équine. En effet, les informations sont souvent issues d'un ou deux laboratoires et aucune donnée précise n'existe à ce jour en France. Les données de la littérature font apparaître l'implication de bactéries comme les leptospires, *Coxiella burnetii* (agent responsable de la fièvre Q), *Chlamydomphila abortus* (HENNING, SACHSE et STING, 2000) et *Listeria monocytogenes* (WELSH, 1983), mais aussi de parasites comme ceux de la famille de *Neospora* (DUBEY et PORTERFIELD, 1990).

La plupart de ces agents pathogènes ont pu être détectés et identifiés grâce au développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire et en particulier, par les techniques d'amplification génique. En effet, les techniques classiques de culture bactérienne ne s'appliquent pas à la plupart de ces micro-organismes, *Chlamydomphila*, *Coxiella* et *Neospora* étant des micro-organismes intracellulaires stricts. Elles restent très difficiles à mettre en œuvre dans certains cas, comme par exemple la culture des leptospires.

La recherche systématique de ces nouveaux agents infectieux dans une population significative d'avortons équins, devrait permettre de diminuer le nombre d'avortements inexplicables, tout en permettant aux éleveurs de mieux se prémunir face à un danger mieux identifié.

Ce projet de recherche et d'identification de nouveaux pathogènes impliqués dans les avortements équinés en France a été réalisé grâce à trois laboratoires qui ont mis en commun leurs compétences : le laboratoire de microbiologie du CHU de Caen, le laboratoire départemental Frank Duncombe et l'AFSSA de Dozulé. Nous présentons ici les résultats obtenus à l'aide d'outils de la biologie moléculaire, sans faire état des recherches plus classiques qui doivent être menées en routine pour ce type de prélèvement. L'histologie et la bactériologie classique ne seront donc pas évoquées. La **figure 2** illustre l'ensemble du protocole mis en place.

#### • MATÉRIELS ET MÉTHODES

Jusqu'ici, les données ont été acquises grâce à des méthodes de cultures bactériennes (aérobies la plupart du temps) et à la recherche systématique du virus de la rhinopneumonie, agent abortif majeur chez la jument. Un tel protocole répondait à des impératifs économiques et au fait qu'en l'appliquant *a minima*, les causes de seulement 25% des avortements restaient inexplicables. Des données récentes de la bibliographie indiquant une amélioration de la mise en évidence de l'herpès virus (VAN MANNEN, 2002; GERST *et al.*, 2003 ; DIALLO *et al.*, 2006), nous avons opté, dans un premier temps, pour une recherche par une technique d'amplification génique (PCR) de type « consensuel », reconnaissant tous les herpès virus par l'amplification d'une région du génome de la polymérase virale très largement conservée au sein de cette famille. Dans le contexte épidémiologique français, la surveillance systématique en élevage de l'artérite virale des équidés nous a incités à incorporer ce dépistage viral supplémentaire par PCR.

La séroprévalence de la leptospirose et l'identification récente, chez les leptospires, du gène HaP (Hemolysin associated protein) commun à l'ensemble des leptospires pathogènes (genre *interrogans*), alors qu'il est absent chez les leptospires saprophytes (genre *biflexa*), nous a conduits aussi à incorporer leur recherche dans notre protocole. Nous y avons également ajouté la chlamydie et la fièvre Q du fait de l'absence, en France, de données chez les chevaux et compte tenu du pouvoir pathogène avéré des bactéries responsables dans l'espèce bovine.

Les résultats de DUBEY et PORTERFIELD (1990) rapportant, chez la jument, des avortements dus à *Neospora Caninum* et ceux, plus récents, concernant la séroprévalence de la néosporose, obtenus par le laboratoire (PITEL *et al.*, 2003), nous ont amenés à retenir aussi la recherche de parasite.

En définitive, lors d'avortements, nous avons recherché systématiquement la présence des herpès virus de types 1, 4, 5, 2, l'agent de l'artérite virale équine, les leptospires pathogènes et *Neospora caninum* et ceci, selon un protocole de prélèvement d'organes qui répondait le mieux à l'ensemble des investigations.

Enfin, une analyse histopathologique a pu être réalisée ; elle permettait de confirmer la présence de lésions tissulaires,

mais aussi celle de microorganismes comme les leptospires, bactéries spiralées visualisées par la coloration argentique, ou les virus reconnaissables par la coloration des inclusions intranucléaires. La présence de lésions renforçant le rôle potentiel joué par l'agent infectieux mis en évidence par PCR.

