

Maisons-Alfort, le 9 juin 2004

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments concernant la mise en évidence de résultats positifs aux tests de dépistage de la tremblante chez des ovins de génotype ARR/ARR

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

I- Contexte

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) s'est auto-saisie le 29 janvier 2004 suite à la mise en évidence dans le cadre du programme de dépistage de la tremblante en abattoirs et en équarrissage, de trois animaux de génotype ARR/ARR présentant un résultat positif aux tests de la tremblante.

Ces trois brebis appartiennent à la catégorie des animaux à résultat dit «labile» ou «discordant», c'est-à-dire positif au test Biorad mais négatif au Western Blot de confirmation utilisé au Laboratoire National de Référence de l'Afssa sur les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST).

C'est la première fois qu'en France, des animaux de génotype conférant la résistance la plus élevée au développement des signes cliniques de la tremblante présentent un résultat positif à un test de dépistage de la tremblante.

Actuellement les mesures de police sanitaire de la tremblante ovine¹ sont fondées sur un abattage sélectif des animaux de génotype sensible. Par ailleurs, des programmes de sélection génétique sont en cours au sein du cheptel ovin, visant à sélectionner les animaux de génotype résistant.

II- Avis du Comité d'experts spécialisé sur les ESST

L'agence a saisi le Comité d'experts spécialisé sur les ESST afin qu'il puisse évaluer les conséquences de ces observations en termes de santé publique et de santé animale. Celui-ci a rendu l'avis suivant en date du 1^{er} juin 2003.

« Le Comité a été saisi d'une demande d'avis datée du 29 janvier 2004 en relation avec la mise en évidence, dans le cadre de la surveillance de la tremblante (dépistage en abattoirs et en équarrissage), de trois ovins ARR/ARR qui ont présenté un résultat positif à des tests de dépistage de la tremblante. L'avis du Comité était sollicité sur « les conséquences de cette observation notamment en termes de santé publique et de santé animale et plus particulièrement au regard des programmes de sélection génétique actuellement en cours sur le territoire national ».

Données disponibles.

Ces trois ovins ont été repérés parmi un ensemble de cas dits « discordants » relevés dans le programme de dépistage actif des ESST chez les petits ruminants en abattoir et équarrissage.

¹ Arrêté du 27 janvier 2003 fixant les mesures de police sanitaire relatives à la tremblante ovine

Par discordants, il est entendu animaux dont le résultat sur le tronc cérébral postérieur est :

- positif par le test Elisa de Biorad (Platelia®BSE ou TeSeE®),
- confirmé par immunohistochimie (sauf pour l'un d'entre eux),
- négatif au western-blot de confirmation de l'Afssa de Lyon pratiqué après ultracentrifugation.

Les données actualisées par l'Afssa au 2 mars 2004 font état de 17 cas discordants parmi 151 cas ovins positifs en 2002, de 29 cas discordants parmi 97 cas ovins positifs en 2003 et de 5 parmi 12 en 2004, soit un total de 51 cas représentant près de 20 % des 260 cas de tremblante identifiés par le programme de surveillance active. A titre indicatif, rappelons, qu'au total, plus de 160.000 petits ruminants ont été testés entre 2002 et 2003 et qu'environ 43 % des tests ont été réalisés avec l'ELISA Biorad.

Les cas discordants concernent des animaux significativement plus âgés que les autres cas détectés par les tests rapides et sont plus souvent identifiés sur des animaux testés à l'abattoir qu'à l'équarrissage (note de l'Afssa Lyon du 24/04/2003). Enfin, ces cas ne sont jamais associés à la présence de signes cliniques comme l'atteste le fait qu'aucun cas n'ait été identifié entre 1994 et 2003 dans le cadre du réseau de surveillance passive de la tremblante (1700 cas analysés à l'INRA-ENVT et plus de 400 à l'AFSSA de Lyon à l'aide du test Bio-Rad et d'un western-blot conventionnel).

Ces critères d'identification sont similaires à ceux décrits pour la souche Nor-98².

Par ailleurs tous ces cas discordants sont négatifs au test Western Blot de Prionics. Les résultats positifs produits par le test ELISA Biorad sont souvent associés à des signaux élevés (jusqu'à 10 fois le seuil de positivité) et il est donc peu probable que les discordances soient uniquement dues à une moindre sensibilité analytique des western-blots de l'Afssa ou de Prionics. La discordance observée entre les tests semble liée à une sensibilité importante de la PrP-res produite chez ces animaux atypiques vis-à-vis du traitement à la protéinase K (résultats obtenus par les laboratoires CEA de Saclay et de Fontenay, de l'Afssa de Lyon dans le cadre du réseau « typage de souche d'ESST chez les petits ruminants » et aussi par le laboratoire de Weybridge).

