

COMITÉ INTERMINISTÉRIEL SUR LES ENCEPHALOPATHIES SUBAIGUËS
SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES

.....

AVIS DU COMITE SUR LES ETUDES A ENTREPRENDRE POUR LA SURVEILLANCE DE
L'EPIDEMIE D'ENCEPHALOPATHIE SPONGIFORME BOVINE EN FRANCE

1. **Préambule**

Le diagnostic d'une encéphalopathie subaiguë spongiforme transmissible (ESST) peut s'effectuer selon plusieurs modalités : diagnostic clinique, diagnostic neuropathologique et/ou immunohistochimique, diagnostic biochimique via la détection en western blot de la PrP partiellement résistante à la protéinase K (PrP-res), diagnostic par transmission de l'affection à l'animal de laboratoire. A ce jour, par définition, le seul moyen pour mettre en évidence la présence d'une infectiosité est l'inoculation à l'animal de la même espèce ou au rongeur de laboratoire génétiquement modifié (souris transgénique hébergeant le gène codant la PrP du donneur); cette méthode est longue et nécessite des installations de haute sécurité, et ne peut donc pas être utilisée en routine. Elle peut être remplacée, au moins dans la majorité des cas, par la mise en évidence de la PrPres. La méthode de référence pour la mise en évidence de la protéine PrP-res dans le système nerveux central est le western blot; toutefois, la sensibilité de cette méthode est relativement faible (10^4 unités infectieuses en moyenne) et les conditions habituelles de cet examen font que seuls quelques dizaines d'échantillons peuvent être étudiés sur une période de 48 heures, ce qui rend cette approche méthodologique inapplicable aux grands nombres d'échantillons tels qu'on les rencontrera dans des études épidémiologiques ou en pratique "de dépistage". La mise au point de "tests rapides" spécifiques et sensibles est donc un

préalable nécessaire à toute étude de prévalence de l'infection de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB).

Dans ce document, la terminologie "western blot conventionnel" sera appliquée à la détection de PrP-res telle qu'elle est pratiquée actuellement dans les laboratoires de recherche, et les termes "tests rapides" aux nouveaux procédés (ELISA, Western blot rapide) automatisables ou non actuellement en développement. Dans l'état actuel des connaissances, il est probable que certains des tests rapides aient une sensibilité supérieure à celle du western blot conventionnel.

2. Contexte général du projet

La réalité du passage de l'agent de l'ESB à l'homme est malheureusement régulièrement confortée par les diverses études développées à travers le monde depuis 1996. La question de l'innocuité des produits d'origine bovine entrant dans la chaîne alimentaire humaine est donc de plus en plus d'actualité. En effet, même si le support et le contexte de la transmission de cet agent bovin à l'homme constituent un sujet toujours ouvert de discussion, la voie de contamination alimentaire reste toujours la plus probable. Dans cette problématique, la connaissance de la prévalence de l'infection du cheptel français par l'agent de l'ESB est un des paramètres principaux permettant d'optimiser la mise en place de mesures sanitaires efficaces pour minimiser autant que possible l'exposition de l'homme à l'agent bovin.

Sur les 81 cas d'ESB diagnostiqués en France depuis 1990, 30 sont survenus en 1999. Ces 30 cas étaient tous nés après l'interdiction des farines de viande et d'os (NAIF) dans l'alimentation des bovins (juillet 1990). Le nombre de bovins infectés par l'agent de l'ESB abattus ou décédés (maladie, accident) avant l'apparition des signes cliniques de l'ESB est certainement supérieur. En France, on ne dispose d'aucune donnée sur la prévalence des animaux infectés actuellement en phase d'incubation. Une étude en cours permettra d'obtenir une première estimation de cette prévalence dans un contexte particulièrement à risque correspondant aux troupeaux (abattus) dans lesquels est survenu un cas d'ESB. Cette étude est basée sur la mise en évidence de PrP-res

dans le cerveau des animaux abattus. Elle fait appel à deux méthodes de détection de la PrP-res : immunométrie et Western blot.