Les organes de 407 avortons (5<sup>e</sup> au 10<sup>e</sup> mois) ont été collectés (entre octobre 2002 et juin 2005), au cours de trois saisons de poulinage. Les extractions d'acide ribonucléique (ARN) avaient pour cible principale le virus de l'artérite virale équine (AVE) (DEL PIERO, 2000), tandis que les extractions d'acide désoxyribonucléique (ADN) étaient destinées aux autres bactéries, virus ou parasites. Les tissus prélevés et retenus correspondent à ceux mentionnés de façon consensuelle dans la littérature. Leur conservation dans le formol avait pour objectif de constituer une « banque de tissus », afin de valider les résultats de PCR lors de détection positive de pathogènes ou comme contrôle négatif lors de leur absence avérée. Nous ne présentons ici que les premiers résultats des analyses par PCR.

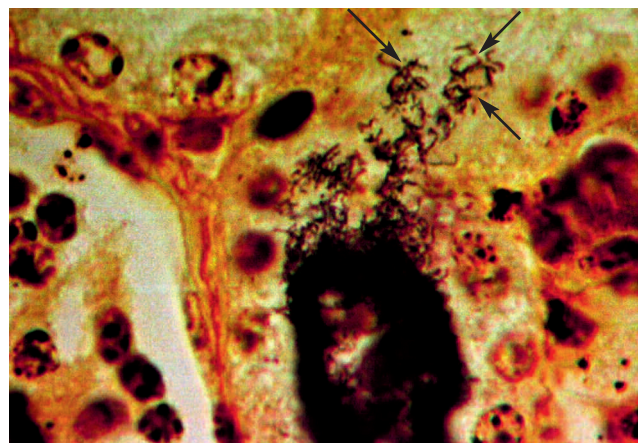
Les prélèvements sont effectués par l'AFSSA dès lors que l'avortement peut être inclus dans l'étude (commémoratifs, condition de fraîcheur des organes...)

#### • RÉSULTATS

##### Les leptospires

Les leptospires appartiennent à une famille complexe de bactéries spiralées réparties en deux classes : les leptospires pathogènes (*L. interrogans*) et les leptospires saprophytes (*L. biflexa*), comportant plus de 200 sérovars. Le test PCR révélant le gène *hap-1* permettait la discrimination de ces deux classes. Nous avons détecté 3 avortons positifs sur les 407 recueillis. Des analyses histopathologiques ont mis en évidence des lésions caractéristiques sur les organes ainsi que la présence de bactéries à l'aide de coloration spécifique (**figure 3**) (LEON *et al.*, 2006).

Les cultures bactériennes, en cours, vont nous permettre d'isoler les souches responsables d'avortement, puis de les caractériser et d'identifier par sérotypage le (les) sérovar(s).



**Figure 3** : Cliché pris en microscopie photonique, montrant la présence de leptospires sur une coupe de trophoblaste (coloration argentique).

### Les herpès virus équins

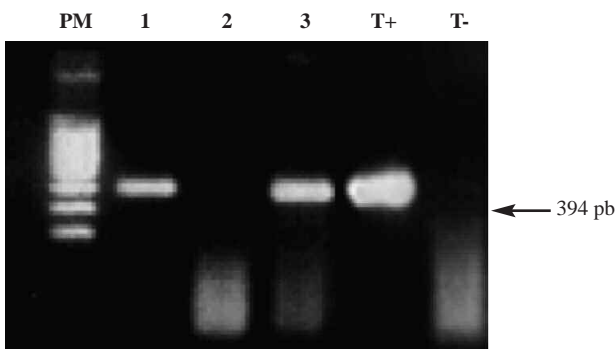
Plusieurs tests PCR ont été développés au laboratoire depuis 10 ans, afin de détecter les herpès virus équins (EHV-1, EHV-2, EHV-3, EHV-4) et en particulier, un test consensuel amplifiant une zone dite « ultra conservée » de la polymérase virale de cette famille. Cinquante deux poumons sur 404 et 42 placentas sur 286 étaient positifs. Le test PCR permettant de détecter sélectivement l'herpès virus équin de type 1 (EHV-1), montrait que 34 des 52 poumons (65 %) et 31 des 42 placentas (73 %) étaient positifs. Nous confirmons que l'EHV-1, virus responsable de la rhinopneumonie, est la principale cause virale d'avortements dans la population étudiée.

De plus, l'incorporation du placenta à l'étude, lorsqu'il était disponible, nous a permis de montrer la positivité de 10 placentas, alors que les poumons correspondants étaient négatifs. Ceci confirme les résultats de travaux étrangers antérieurs (SMITH *et al.*, 2004) et nous insistons sur l'importance d'associer cet organe dans la recherche systématique des causes d'avortement.

Parallèlement, des outils de PCR quantitative ont été développés en particulier pour l'herpès virus de type 1. Ils en permettent la détection plus rapide, en moins de 2 heures, tout en conservant la meilleure sensibilité et spécificité (publication soumise).

