

AVIS
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail
relatif à certaines mesures de la police sanitaire des encéphalopathies
spongiformes transmissibles (EST)

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie le 1^{er} mars 2011 par la Direction Générale de l'Alimentation d'une demande d'évaluation de certaines mesures de police sanitaire des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST).

2. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Les mesures de police sanitaire sur les EST prévues par le règlement (CE) n°999/2001¹ vont être partiellement ou totalement rediscutées en groupe de travail sur les EST à la Commission européenne. La DGAI souhaite disposer d'éléments scientifiques lui permettant :

- de déterminer la position française quant aux modifications que proposera la Commission
- de faire des propositions d'évolution réglementaire.

¹ Règlement européen (CE) n°999/2001 du Parlement européen et du conseil du 22 mai 2001 fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles.

Dans le cadre de cette réflexion, plusieurs questions scientifiques ont été identifiées :

I Concernant les bovins

Au niveau national, les exploitations cibles concernées par la police sanitaire nationale sont les exploitations qui hébergent des bovins qui, notamment :

- soit appartenait au cheptel de naissance du bovin atteint au cours de leurs 12 premiers mois d'existence et alors que le bovin atteint était âgé de moins de 12 mois
- soit ont été élevés au cours des 12 premiers mois de leur existence avec le bovin atteint alors que celui-ci était âgé de moins de 24 mois.

La DGAI s'interroge sur la pertinence de maintenir une mesure plus drastique dans les cheptels autres que ceux de naissance du cas index (âge maximal du cas index 24 mois versus 12 mois dans les troupeaux de naissance).

La réglementation européenne¹ prévoit que l'Etat membre puisse décider dans quel cheptel le bovin a été exposé aux agents de l'ESB. Une définition harmonisée des cheptels à risque pourrait être proposée.

Dans le but d'une harmonisation de la définition des cheptels à risque, l'Anses dispose-t-elle de nouveaux éléments scientifiques concernant l'âge le plus à risque pour l'infection des bovins par l'agent de l'ESB classique?

II Concernant les petits ruminants :

Dans la réglementation nationale², lors de la confirmation d'un cas de tremblante, la police sanitaire permet de rechercher le cheptel ayant pu contaminer l'animal atteint (risque amont) et les cheptels ayant éventuellement pu être contaminés par l'animal atteint (risque aval).

Pour la gestion du risque amont, seul le cheptel de naissance est recherché, pour abattage si le cas est sédentaire (car le cheptel est forcément atteint) ou surveillance renforcée si le cas est nomade.

Pour la gestion du risque aval, seuls les cheptels de mise bas sont recherchés. Dans le cas d'un ovin sédentaire, le cheptel de mise bas est le même que celui de naissance, ce cheptel est atteint et les animaux sensibles sont éliminés. Dans le cas d'un ovin nomade, le risque aval n'est géré par surveillance renforcée que dans les cheptels de mise bas (il n'y a donc pas de gestion du risque aval pour un bélier par exemple).

Par ailleurs, le règlement (CE) n°999/2001 impose actuellement pendant deux années au sein des cheptels atteints de tremblante classique (ovins sédentaires), une interdiction de cession à un autre éleveur des ovins de génotypes ARR/X non VRQ. La DGAI s'interroge sur la pertinence de cette mesure.

² Arrêté du 2 juillet 2009 fixant les mesures de police sanitaire relatives aux encéphalopathies spongiformes transmissibles ovines

Afin que la DGAI puisse apprécier la pertinence de cibler d'autres exploitations autres que celles actuellement concernées par la police sanitaire nationale, il est demandé à l'Anses de préciser :

- en relation avec la définition des cheptels à risque en amont des cas,
 - si de nouvelles données existent sur l'âge le plus à risque pour l'infection des petits ruminants,
- en relation avec la définition des cheptels à risque en aval des cas,
 - le risque associé aux fluides biologiques ou aux différentes voies d'excrétion des agents des tremblantes classique et atypique au sein de l'élevage (lait, urine, fèces, sang, gamètes....),
 - le risque de transmission verticale de l'agent de la tremblante en fonction de l'âge de la brebis mettant bas (par rapport au début de ses signes cliniques) et du génotype de la descendance.

Pour ces 3 questions, il est demandé d'évoquer le cas particulier des animaux de génotype ARR/XXX (codons d'intérêts 136, 154, 171 ayant une incidence sur la sensibilité à l'agent de la tremblante classique).

Enfin, l'avis de l'Afssa du 23 juillet 2009 précisait (selon l'avis majoritaire des experts du CES ESST) que le maintien des mesures de police sanitaire en cas de tremblante atypique n'était plus justifié. Il est demandé au Comité de préciser si le maintien du génotypage de 4 codons du gène de la protéine PrP pour les animaux testés présente encore un intérêt scientifique.

3. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par le comité d'experts spécialisé (CES) « ESST » réuni le 15/11/2011 et le 13/12/2011, et par voie télématique le 04/01/2012, le 05/02/2012 et le 8/03/2012 sur la base d'un rapport initial rédigé par 3 rapporteurs.

4. ANALYSE ET CONCLUSION DU CES

I Concernant les bovins :

La question de l'âge des bovins lors de l'infection par l'agent de l'ESB classique a été abordée dans l'avis du 9 octobre 2002 concernant la modification de la police sanitaire bovine (passage de l'abattage total et destruction du troupeau à l'abattage et destruction limitées aux animaux appartenant à la même cohorte du cas index), à partir des données publiées à l'époque et d'un rapport d'étude (Supervie, 2002).

« ... les résultats récents de modélisation sur les données françaises de surveillance clinique de l'ESB (Supervie, 2002) confortent les résultats des modèles britanniques (Anderson et al., 1996) sur l'âge à la contamination : ainsi, le taux de contamination serait le plus important avant un an (79% des contaminations), mais 16% des contaminations se dérouleraient entre un et deux ans, et 5% après deux ans.