Une étude réalisée par l'Office Fédéral Vétérinaire Suisse en utilisant un test rapide de détection de la PrP-res (Prionics) a montré que ce test était positif chez 2 à 3 pour 1000 des bovins abattus d'urgence ou trouvés morts (maladie, accidents). Par ailleurs, dans un échantillon "représentatif" des bovins abattus en Suisse, la proportion de tests positifs était de 0,5 %. Cette étude a permis de dépister 16 animaux atteints, contre 14 au cours de la même période par déclaration de suspicion clinique, démontrant ainsi l'intérêt des tests de détection de la PrP-res dans le dispositif de surveillance de l'ESB, notamment pour le dépistage des animaux en phase pré-clinique. L'application de la valeur de prévalence de 0,5 % à l'ensemble du cheptel Suisse augmenterait encore la différence entre le nombre de cas identifiés par l'examen clinique et les cas repérés par le test.

Sur la base de cette étude, on peut estimer que le nombre de bovins suisses présentant une accumulation intra-cérébrale de PrP-res détectable par le test Prionics est au moins 2 fois supérieur au nombre de cas d'ESB diagnostiqués cliniquement. Par ailleurs, dans un article sur la modélisation de l'épidémie d'ESB au Royaume-Uni, R. Anderson et coll estimaient que le nombre de bovins infectés abattus avant l'apparition des signes cliniques, et donc entrés dans la chaîne alimentaire, était 5 à 6 fois supérieur au nombre de cas d'ESB (1). Par deux approches différentes, ces travaux montrent qu'il existe un écart important entre le nombre de cas répertoriés d'ESB et le nombre de bovins en cours d'incubation entrant dans la chaîne alimentaire.

L'évolution de l'épidémie d'ESB en France pose, en outre, au moins trois questions majeures :

- 1) Quelle est l'origine de la contamination des bovins NAIF ?
- 2) Quelle sera l'évolution de l'épidémie d'ESB en France ?
- 3) Sur la base des travaux et données sur l'épidémie de nvMCJ au Royaume-Uni, doit-on considérer que l'épidémie de ESB en France entraîne un risque de nvMCJ que l'on ne peut considérer comme négligeable ?

Pour aider à répondre à ces trois questions, toutes les études nécessaires à l'évaluation de l'épidémie d'ESB en France doivent être mises en œuvre dans les meilleurs délais.

La Commission Européenne a récemment mis en place une étude de validation de nouveaux tests rapides de détection de la PrP-res par la méthode ELISA ou par le Western blot " rapide ", méthodes permettant des délais de réponse courts et théoriquement compatibles avec les pratiques de l'abattoir, et donc, en théorie, un élément potentiel fort pour le renforcement de la sécurité des aliments concernés. Cette évaluation à l'échelle européenne a porté sur quatre nouveaux tests de diagnostic des ESST et a montré les bons résultats de trois d'entre eux en termes de sensibilité et de spécificité, pour le diagnostic de la maladie au stade clinique. La bonne sensibilité de certains d'entre eux permet d'envisager aussi leur utilisation pour le diagnostic anteclinique. Ces tests sont donc susceptibles de compléter le dispositif de surveillance des ESST, basé actuellement sur les seules déclarations des éleveurs et vétérinaires lors de suspicion clinique, et de permettre une meilleure estimation de la prévalence de ces infections (cliniques et antecliniques) dans différentes populations animales. Néanmoins, il n'est pas actuellement connu le stade d'incubation à partir duquel chacun de ces nouveaux tests permet de dépister l'infection et, hormis pour le test Prionics (ND) étudié en comparaison avec l'histopathologie et l'immunohistochimie chez différentes populations bovines, les tests n'ont pas fait l'objet de validation dans d'autres populations que celle des animaux cliniquement atteints d'ESB ou celle des animaux sains.

3. Objectifs

Compte tenu du contexte présenté ci-dessus, trois objectifs doivent être considérés comme prioritaires. Ces objectifs complémentaires et les études qui s'y rattachent doivent être intégrés dans un programme général fournissant une logistique et des moyens partagés par les 3 études.

L'objectif premier est d'estimer la prévalence des résultats positifs des tests de dépistage de la PrP-res dans certains groupes à risque du cheptel bovin français, afin de fournir les bases d'une analyse de la sécurité des aliments et de définir, si nécessaire, une meilleure maîtrise du risque associé pour la santé publique. Les groupes considérés comme à risque dans ce cadre seront définis dans le paragraphe 5.