### L'artérite virale

Un avorton s'est révélé positif dans l'ensemble de l'étude. La figure 4 présente les signaux observés en gel d'agarose après amplification génique.



**Figure 4 :** Détection du virus de l'artérite par PCR. 1 : poumon, 2 : placenta, 3 : thymus, T+ : témoin positif (souche *Bucyrus* de référence), T- : témoin négatif (eau). On remarquera l'absence de signal dans le placenta, alors que poumon et thymus sont positifs. PM : marqueurs de poids moléculaire.

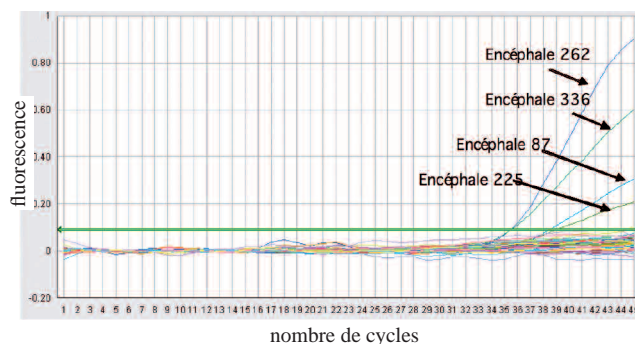
Aucune lésion caractéristique n'a été mise en évidence en histopathologie. Les poumons et thymus ont été mis en culture et la souche a pu être isolée. Elle est actuellement en cours de typage moléculaire, en collaboration avec l'équipe du Professeur P. Timoney (Maxwell Gluck Equine Research Center, Lexington, USA).

Ces résultats se montrent plutôt rassurants pour l'élevage et confirment les analyses génomiques faites en 2003 et 2004 par le Laboratoire national de référence de l'AFSSA d'Alfort : celui-ci montrait que pour le moment, seules des souches peu pathogènes (en comparaison avec les souches

américaines responsables d'avortements épidémiologiques dans le Kentucky), circulaient en France.

### *Neospora caninum*

Depuis août 2005, un nouveau test PCR, développé en partenariat entre le Laboratoire Frank Duncombe (LDFD 14) et la société Adia-gène (Ploufragan, Côte d'Armor), est aujourd'hui à notre disposition. Il présente l'avantage d'intégrer un contrôle interne d'amplification. Quatre encéphales sur les 407 analysés sont considérés aujourd'hui comme positifs, dont deux présentent des signaux de forte intensité, les échantillons 262 et 336. Les échantillons 225 et 87 sont faiblement positifs (nombre de cycles > 38) (figure 5)



**Figure 5 :** Détection de *Neospora caninum* par PCR en temps réel à partir d'encéphales d'avortons équins. La droite verte représente la limite du signal positif. Plus le nombre de cycles est faible lorsque la courbe sort de cette limite (36 cycles pour les encéphales 262 et 336), plus la quantité de génome est importante dans l'échantillon de départ. Toutes les courbes qui restent en dessous de la ligne verte correspondent à des échantillons négatifs.

En conclusion de nos premiers résultats, nous avons calculé, en prenant en compte, l'ensemble des pathogènes identifiés, que la mise en œuvre du protocole avait déjà fait baisser la proportion de causes indéterminées de 25 % à 16 %.

### • CONCLUSIONS

La mise en place d'un protocole lourd, systématique, sur plus de 400 avortons en Basse-Normandie depuis trois ans nous a permis d'améliorer la connaissance des causes d'avortements. D'autres analyses sont en cours d'exploitation et devrait nous donner un bilan aux alentours de 12 % de causes indéterminées au lieu des 25 %. Sur le plan épidémiologique, ces résultats sont globalement cohérents avec la plupart des travaux publiés. La leptospirose, malgré une forte séroprévalence, ne semble pas être une cause principale d'avortement, comme on pouvait s'y attendre. L'hypothèse d'un « portage » asymptotique de certains sérovars par le cheval mérite d'être mieux étudié.

La virus de la rhinopneumonie (EHV1) est bien une des causes majeures d'avortement infectieux chez la jument (plus de 10 %) et l'amélioration des protocoles de dépistage devrait contribuer à confirmer cette prévalence. Ce résultat reflète, assez fidèlement, la difficulté de protéger les élevages de l'atteinte par les herpès virus dont la latence contribue largement à la circulation dans les élevages, tout comme les bras-

sages d'animaux dans les haras, le stress des courses ou de l'entraînement. La difficulté de vacciner efficacement contre cette maladie avant l'âge de primo-infection (4 à 6 mois selon les études) montre bien l'intérêt des recherches actuelles du monde pharmaceutique, afin de mettre au point des vaccins de type recombinants ou des modes de présentations originaux des antigènes viraux au système immunitaire.