Dans l'article original d'Anderson, les estimations de l'âge à la contamination, faites par rétrocalcul, font état d'un ajustement optimal aux données pour une fonction complexe de moyenne 1,31 ans et de variance 1,82. L'analyse de la courbe présentée en Fig 3d suggère un mode de l'âge à la contamination de 9 mois environ. Ce modèle montre donc la forte probabilité d'une contamination dans le jeune âge, cette période s'étendant au delà de un an dans une grande proportion de cas, de l'ordre de un quart à un tiers des cas. »

Depuis cet avis, l'étude française évoquée ci-dessus a été publiée (Supervie & Costagliola, 2004). Selon ces résultats de modélisation, basés sur des hypothèses et un modèle de rétro-calcul, l'infection a lieu pour l'essentiel entre 6 mois et 1 an, avec une distribution de l'âge à l'infection (estimations chiffrées faites à partir de la figure présentée dans l'article) montrant que 87% des cas sont infectés avant 1 an, 8% entre 1 et 2 ans, et 5% après 2 ans.

La seule autre étude parue depuis cette date sur l'âge à l'infection est britannique (Arnold & Wilesmith, 2004). Partant des modèles de rétrocalcul développés précédemment, cette étude montre une distribution de l'âge à l'infection un peu différente selon la saison de naissance (cohortes nées en automne contaminées pour l'essentiel entre la naissance et 6 mois ou entre 1 an et 18 mois versus cohortes nées au printemps contaminées préférentiellement entre la naissance et 1 an, ou entre 1,5 et 2 ans), 8 à 10% des infections ayant lieu entre 1 et 2 ans, et 1 à 2% ayant lieu après deux ans. Bien qu'on ne puisse dissocier précisément la période d'incubation de l'âge à l'infection (par exemple, un bovin contaminé à la naissance avec une incubation de la maladie de 5 ans et un bovin contaminé à l'âge d'un an avec une période d'incubation de 4 ans), on observe dans les différentes versions du modèle examinées dans ces travaux qu'une partie des animaux atteints d'ESB a été infectée entre 1 et 2 ans, et qu'une plus petite proportion l'a été après deux ans.

Globalement, ces résultats confortent les résultats antérieurs et soulignent les limites de ce type de modèle. Par rapport à la question posée, ils confortent l'idée qu'une partie des animaux est infectée entre 1 et 2 ans, même si cette proportion est relativement faible, de l'ordre de 10%.

Il est important de relever que ces modèles ont été construits à partir des données sur les cas d'ESB nés pour l'essentiel dans les années 80 et 90, dans la période de mise en place progressive des mesures de contrôle. Depuis 2001, l'interdiction totale des farines animales dans l'alimentation des animaux d'élevage a réduit très fortement le risque d'infection. Pour les animaux nés à partir de 2001, le risque d'infection éventuel serait lié à des sources d'infection résiduelles. On peut faire l'hypothèse que ces sources d'infection seraient du même type qu'auparavant, et de fait susceptibles d'infecter les animaux au même âge, mais ce n'est pas certain. Dans tous les cas, on se trouve actuellement dans une phase épidémiologique différente, caractérisée pour l'essentiel par un risque résiduel minime.

La question de la définition des cheptels à risque rejoint par ailleurs celle de la pertinence de la poursuite de l'abattage des cohortes de naissance des cas index, sur laquelle le CES ESST s'était prononcé dans un avis du 22 juillet 2011. Dans cet avis, le comité indiquait que «*le risque relatif de résultat faux négatif suite à un test de dépistage de l'ESB apparaît*

250 fois supérieur pour un bovin appartenant à la cohorte de naissance d'un cas d'ESB, par rapport à un bovin de la population générale testé à l'abattoir. Cependant le comité insiste sur le fait que le risque absolu pour le consommateur est représenté par le nombre de bovins faussement négatifs qui entreraient dans la chaîne alimentaire, si une ré-autorisation des animaux de la cohorte à la consommation humaine après un test était envisagée. Ce nombre, en raison de l'effectif réduit de bovins appartenant à des cohortes de cas d'ESB, apparaît extrêmement faible (0,0008 cas par an)».

Ces conclusions s'appliquent aux animaux qui auraient été élevés à un moment des douze premiers mois de leur existence avec le bovin atteint quand celui-ci avait moins de 24 mois. A cet égard, il serait préférable d'adopter un âge seuil identique pour la cohorte de naissance et celle de résidence.

Concernant les troupeaux dans lesquels un cas d'ESB atypique a été dépisté, il n'y a, à ce jour, aucune donnée scientifique permettant de fonder un avis quant au risque encouru par le consommateur lié aux autres animaux du troupeau ou de la cohorte d'âge.

II – Concernant les petits ruminants

II- 1 - risque associé aux différentes voies d'excrétion des agents des tremblantes classique et atypique au sein de l'élevage (lait, urine, fèces, sang, gamètes....)

Préambule :

Les techniques permettant la mise en évidence des prions (infectiosité et/ou protéine prion pathologique) dans les tissus et/ou les fluides biologiques des individus infectés ont beaucoup évolué au cours de ces dernières années. Elles permettent aujourd'hui la détection de niveaux extrêmement faibles de prions.

Il est essentiel de considérer qu'en matière de prion, pour un individu donné, d'autres paramètres que la dose infectieuse (la quantité de prions infectieux) déterminent la survenue d'une transmission : la voie d'exposition, la nature de l'agent concerné ainsi que les caractéristiques génotypiques (polymorphismes du gène Prnp) sont autant de paramètres déterminants de la propagation des prions dans l'organisme hôte.