Le deuxième objectif est complémentaire et indissociable du premier. Il s'agit de l'analyse comparative du test rapide retenu et du Western blot conventionnel chez des animaux "tout venant". Les tests rapides n'ont pas été étudiés chez des populations d'animaux en incubation d'ESB. Compte tenu du meilleur seuil de détection probable des tests rapides par rapport à d'autres techniques de diagnostic, et donc, probablement, leur meilleure sensibilité, on s'attend à trouver certains résultats divergents entre le résultat du test rapide et celui d'autres techniques, Western blot conventionnel ou autre. Ces résultats divergents devraient dans la plupart des cas correspondre à la situation où le test rapide serait positif et le Western-Blot négatif. Il sera donc nécessaire de mettre en œuvre une étude approfondie de ces cas divergents de manière à vérifier par tous les outils disponibles la réalité de la présence de la PrP-res et de l'infectiosité dans ces échantillons. Cette étude est un objectif de recherche en soi, même si elle bénéficiera du matériel de l'étude épidémiologique descriptive.

Enfin, le troisième objectif est d'adapter la méthodologie d'utilisation des tests rapides, développés au laboratoire, aux conditions du terrain dans les catégories pré-définies (abattages d'urgence, animaux morts et animaux abattus normalement dans des régions pilotes). La définition des critères de qualité des prélèvements, l'adaptation des moyens au volume de travail et aux délais de réponse, essentielles à maîtriser, se rattachent à cette autre problématique.

De ces trois objectifs, seuls les deux premiers seront abordés dans ce document. Les protocoles précis des études correspondantes feront l'objet de deux documents séparés, rédigés par les investigateurs responsables de chacun de ces projets. Chaque projet aura un promoteur,

qui pourrait, éventuellement ne pas être le même pour l'étude de prévalence et pour la validation des tests rapides.

4. Définition et méthodes d'identification des cas .

L'estimation de la prévalence de l'ESB reposera sur la recherche de PrP-res dans le tissu cérébral des animaux. Si le test détecte de la PrP-res, l'animal sera considéré comme un cas d'ESB (cf 6). Cette définition pose plusieurs problèmes. L'accumulation de la PrP-res dans le cerveau pendant la phase d'incubation de l'ESB est progressive. La PrP-res devrait donc être détectée à un stade d'autant plus précoce de l'incubation que le test utilisé possède un seuil de détection bas. La sensibilité du test, et donc la prévalence apparente de l'ESB, telle qu'elle est définie dans cette étude, sera donc d'autant plus grande que le test utilisé possède un seuil de détection bas. En théorie, un test possédant un excellent seuil de détection pourrait être à même de détecter des quantités de PrP-res inférieures au seuil d'infectiosité, d'où l'importance de l'étude réalisée parallèlement dont le protocole prévoit la réalisation de bioessais (transmission expérimentale à l'animal).

L'évaluation comparative conduite par la Commission Européenne a montré que les tests rapides n'avaient pas tous le même seuil de détection. Toutefois, on ignore si les différences observées chez des populations animales parfaitement définies comme indemnes ou cliniquement atteintes d'ESB sont directement transposables à une étude de terrain. L'estimation de la prévalence de l'ESB doit aussi tenir compte de la spécificité du test. Pour ce critère, comme pour la sensibilité, il n'est pas sûr que la performance des tests dans des conditions "tout venant" soit identique à celle obtenue dans des protocoles expérimentaux.

Ces incertitudes conduisent à recommander l'utilisation de 2 tests : un test rapide (immunométrique ou Western blot rapide) et un test Western blot conventionnel. En raison de l'impossibilité d'examiner par Western blot conventionnel les cerveaux de plusieurs dizaines de milliers d'animaux, ce test ne serait utilisé que dans les cas où le test rapide serait positif (cf 5).

L'étude fournira donc deux estimations de la prévalence : l'une basée sur les résultats du test rapide, l'autre sur ceux du Western blot conventionnel. Ce dernier test étant considéré comme moins sensible que les tests rapides immunométriques, la première estimation pourrait être plus élevée que la seconde.

Par ailleurs, afin d'être en mesure de comparer, si nécessaire, les résultats de l'étude française à ceux obtenus dans des pays utilisant un autre test rapide que celui choisi pour la présente étude, il serait important d'envisager de tester un nombre suffisant de prélèvements (positifs et négatifs) par l'ensemble des tests rapides actuellement disponibles et d'évaluer également leur seuil de détection sur une gamme de prélèvements de niveau d'infectiosité variable et connu.