La surveillance de l'artérite virale (tests sérologiques pour les juments avant saillie et détection du virus dans le sperme chez l'étalon) et son passage récent au statut de maladie à déclaration obligatoire semblent être efficaces, mais il ne faut pas occulter le fait que les souches circulant à l'heure actuelle en France sont qualifiées de « faiblement pathogènes » (SAILLEAU *et al.*, 2003). Il est donc important de ne pas négliger ce dépistage systématique à partir des avortements et de continuer à assurer le typage génétique des souches retrouvées, notamment dans les spermes d'étalons excréteurs, qui sont les principaux vecteurs du virus en élevage.

D'autres résultats sont attendus vis-à-vis de pathogènes beaucoup moins recherchés chez les équidés que chez les bovins (*Chlamydiae*, *Coxiella*...). Ils devraient compléter l'ensemble de cette étude, de façon à proposer aux professionnels

de l'élevage et aux vétérinaires cliniciens des protocoles standardisés, issus des connaissances acquises par ces travaux. Pour ce faire, il faudra probablement raisonner comme en élevage de production, en distinguant les recherches préliminaires (protocole simple) à mettre en place au premier avortement déclaré, puis les recherches complémentaires (protocole lourd) lors de causes non élucidées et/ou d'avortements successifs au sein d'un groupe de juments.

Des questions restent en suspens quant aux analyses présentant des signaux positifs (PCR) sur lesquelles aucune lésion n'a pu être mise en évidence par les anatomopathologistes. Elles doivent nous inciter à prendre les résultats avec les précautions qui s'imposent et à interpréter l'ensemble avec le contexte épidémiologique de l'élevage dont le praticien a la charge quotidienne. On doit donc continuer à éprouver les techniques dites « rapides » (PCR) avant leur validation en diagnostic de routine et à mener des études complémentaires, de façon à mieux comprendre le rôle de pathogènes potentiels pour le cheval (*Chlamydiae*, *Coxiella*, *Neospora*...); toutefois, l'application au quotidien de ces outils moléculaires pourrait rapidement s'avérer indispensable pour les agents infectieux les mieux connus (herpès virus, virus de l'artérite virale, leptospires...).

## BIBLIOGRAPHIE

- DIALLO IS, HEWITSON G, WRIGHT L, RODWELL BJ, CORNEY BG (2006) Detection of equine type 1 using a real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **131**, 92-98.
- DEL PIERO F (2000) Equine viral arteritis. *Vet. Pathol.*, **37** (4), 287-296.
- DUBEY JP, PORTERFIELD ML (1990) *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *J. Parasitol.*, **76** (5), 732-734.
- GERST S, BORCHERS K, GOWER SM, SMITH KC (2003) Detection of EHV-1 and EHV-4 in placental sections of naturally occurring EHV-1 and EHV-4 related abortions in the UK: use of the placenta in diagnosis. *Equine Vet. J.*, **35**, 430-433.
- HENNING K, SACHSE K, STING R (2000) Demonstration of *Chlamydia* from an equine abortion. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, **107**, (2), 49-52.
- LEON A, PRONOST S, TAPPREST J, FOUCHER N, BLANCHARD B, ANDRE-FONTAINE G, LAUGIER C, FORTIER G, LECLERCQ R (2006) Identification of pathogenic *leptospira* by PCR in tissues of a premature foal in France. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **18**, 218-221.
- PITEL PH, ROMANDS S, PRONOST S, FOUCHER N, GARGALA G, MAILLARD K, THULLIEZ P, COLLOBERT-LAUGIER C, TAINTURIER D, FORTIER G, BALLETT JJ (2003) Investigation of *Neospora sp.* antibodies in aborted mares and *N. caninum* DNA in aborted equine fetuses from Normandy, France. *Vet. Parasitol.*, **118**, (1-2), 1-6.
- SAILLEAU C, GICQUEL B, FORTIER G, FORTIER C, PRONOST S, PITEL PH, ZIENTARA S. (2003) Caractérisation génétique de 18 souches de virus de l'artérite virale des équidés (EAV) isolées en France (en 2001-2002) à partir de sperme d'étalons excréteurs. In : *Proceeding de la 29<sup>e</sup> Journée de Recherche Equine*.
- SMITH KC, WHITWELL KE, BLUNDEN AS, BESTBIER ME, SCASE TJ, GERAGHTY RJ, NUGENT J, DAVIS-POYNTER NJ, CARDWELL (2004) Equine herpesvirus-1 abortion: atypical cases with lesions largely or wholly restricted to the placenta. *Equine Vet. J.*, **36**, 79-82.
- VAN MAANEN C (2002) Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update. *Vet. Q.*, **24**, 58-78.
- WELSH RD (1983) Equine abortion caused by *Listeria monocytogenes* serotype 4. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **82** (3), 291.