L'approche la plus pertinente dans la démonstration d'un risque de transmission (par un tissu ou un fluide biologique) demeure l'inoculation à l'espèce cible, par la voie d'exposition jugée la plus proche des conditions naturelles d'exposition, par exemple : la voie transfusionnelle pour le sang, l'ingestion pour le lait. Ces travaux, de part leur coût, leur lourdeur et leur durée demeurent rares dans la littérature, et l'évaluation des risques de transmission doit généralement reposer sur d'autres approches. Il s'agit notamment de la mesure de l'infectiosité relative d'un tissu ou d'un fluide biologique par son inoculation à un modèle rapporteur (généralement par voie intracérébrale à un modèle rongeur conventionnel ou transgénique pour le gène Prnp). Cet outil permet de mettre en évidence une différence de titre infectieux entre différents échantillons ; leur virulence étant considérée comme directement corrélée au titre infectieux. L'avènement, au cours de la décennie écoulée, de modèles animaux transgéniques pour le gène Prnp, en abolissant (ou tout du moins réduisant fortement) le phénomène de barrière d'espèce a permis la mise en évidence de niveaux d'infectiosité faibles dans un certain nombre de tissus ou de fluides biologiques. Cependant en conditions naturelles d'exposition, il est rarement possible de leur imputer une participation à la transmission de la maladie.

Au-delà de l'infectiosité, la détection des prions repose également sur de nombreuses méthodes biochimiques de détection de la protéine prion anormale. Les méthodes de détection immunochimiques directes (ELISA, WB, ...) ont vu leur sensibilité s'accroître par l'adjonction de méthodes de concentration de la PrP anormale, avant d'être supplantées en termes de performance par des méthodes de pré-amplification (PMCA ou QUIC) *in vitro*. Les limites de détection de ces méthodes devenues extrêmement basses, permettent, dans la plupart des cas (à l'exception notable de la tremblante atypique) de détecter des quantités de prion 1000 à 10 000 fois inférieures aux limites de détection des bioessais les plus sensibles.

Dans le cadre d'une évaluation quantitative du risque de transmission en conditions naturelles, il est difficile d'utiliser ces approches, car il n'existe plus de lien entre la détection (extrême sensibilité) de la protéine prion anormale et son infectiosité dans les tissus considérés. En effet, il ne suffit pas d'obtenir un (ou plusieurs) résultats positifs par ces méthodes d'amplification des prions pour conclure à la virulence d'un tissu, d'un fluide biologique ou d'un échantillon environnemental. Cependant, ces méthodes renferment un formidable potentiel en matière de diagnostic ou d'études fondamentales.

Ce préambule étant fait, les données récemment publiées relatives à la détection de protéine prion anormale ou d'infectiosité dans les tissus, les fluides biologiques et les excréments sont résumées ci-dessous. Dans sa démarche, le comité a pris en compte :

- les données relatives à la tremblante classique ;
- les données relatives à la maladie du dépérissement chronique des cervidés (CWD, maladie jamais détectée à ce jour en Europe, EFSA 2010), pour laquelle la diffusion des prions dans l'organisme semble proche de celle observée en tremblante classique.

Il est apparu, par ailleurs important de distinguer :

- les sources d'infectiosité participant à la transmission directe (verticale ou horizontale) de la maladie ;
- les sources pouvant participer à la transmission indirecte au travers de la contamination de l'environnement.

Colostrum et lait :

Les travaux de (Konold *et al.*, 2008) et de (Lacroux *et al.*, 2008) ont démontré la présence d'infectiosité dans le colostrum et le lait de brebis de génotype VRQ/VRQ naturellement infectées par la tremblante classique et leur capacité à transmettre la maladie lors d'ingestion par les agneaux.

Depuis, ces données ont été confirmées par d'autres équipes. Récemment, Ligios et coll. ont montré que le lait issu de brebis de génotype ARQ/ARQ atteintes de mammite est capable de transmettre la tremblante à des agneaux l'ayant consommé (Ligios *et al.*, 2011). De plus, dans l'étude de Lacroux et coll., la recherche de PrPres dans le système lymphoréticulaire des brebis ARR/VRQ infectées a été infructueuse (Lacroux *et al.*, 2008), ce qui suggère que les brebis porteuses d'un allèle de résistance n'excrètent pas de prions via le lait.

Cependant en 2009, une amplification par PMCA de PrPres a été obtenue à partir de lait d'ovins de génotypes ARQ/VRQ et AHQ/VRQ et ARR/VRQ naturellement exposés à la maladie (plus de 20 mois avant le développement des symptômes) (Maddison *et al.*, 2009). Toutefois, compte tenu du nombre de cycles de PMCA nécessaires à l'obtention d'une réaction positive (jusqu'à 7) notamment pour le lait de brebis de génotype ARR/VRQ et AHQ/VRQ, il est difficile de conclure quant à la validité et la signification des résultats obtenus (suspicion de contamination croisée des produits de réaction) (Thorne & Terry, 2008 ; Cosseddu *et al.*, 2011).

Le Comité considère que l'infectiosité du colostrum et du lait n'est pour l'heure réellement établie que pour les brebis de génotype sensible (VRQ/VRQ, ARQ/ARQ et ARQ/VRQ) naturellement infectées par la tremblante classique.

Placenta et annexes fœtales : La présence de PrPres et d'infectiosité dans le placenta de brebis (mais aussi de chèvres, O'Rourke 2011) atteintes de tremblante est avérée par plusieurs études (Tuo *et al.*, 2002 ; Andreoletti *et al.*, 2002 ; Lacroux *et al.*, 2007). Le niveau de PrPres détecté est élevé (seulement 47 fois moins que le cerveau), dès la première mise-bas (Andreoletti *et al.*, 2002). Compte-tenu de ces éléments, la part du placenta dans la transmission directe (périnatale, par ingestion par l'agneau ou d'autres brebis) et indirecte, par contamination de l'environnement pourrait être majeure. Notons cependant que la présence de PrPres dans le placenta est totalement conditionnée par le génotype de la mère et du fœtus : en effet les brebis porteuses d'un allèle ARR n'accumulent pas de PrPres dans le placenta, quel que soit le génotype du fœtus. De même, les brebis VRQ/VRQ naturellement infectées n'accumulent de la PrPres dans le placenta que si le fœtus est de génotype sensible.