5. Population étudiée et échantillonnage

La stratégie proposée est d'étudier d'abord des populations de bovins dans lesquelles la prévalence de l'ESB pourrait être particulièrement élevée. Cette proposition paraît être une réponse adaptée à l'urgence des interrogations actuelles sur l'épidémie d'ESB en France. L'étude envisagée pourrait fournir des résultats dans un délai de 6 mois. Elle permettrait de disposer d'une estimation de la prévalence surestimant très vraisemblablement la fréquence de la maladie dans l'ensemble du cheptel bovin. Si la prévalence observée dans le cadre de cette étude est basse, il pourrait ne pas être nécessaire d'étendre l'enquête à d'autres populations de bovins. Si la prévalence observée est élevée, il pourrait alors être important d'avoir une estimation plus représentative la prévalence de la maladie dans l'ensemble du cheptel bovin français.

A la lumière de l'étude réalisée en Suisse, deux premières catégories d'animaux ont, comparativement à l'ensemble du cheptel, un risque a priori plus élevé d'être atteints d'ESB : les bovins de plus de deux ans morts et les bovins de plus de deux ans abattus d'urgence. Ce risque devrait être encore plus élevé si l'étude est réalisée dans des régions à forte incidence d'ESB (seuls seront examinés des bovins de plus de deux ans car il est très peu probable de détecter avant cet âge de la PrP-res dans le cerveau d'animaux qui auraient été infectés dans leurs premières semaines de vie). Dans les zones retenues pour la

réalisation de cette étude, il est important d'étudier l'ensemble des animaux éligibles, afin d'éviter tout biais de sélection. Les contrôles permettant de s'assurer de l'exhaustivité de l'étude dans les zones retenues devront être mis en place.

On doit s'interroger sur l'intérêt d'étendre l'étude à une troisième population à risque : les bovins les plus âgés (limite à définir), abattus normalement, appartenant aux troupeaux de régions à forte incidence d'ESB. Cette population est probablement plus représentative des animaux destinés à la consommation humaine que les deux catégories précédentes. Les problèmes de faisabilité que poserait l'étude de ces cohortes doivent être discutés et comparés à l'importance des résultats attendus, dans une perspective d'évaluation et de gestion des risques. Des calculs ont été faits pour déterminer le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir une estimation suffisamment précise de la prévalence de l'ESB. Sous l'hypothèse d'une prévalence attendue de 3 pour 1000 (valeur observée en Suisse chez les animaux morts), 11 400 bovins doivent être examinés. Pour une prévalence plus basse, de l'ordre de 0,1 pour 1000, (hypothèse *a priori* plus probable compte tenu de l'incidence de l'ESB en France), il faut examiner environ 40 000 bovins.

Les régions de Bretagne, Basse Normandie et Pays de Loire totalisent 80% des cas français d'ESB (et 75% des cas NAI). Les données disponibles indiquent qu'il serait possible, en réalisant l'étude dans ces trois régions, d'obtenir en quelques mois le nombre d'animaux nécessaires, sous l'hypothèse d'une prévalence de 0,1 pour 1000. Il est important d'assurer un "monitoring" des résultats des tests permettant, le cas échéant, de réorienter l'étude (en particulier de l'étendre à d'autres régions ou d'autres populations de bovins), en fonction des prévalences observées à des points intermédiaires.

6. Mise en œuvre pratique

En ce qui concerne le protocole des tests, il est recommandé que le test rapide qui sera choisi soit systématiquement répété à deux reprises sur chaque prélèvement. Le Western blot conventionnel serait effectué chaque fois que l'un au moins des tests rapides serait

positif. L'analyse de la reproductibilité du test rapide, et des divergences entre test rapide et Western blot conventionnel, entre dans le protocole de validation du test rapide mis en œuvre parallèlement à l'étude prévalence. Les résultats complets de cette validation seront disponibles plusieurs mois après la fin de l'étude de prévalence, dans la mesure où cette validation fait appel à des études complémentaires, dont l'inoculation à l'animal, réalisées par des laboratoires de recherche.