Le risque de transmission lié au placenta est démontré pour les brebis de génotype sensible, porteuses de fœtus eux-mêmes de génotype sensible.

Urine :

Chez les ovins de génotype sensible, la présence de dépôts de PrPres dans la papille rénale de certains animaux a été rapportée (Siso *et al.*, 2006). Toutefois la démonstration d'une infectiosité spécifique de ce tissu (ou de l'urine) n'a pas à ce jour été faite chez les petits ruminants. Chez les cervidés atteints par la maladie du dépérissement chronique, la présence d'infectiosité a pu être mise en évidence par inoculation à des souris transgéniques pour le gène Prnp de cervidés (Haley *et al.*, 2009b). Un nombre limité d'animaux inoculés (2/9) par voie intra cérébrale avec les protéines issues de 50 mL d'urine d'un animal cliniquement atteint ont développé la maladie. Enfin, des amplifications par PMCA ont permis de mettre en évidence la présence de PrP anormale dans l'urine d'ovins VRQ/VRQ (stade clinique) et de cerfs de Virginie (stade préclinique et clinique), naturellement ou expérimentalement infectés (Rubenstein *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces éléments suggère la possibilité (pour l'heure non démontrée) d'une excrétion à très faibles niveaux d'infectiosité chez les petits ruminants atteints de tremblante classique.

Compte tenu des faibles niveaux (potentiels) d'infectiosité, il semble raisonnable à ce stade de considérer que l'urine ne joue pas un rôle majeur dans la transmission interindividuelle directe (faible niveau d'infectiosité par unité de volume). Toutefois, après accumulation dans l'environnement, elle pourrait constituer une source de contamination indirecte, dont les conséquences en matière de risque de transmission demeurent difficiles à objectiver.

Fèces : Il n'existe pas de données relatives à la transmission par les fèces chez les ovins. La démonstration que les fèces peuvent participer à la contamination de l'environnement a été apportée avec la détection d'infectiosité dans les fèces de cervidés en phase asymptomatique (Tamguney *et al.*, 2009). Notons que les fèces excrétées par des animaux infectés sont capables de contaminer des cervidés par voie orale (Haley *et al.*, 2009a). Il a été calculé que l'infectiosité excrétée par voie fécale sur une période de 10 mois par des animaux en phase préclinique de CWD équivalait à celle retrouvée dans un cerveau entier d'animal au stade clinique (Tamguney *et al.*, 2009). Plus récemment, par

technique de PMCA (Terry *et al.*, 2011), il a pu être mis en évidence la présence de PrPres dans les fèces de moutons VRQ/VRQ atteints de tremblante classique en phase clinique et pré-clinique.

Les données actuelles conduisent à considérer les fèces comme une source potentielle de contamination environnementale, sans qu'il soit possible, à l'heure actuelle, d'en connaître la part de risque attribuable dans la transmission indirecte de la tremblante ovine classique.

Sang : la transmission de l'ESB et de la tremblante classique par transfusion a démontré la présence d'infectiosité dans le sang de brebis cliniquement atteintes ou en incubation d'ESB et de tremblante classique (Houston *et al.*, 2000 ; Hunter *et al.*, 2002 ; Houston *et al.*, 2008). Cette prionémie apparaît par ailleurs très précocement (Lacroux *et al.*, 2011) . Ces mêmes travaux indiquent par ailleurs que l'infectiosité des leucocytes sanguins contenus dans 1 mL de sang est $10^{6.5}$ fois plus faible que celle contenue dans 1 mg de tronc cérébral postérieur issu d'un animal en phase terminale. Malgré ce faible niveau d'infectiosité, le risque de transmission iatrogène par du matériel chirurgical ou des aiguilles autres qu'à usage unique, nécessiterait d'être mieux évalué si ces pratiques existent.

Compte tenu de ces éléments, l'implication du sang dans la transmission directe de la maladie semble faible. En revanche la participation du sang infecté à la transmission indirecte, soit par voie iatrogène, soit par contamination de l'environnement, notamment au moment de la mise-bas, est mal connue et devrait faire l'objet d'études approfondies.

Salive et sécrétions nasales : Il n'existe pas de données relatives à la transmission par la salive et les sécrétions nasales chez les ovins, en conditions naturelles. Cependant la présence d'infectiosité dans les muqueuses nasales (Hadlow *et al.*, 1982) et de PrPres dans les glandes salivaires (Vascellari *et al.*, 2007) d'ovins atteints de tremblante classique a été rapportée. L'inoculation de salive de cervidés au stade clinique de la CWD soit à des cervidés sains (Mathiason *et al.*, 2006) soit à des souris transgéniques sur-exprimant un gène PrP de cervidés (Haley *et al.*, 2009b) (taux d'attaque 8/9) a démontré la présence d'infectiosité pour cette espèce.

Par ailleurs une amplification de PrPres par PMCA (i) dans la salive d'ovins VRQ/VRQ, en phase préclinique de tremblante classique (Maddison *et al.*, 2010) et (ii) à partir d'écouvillonnages de la cavité buccale chez des ovins VRQ/VRQ, ARV/VRQ et ARR/VRQ en phase préclinique et clinique (Gough *et al.*, 2010) a été rapportée. Le comité émet des doutes quant à la signification de ces résultats, compte tenu du nombre de cycles nécessaires à la détection de la protéine pathologique et en l'absence de résultats positifs en bioessais.

La transmission de l'agent de la tremblante par le biais de la salive n'est pas démontrée. Chez les cervidés, des études montrent que l'agent de la CWD peut se transmettre par la salive. Des travaux devraient être menés sur les ovins pour évaluer l'efficacité de cette voie de transmission.

Gamètes et embryons :

Les études visant à déterminer la présence de PrPres et/ou d'infectiosité dans le sperme sont peu nombreuses et portent toutes sur la tremblante classique. Une revue de l'ensemble de ces résultats a été récemment faite dans le cadre d'un avis de l'EFSA (EFSA 2010). Les études recensées suggèrent à ce jour que le risque de transmission horizontale (bélier à brebis) de la tremblante classique par du sperme de bélier infecté est

faible. Cependant la présence d'infectiosité dans le sperme de béliers ARQ/VRQ et VRQ/VRQ a été très récemment mise en évidence par bioessais sur souris transgéniques exprimant la protéine PrP ovine (allèle ARQ) (Rubenstein 2012 *et al.*). Les taux d'attaque (une souris clinique sur cinq pour des échantillons de deux béliers différents, aucune souris clinique sur cinq pour les échantillons de deux autres béliers) et les durées d'incubation observées suggèrent cependant un faible niveau d'infectiosité. Par ailleurs, l'absence de titration « point final » et de comparaison avec un échantillon référence (Homogénat de cerveau de mouton au stade clinique, inoculé à la souris) ne permet pas de quantifier les niveaux relatifs d'infectiosité. Compte tenu des limites dont souffrent les études qui ont été réalisées jusqu'à présent, la conduite des travaux complémentaires paraît nécessaire.

La présence d'infectiosité dans les embryons (et par extension les ovocytes) collectés chez des brebis de génotype sensible à différents stades de la maladie n'a pas pour le moment été démontrée (EFSA 2010). Le suivi post-implantatoire de brebis de génotype sensible ayant reçu des embryons issus de brebis en incubation de la maladie n'a pas permis de démontrer un sur-risque de développement de la maladie chez les receveuses.

Toutefois certains travaux portant sur le transfert d'embryons issus de brebis en incubation de la maladie semblent indiquer l'existence d'une contamination intra-utero des embryons en période préimplantatoire (transmission verticale) (Foster *et al.*, 1992; Foster *et al.*, 1996). Compte tenu de l'absence de maîtrise correcte des risques de contamination post natale des animaux concernés (agneaux issus des transferts d'embryons) ces résultats demeurent sujets à caution. Les résultats issus d'une étude plus récente (Low *et al.*, 2009) n'ont pas permis d'observer d'EST chez des agneaux ARQ/ARQ issus d'embryons collectés de mères ARQ/ARQ naturellement infectées et ré-implantées chez des brebis saines. Les effectifs des cohortes expérimentales ne permettent cependant pas d'exclure de manière formelle tout risque de transmission (borne haute de l'intervalle de confiance 9.1%).

En l'état actuel des connaissances, le risque de transmission horizontale de la tremblante classique à une brebis soit par du sperme de bélier infecté soit par l'intermédiaire d'un embryon ou d'un ovocyte est considéré faible, sans être exclu totalement compte tenu des limites méthodologiques des études réalisées.

Bilan :

L'évaluation du risque de transmission interindividuelle doit tenir compte de plusieurs paramètres que sont (i) la quantité d'infectiosité contenue dans les tissus ou les fluides biologiques contaminants (ii) le niveau d'exposition des animaux à ces tissus ou à ces fluides et (iii) la susceptibilité des animaux exposés. Concernant les deux premiers points, il convient ainsi de distinguer :

- 1) Les tissus/fluides qui ont un rôle avéré dans la transmission interindividuelle de part leur infectiosité démontrée et auxquels l'exposition des animaux est importante: le lait, le colostrum et le placenta. Cette transmission interindividuelle est également appuyée par les études épidémiologiques (Touzeau, Arch Virol 2006).
- 2) Les tissus/fluides dont l'infectiosité est démontrée ou suspectée mais auxquels l'exposition directe des animaux est faible (urine, salive, sang, fèces, gamètes + embryons).

Certains de ces fluides pourraient en revanche participer à la transmission indirecte :

- par contamination cumulative de l'environnement, compte tenu des mécanismes de concentration et de persistance à long terme dans le sol. Néanmoins la part de risque attribuable à ce mode de contamination par rapport à ceux clairement identifiés dans un troupeau (lait placenta) reste inconnue. Ce risque de contamination pourrait être significatif uniquement dans un contexte de pression d'infection importante (prévalence élevée sur plusieurs années) et de structure génétique de troupeau défavorable (animaux sensibles). Dans le cadre de la question posée, les données actuelles suggèrent que la contamination environnementale liée à un animal ou à un petit groupe d'animaux infectés et de génotype sensible qui n'auraient pas mis bas dans l'élevage est faible.
- par contamination iatrogène :
 - le sang, par le biais de certaines pratiques de médecine vétérinaire
 - les gamètes et embryons pour lequel le risque de transmission bien que faible ne peut être définitivement écarté.

Le peu de données disponibles ne permettent pas d'extrapoler les données de tremblante classique au contexte de la tremblante atypique. Par rapport à la conclusion du précédent avis du comité du 23 juillet 2009 deux travaux récents ont permis de montrer :

- (i) la transmissibilité de l'agent de la tremblante atypique par voie orale (Simmons *et al.*, 2011)
- (ii) la présence d'infectiosité, parfois en absence de PrPres détectable, dans les tissus périphériques de moutons atteints de tremblante atypique (Andreoletti Plos Pathog 2011).

Cette question de transmission devra être réévaluée quand des données complémentaires seront disponibles.