Ce décalage soulève des problèmes importants dans la gestion pratique des résultats des tests. En effet, avant d'avoir pu correctement évaluer le test rapide, il faudra définir des procédures qui seraient appliquées aux animaux déclarés positifs. Il est proposé de déclarer " positifs au titre de l'étude " les animaux pour lesquels i) les deux tests rapides sont positifs que le résultat du Western blot conventionnel soit positif (animal " positif confirmé ") ou négatif (animal " positif non confirmé "), et ceux pour lesquels ii) l'un des deux tests rapides et le Western blot conventionnel sont positifs. Seront déclarés négatifs, i) les animaux pour lesquels les deux tests rapides sont négatifs, et ii) ceux pour lesquels l'un des deux tests rapides est négatif et le Western blot conventionnel négatif.

Les animaux positifs (" positifs confirmés " et " positifs non confirmés ") seront considérés comme susceptibles d'être infectés par l'agent de l'ESB et ne devront pas entrer dans une chaîne alimentaire. Pour des raisons de cohérence avec les procédures sanitaires actuellement en vigueur en France, des mesures de précaution plus larges doivent être discutées.

Il est important de souligner que parmi les animaux déclarés " positifs non confirmés ", certains pourront être des " faux positifs ", la spécificité des tests n'étant vraisemblablement pas parfaite. De manière générale, pour une spécificité donnée, la valeur prédictive positive (c'est à dire la probabilité que le résultat positif soit exact) d'un test augmente avec la prévalence de la maladie. Sous l'hypothèse que les tests de détection de la PrP-res aient une très bonne spécificité, si la prévalence de l'ESB est de l'ordre de 0,1 pour 1000, un animal déclaré positif selon les critères définis ci-dessus a

plus de 90 chances sur 100 d'être réellement atteint d'ESB ; pour des prévalences plus élevées (de l'ordre de 1 pour 1000 ou plus), la proportion de " faux positifs " sera négligeable.¹

7. Suivi du programme

L'étude de prévalence demandera la mise en place d'une logistique et la mise en œuvre de moyens adaptés à la taille de ce programme et à l'importance de ses objectifs : obtenir rapidement une estimation fiable et précise de la prévalence de l'ESB en France.

Le déroulement de l'étude devra être suivi par un comité indépendant des investigateurs et du promoteur. Ce comité pourrait, entre autres tâches :

- 1) S'assurer *a priori* de la mise en place d'un système d'assurance qualité performant.
- 2) S'assurer de la qualité des données recueillies, éventuellement en demandant des audits externes.
- 3) Discuter avec les investigateurs les résultats intermédiaires et finaux de l'étude et les conclusions qui en découlent
- 4) Constituer, à l'occasion de cette campagne, une banque d'échantillons qui permettra la mise en œuvre ultérieure d'études et de recherches complémentaires si elles s'avéraient nécessaires
- 5) Veiller à la sécurité des personnels amenés à manipuler les échantillons.

¹ Il est également utile de noter que, au sens des critères précédents, un animal pourra être qualifié de négatif alors qu'un test rapide sur deux a donné un résultat positif, non confirmé par le Western-Blot conventionnel. Cette situation peut aussi bien correspondre à un résultat faussement positif (option qui a été retenue) qu'à un prélèvement contenant des quantités de PrPres à la limite du seuil de détection du test rapide et, *a fortiori*, du Western-Blot. La valeur relative de ces deux interprétations ne pourra être évaluée qu'après la fin du protocole d'évaluation des tests, c'est à dire après la fin de l'étude de prévalence : il est possible que cette étude d'évaluation montre que ce type de prélèvement correspondait à des animaux présentant une infectiosité détectable. En conséquence, différentes options de gestion de précaution de ces cas devrait être évaluées (en particulier la consigne à long terme des carcasses correspondantes).

La présence, dans le comité indépendant, de scientifiques ayant l'habitude des études chez l'homme et/ou chez l'animal impliquant des grands nombres d'individus est hautement souhaitable.

La validation des tests sera conduite en parallèle et des échanges réguliers entre les deux groupes d'investigateurs devront avoir lieu pendant toutes les phases de ce programme.

Enfin, ce programme pourrait fournir les éléments permettant d'évaluer la faisabilité d'une éventuelle surveillance systématique à grande échelle de l'ESB.

Fontenay aux Roses, le 2 mars 2000



Dominique Dormont
Président du Comité interministériel sur les ESST