II-2 nouvelles données existantes sur la sensibilité à l'infection en fonction de l'âge des petits ruminants

Les seules données disponibles concernent la tremblante classique. La principale difficulté dans l'estimation de la période la plus à risque pour la contamination des ovins par la tremblante classique réside dans la confusion entre l'exposition à l'agent et la sensibilité relative en fonction de l'âge des animaux. En conditions naturelles, les animaux naissant dans un milieu contaminé s'infectent selon toute vraisemblance très précocement comme l'indique la mise en évidence de PrPres dans les plaques de Peyer iléales ou les amygdales dès l'âge de 2 mois chez des agneaux VRQ/VRQ nés dans des élevages fortement infectés (Andreoletti *et al.*, 2000 ; Heggebo *et al.*, 2000 ; van Keulen *et al.*, 2002). Toutefois, la contamination à l'âge adulte demeure possible, comme en témoigne la contamination d'animaux adultes et de génotype sensible dans des élevages fortement contaminés (Hourigan *et al.*, 1979 ; Ryder *et al.*, 2004).

II-3 Risque de transmission verticale de l'agent de la tremblante en fonction de l'âge de la brebis mettant bas (par rapport au début de ses signes cliniques) et du génotype de la descendance ?

En dehors des travaux portant sur le risque d'infection des embryons en période pré-implantatoire (cf supra), il n'existe que peu de travaux portant sur les risques de transmission verticale (de la mère à l'agneau) in utero. La mesure de PrP anormale par les techniques conventionnelles dans les tissus de fœtus de génotype sensible (VRQ/VRQ) à terme issus de brebis de génotype sensibles (VRQ/VRQ) infectées par la tremblante classique n'a pas permis de mettre en évidence de dépôt de PrP anormale dans un quelconque tissu de ces fœtus. Le suivi de cohortes d'agneaux de génotype sensible issues de mères infectées VRQ/VRQ ou non infectées dans un environnement fortement contaminé, n'a lui pas permis de déceler de différences dans la précocité ou les voies de contamination des agneaux (Andréoletti et al 2002).

Une étude de Garzia *et al* 2011 relate la présence de PrPres après amplification par PMCA dans les fœtus de brebis en incubation. Si la présence de PrPres dans les fœtus était confirmée, la transmission in utero de l'agent de la tremblante serait donc possible. Le Comité reste néanmoins très prudent quant à l'interprétation de ces données compte tenu d'une part des risques très élevés de contamination croisée des échantillons dans le cadre de cette technique d'amplification et d'autre part de la nature des tissus utilisés pour la réalisation des contrôles négatifs (tissus collectés à partir d'un agneau négatif et non de fœtus issus de brebis négatives).

L'ensemble de ces résultats suggère, dans les limites des systèmes expérimentaux (élevage fortement contaminé, exposition à un type particulier d'agent des EST) qui ont permis de les générer, que la contamination latérale post natale demeure la principale voie de transmission de la maladie.

Il demeure important de rappeler dans le cadre de la question posée, que chez les brebis de génotype sensible naturellement infectées par la tremblante classique, le placenta et le colostrum/lait (deux sources de contamination avérées de l'agneau) peuvent contenir de l'agent infectieux dès la première mise-bas / lactation (Lacroux et al 2007 et Lacroux et al 2008).

II-4 Pertinence du maintien du génotypage aux 4 codons d'intérêts de la protéine PrP pour les animaux testés issus de troupeaux placés sous police sanitaire en cas de tremblante atypique.

Dans l'avis de juillet 2009, le comité précisait que « *Dans un contexte où, le nombre de troupeaux atteints de tremblante atypique identifiés chaque année devrait rester faible (diminution du nombre annuel de tests) ; la nature des prélèvements et les tests appliqués ne seraient pas optimisés, l'application d'un dispositif de surveillance renforcée, identique à celui de la police sanitaire relative à la tremblante classique (réalisation d'un test pour les animaux sortant du troupeau, abattus ou équarris), aux troupeaux atteints de tremblante atypique ne permettra pas de documenter d'avantage l'existence d'une transmission inter-individuelle de l'agent de la tremblante atypique au sein de ces troupeaux.* » Cette conclusion s'applique également aux analyses complémentaires pratiquées sur ces mêmes animaux telles que le génotypage aux 4 codons d'intérêt de leur protéine PrP.

Conclusions

Concernant les bovins :

Les données épidémiologiques actualisées confirment que l'âge le plus à risque pour

l'infection pour les bovins se situe dans les douze premiers mois, puis, dans une moindre mesure, entre 1 an et 2 ans.

L'âge seuil du cas index en deçà duquel les animaux de la cohorte doivent être recherchés doit logiquement être identique pour les cohortes de naissance et de résidence.

L'évaluation du risque réalisée par le comité dans le cadre de l'avis du 22 juillet 2011 « relatif aux évolutions de la réglementation communautaire proposées par la feuille de route n° 2 pour les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) : aspects concernant la police sanitaire bovine » est toujours d'actualité. Ainsi, bien que le risque relatif de résultat faussement négatif suite à un test de dépistage de l'ESB soit 250 fois supérieur pour un bovin appartenant à la cohorte de naissance d'un cas d'ESB, par rapport à un bovin de la population générale testé à l'abattoir, le risque absolu pour le consommateur (représenté par le nombre de bovins faussement négatifs qui entreraient dans la chaîne alimentaire, si une ré-autorisation des animaux de la cohorte à la consommation humaine après un test était envisagée) apparaît extrêmement faible (0,0008 cas par an).

Concernant les petits ruminants :

Pour la gestion du risque amont :

Compte tenu des données disponibles en matière de contamination naturelle par les agents responsables de la tremblante classique, le comité considère que dans l'immense majorité des cas la contamination des individus identifiés comme infectés est susceptible d'avoir eu lieu :

- dans le cheptel de naissance
- ou dans le cheptel où l'animal a résidé pendant ses 12 premiers mois.

Pour la gestion du risque aval :

Le Comité considère qu'en matière de tremblante classique, les principales sources avérées de transmission inter-individuelle demeurent le lait et le placenta. Dans ce contexte le maintien d'une surveillance renforcée dans les troupeaux où des brebis atteintes ont mis bas est recommandé.

Dans le cadre de la question posée, le Comité considère que la contamination environnementale liée à un animal ou à un petit groupe d'animaux infectés et de génotype sensible qui n'auraient pas mis bas dans l'élevage est faible. Toutefois, le Comité souhaite également souligner, qu'à ce jour, il demeure extrêmement difficile d'apprécier le rôle potentiel de l'environnement dans la contamination par les agents des EST.

Enfin, concernant l'interdiction de cession d'animaux ARR/X non VRQ issus des cheptels atteints de tremblante classique pendant une période de deux ans, le Comité estime que cette période de 2 ans n'a pas de pertinence scientifique en l'état actuel des connaissances. En effet, quel que soit leur âge ou leur date de naissance (mise en application des mesures de police sanitaire), les animaux ARR/XXX issus de troupeaux atteints présentent un risque très limité d'être infectés et donc très faible, sinon négligeable de transmettre la maladie.

5. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du CES ESST.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

Mots clés : Police sanitaire, EST, petits ruminants, bovins.

BIBLIOGRAPHIE

- Afssa, avis du 9 octobre 2002 concernant un projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 3 décembre 1990 relatif à la police sanitaire de l'ESB.
- Afssa, avis du 23 juillet 2009 relatif aux conséquences de deux nouvelles études scientifiques sur les mesures de police sanitaire en cas de tremblante atypique.
- Anderson, R. M., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Woolhouse, M. E., Watt, C. J., Udy, H. J., MaWhinney, S., Dunstan, S. P., Southwood, T. R., Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., Hoinville, L. J., Hillerton, J. E., Austin, A. R. Wells, G. A. (1996). Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 382, 779-788.
- Andreoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., Schelcher, F., Elsen, J. M. Lantier, F. (2000). Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol* 81, 3115-3126.
- Andreoletti, O., Lacroux, C., Chabert, A., Monnereau, L., Tabouret, G., Lantier, F., Berthon, P., Eychenne, F., Lafond-Benestad, S., Elsen, J. M. Schelcher, F. (2002). PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol* 83, 2607-2616.
- Andreoletti, O., Orge, L., Benestad, S.L., Beringue, V., Litaise C., Simon S., Le Dur A., Laude H., Simmons H., Lugan S., Corbière F., Costes P., Morel N., Schelcher F.,

- Lacroux C. Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog.* 2011 Feb 10;7(2):e1001285.
- Arnold, M. E. Wilesmith, J. W. (2004). Estimation of the age-dependent risk of infection to BSE of dairy cattle in Great Britain. *Prev Vet Med* 66, 35-47.
- Cosseddu, G. M., Nonno, R., Vaccari, G., Bucalossi, C., Fernandez-Borges, N., Di Bari, M. A., Castilla, J. Agrimi, U. (2011). Ultra-Efficient PrP Amplification Highlights Potentialities and Pitfalls of PMCA Technology. *PLoS Pathog* 7, e1002370.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on Risk of transmission of TSEs via semen and embryo transfer in small ruminants (sheep and goats). *EFSA Journal* 2010;8(1):1429. [39 pp.]. doi:10.1005/j.efsa.2010.1429. Available online: www.efsa.europa.eu
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on the results of the EU survey for Chronic Wasting Disease (CWD) in cervids. *EFSA Journal* 2010;8(10):1861. [29 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2010.1861. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm
- Foster, J. D., Hunter, N., Williams, A., Mylne, M. J., McKelvey, W. A., Hope, J., Fraser, H. Bostock, C. (1996). Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer. *Vet Rec* 138, 559-562.
- Foster, J. D., McKelvey, W. A., Mylne, M. J., Williams, A., Hunter, N., Hope, J. Fraser, H. (1992). Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryo transfer. *Vet Rec* 130, 341-343.
- Garza MC, Fernández-Borges N, Bolea R, Badiola JJ, Castilla J, Monleón E. Detection of PrPres in Genetically Susceptible Fetuses from Sheep with Natural Scrapie. *PLoS One*. 2011;6(12):e27525
- Gough, K. C., Baker, C. A., Rees, H. C., Terry, L. A., Spiropoulos, J., Thorne, L. Maddison, B. C. (2010). The oral secretion of infectious scrapie prions occurs in pre-clinical sheep with a range of PRNP genotypes. *J Virol*.
- Hadlow, W. J., Kennedy, R. C. Race, R. E. (1982). Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis* 146, 657-664.
- Haley, N. J., Mathiason, C. K., Zabel, M. D., Telling, G. C. Hoover, E. A. (2009a). Detection of sub-clinical CWD infection in conventional test-negative deer long after oral exposure to urine and feces from CWD+ deer. *PLoS One* 4, e7990.
- Haley, N. J., Seelig, D. M., Zabel, M. D., Telling, G. C. Hoover, E. A. (2009b). Detection of CWD prions in urine and saliva of deer by transgenic mouse bioassay. *PLoS One* 4, e4848.
- Heggebo, R., Press, C. M., Gunnes, G., Lie, K. I., Tranulis, M. A., Ulvund, M., Groschup, M. H. Landsverk, T. (2000). Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol* 81, 2327-2337.
- Hourrigan, J., Klingsporn, A. L., Clark, W. W. de Camp, M. (1979). Epidemiology of scrapie in the United States. In *Slow transmissible diseases of the nervous system, Vol1*, pp. 331-356. Edited by S. B. Prusiner & W. J. Hadlow. New York: Academic Press.
- Houston, F., Foster, J. D., Chong, A., Hunter, N. Bostock, C. J. (2000). Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 356, 999-1000.

- Houston, F., McCutcheon, S., Goldmann, W., Chong, A., Foster, J., Siso, S., Gonzalez, L., Jeffrey, M., Hunter, N. (2008). Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood* 112, 4739-4745.
- Hunter, N., Foster, J., Chong, A., McCutcheon, S., Parnham, D., Eaton, S., MacKenzie, C., Houston, F. (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol* 83, 2897-2905.
- Konold, T., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., Simmons, H. A. (2008). Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC Vet Res* 4, 14. Lacroux, C., Corbiere, F., Tabouret, G., Lugan, S., Costes, P., Mathey, J., Delmas, J. M., Weisbecker, J. L., Foucras, G., Cassard, H., Elsen, J. M., Schelcher, F., Andreoletti, O. (2007). Dynamics and genetics of PrPSc placental accumulation in sheep. *J Gen Virol* 88, 1056-1061.
- Lacroux, C., Simon, S., Benestad, S. L., Maillet, S., Mathey, J., Lugan, S., Corbiere, F., Cassard, H., Costes, P., Bergonier, D., Weisbecker, J. L., Moldal, T., Simmons, H., Lantier, F., Feraudet-Tarisse, C., Morel, N., Schelcher, F., Grassi, J., Andreoletti, O. (2008). Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathog* 4, e1000238.
- Lacroux, C., Vilette, D., Fernandez-Borges, N., Litaïse, C., Lugan, S., Morel, N., Corbiere, F., Simon, S., Simmons, H., Costes, P., Weisbecker, J. L., Lantier, I., Lantier, F., Schelcher, F., Grassi, J., Castilla, J., Andreoletti, O. (2011). Prionemia and leucoplatelet associated infectivity in sheep TSE models. *J Virol*.
- Ligios, C., Cancedda, M. G., Carta, A., Santucci, C., Maestrale, C., Demontis, F., Saba, M., Patta, C., DeMartini, J. C., Aguzzi, A., Sigurdson, C. J. (2011). Sheep with scrapie and mastitis transmit infectious prions through the milk. *J Virol* 85, 1136-1139.
- Low, J. C., Chambers, J., McKelvey, W. A., McKendrick, I. J., Jeffrey, M. (2009). Failure to transmit scrapie infection by transferring preimplantation embryos from naturally infected donor sheep. *Theriogenology* 72, 809-816.
- Maddison, B. C., Baker, C. A., Rees, H. C., Terry, L. A., Thorne, L., Bellworthy, S. J., Whitlam, G. C., Gough, K. C. (2009). Prions are secreted in milk from clinically normal scrapie-exposed sheep. *J Virol* 83, 8293-8296.
- Maddison, B. C., Rees, H. C., Baker, C. A., Taema, M., Bellworthy, S. J., Thorne, L., Terry, L. A., Gough, K. C. (2010). Prions are secreted into the oral cavity in sheep with preclinical scrapie. *J Infect Dis* 201, 1672-1676.
- Mathiason, C. K., Powers, J. G., Dahmes, S. J., Osborn, D. A., Miller, K. V., Warren, R. J., Mason, G. L., Hays, S. A., Hayes-Klug, J., Seelig, D. M., Wild, M. A., Wolfe, L. L., Spraker, T. R., Miller, M. W., Sigurdson, C. J., Telling, G. C., Hoover, E. A. (2006). Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* 314, 133-136.
- Rubenstein, R., Chang, B., Gray, P., Piltch, M., Bulgin, M. S., Sorensen-Melson, S., Miller, M. W. (2011). Prion disease detection, PMCA kinetics, and IgG in urine from sheep naturally/experimentally infected with scrapie and deer with preclinical/clinical chronic wasting disease. *J Virol* 85, 9031-9038.
- Rubenstein, R., Bulgin, M.S., Chang, B., Sorensen-Melson, S., Petersen R.B., Lafauci, G., (2012) PrPSc Detection and Infectivity in Semen from Scrapie-Infected Sheep.; *G.J Gen Virol*. [Epub ahead of print].

- 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. *Res Vet Sci* 76, 211-217.
- Simmons, M. M., Moore, S. J., Konold, T., Thurston, L., Terry, L. A., Thorne, L., Lockey, R., Vickery, C., Hawkins, S. A., Chaplin, M. J. Spiropoulos, J. (2011). Experimental oral transmission of atypical scrapie to sheep. *Emerg Infect Dis* 17, 848-854.
- Siso, S., Gonzalez, L., Jeffrey, M., Martin, S., Chianini, F. Steele, P. (2006). Prion protein in kidneys of scrapie-infected sheep. *Vet Rec* 159, 327-328.
- Supervie, V. (2002). Modélisation de l'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine en France - Une approche par rétrocalcul, Université Paris V - DEA de Santé Publique - Option biostatistique: 42pp (sous la direction de D. Costagliola).
- Supervie, V. Costagliola, D. (2004). The unrecognised French BSE epidemic. *Vet Res* 35, 349-362.
- Tamguney, G., Miller, M. W., Wolfe, L. L., Sirochman, T. M., Glidden, D. V., Palmer, C., Lemus, A., DeArmond, S. J. Prusiner, S. B. (2009). Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. *Nature* 461, 529-532.
- Terry, L. A., Howells, L., Bishop, K., Baker, C. A., Everest, S., Thorne, L., Maddison, B. C. Gough, K. C. (2011). Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie. *Vet Res* 42, 65.
- Thorne, L. Terry, L. A. (2008). In vitro amplification of PrPSc derived from the brain and blood of sheep infected with scrapie. *J Gen Virol* 89, 3177-3184.
- Tuo, W., O'Rourke, K. I., Zhuang, D., Cheevers, W. P., Spraker, T. R. Knowles, D. P. (2002). Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrPSc accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6310-6315.
- van Keulen, L. J., Vromans, M. E. van Zijderveld, F. G. (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *Apmis* 110, 23-32.
- Vascellari, M., Nonno, R., Mutinelli, F., Bigolaro, M., Di Bari, M. A., Melchiotti, E., Marcon, S., D'Agostino, C., Vaccari, G., Conte, M., De Grossi, L., Rosone, F., Giordani, F. Agrimi, U. (2007). PrPSc in salivary glands of scrapie-affected sheep. *J Virol* 81, 4872-4876.