Parmi l'ensemble de ces cas discordants, 35 ont pu faire l'objet d'un génotypage pour les codons 136, 154 et 171 du gène PrP (données LABOGENA). Le tableau suivant donne la répartition des génotypes disponibles chez les ovins repérés dans le cadre du programme de dépistage et qui sont (1) discordants (2) positifs confirmés par western-blot Prionics ou AFSSA (3) négatifs aux tests en 2002, ainsi que (4) la fréquence UPRA relevée dans le cadre du programme de sélection de la DPEI (Pailhière, communication personnelle, typages faits en 2002, avant le démarrage de la sélection et donc représentatifs de l'ensemble des cheptels ovins français inscrits dans des livres généalogiques).

Génotype	Discordants N = 35 (100 %)	Positifs confirmés N = 103 (100 %)	Négatifs N = 496 (100 %)	UPRA N = 98517 (100 %)
VRQ/VRQ		2 (2)	2 (0)	634 (1)
ARQ/VRQ	2 (5)	37 (36)	25 (5)	4684 (5)
ARQ/ARQ	14 (40)	59 (57)	117 (24)	26189 (27)
VRQ/AHQ		1 (1)	0 (0)	236 (0)
ARQ/AHQ	3 (9)	1 (1)	15 (3)	2259 (2)
AHQ/AHQ			2 (0)	149 (0)
VRQ/ARR	1 (3)	3 (3)	32 (7)	5118 (5)
ARQ/ARR	11 (31)		182 (37)	34120 (35)
AHQ/ARR	1 (3)		8 (2)	1969 (2)
ARR/ARR	3 (9)		113 (23)	23159 (23)

² Voir avis du Comité « sur l'annonce d'un nouveau type de tremblante dans les troupeaux norvégiens » du 29 septembre 2003

La distribution des génotypes chez les animaux discordants est très différente de celle des animaux à tests confirmés positifs par western-blot Prionics ou Afssa (46 % de porteurs d'ARR chez les discordants contre 3 % pour les positifs confirmés, χ^2 de 40.3), et indique que l'ensemble des génotypes est indifféremment susceptible à l'exception peut-être des ARR/ARR qui pourraient présenter une plus grande résistance, sans que celle-ci soit absolue.

Des observations similaires ont été rapportées au Royaume-Uni et en Allemagne.

Au Royaume-Uni (source web DEFRA) dans le cadre du programme actif de surveillance concernant 50 630 animaux abattus entre janvier 2002 et mars 2003, analysés pour la présence de PrP-res et génotypés pour la PrP, 28 individus ont fourni un résultat positif au test ELISA Biorad (sur 29 201 animaux testés), mais négatif en immunohistochimie (par ailleurs 24 animaux à test Biorad positif ont été confirmés en immunohistochimie). Parmi ces 28 ovins, 8 étaient de génotype ARR/ARR. Un groupe de travail réuni par le DEFRA a conclu le 17 septembre 2003 qu'il n'était pas possible à cette date de tirer des conclusions définitives sur les causes et la signification de ces cas et recommandait plus de recherches (propriétés des réactifs, significations des marqueurs de la maladie, études de l'épidémiologie, mesure de l'infectiosité sur ovins et souris, recherche d'anomalies génétiques).

En Allemagne, un total de 48 cas ont été détectés par le programme de surveillance active entre mars 2002 et fin juillet 2003 et confirmés soit par immunohistochimie soit par le Western-blot de l'OIE. Sur 38 de ces cas initialement repérés par le test ELISA Biorad, 24 n'ont pas été confirmés en Western Blot Prionics, alors que tous les cas initialement repérés en WB Prionics ont été confirmés par ELISA³.

Parmi les 24 cas discordants, 18 ont été génotypés, avec les résultats suivants : 8 ARQ/ARQ, 4 ARQ/AHQ, 4 AHQ/AHQ et 2 ARR/AHQ. Parmi les 14 cas concordants (initialement repérés par le test Biorad), 7 ont été génotypés, tous avec un résultat ARQ/ARQ. Par ailleurs, 2 ovins ARR/ARR ont été détectés positifs avec le test ELISA Bio-Rad dans le cadre de la surveillance active. Ils font actuellement l'objet d'un test d'inoculation chez la souris.

La résistance des ovins ARR/ARR aux EST n'est pas absolue. Il est en effet possible, par une inoculation intracérébrale d'un isolat ESB, de provoquer une ESST clinique chez des animaux ARR/ARR, comme le montre l'expérience de l'IAH sur des animaux de race Suffolk conduisant à 3 cas cliniques sur 19 inoculés⁴. Une expérience similaire sur ovins de race Pol Dorset est en cours à l'INRA. A l'heure actuelle, aucun cas clinique n'a été observé chez les 10 ARR/ARR inoculés par voie intracérébrale avec de l'ESB bovine 32 mois p.i., alors que les 9 témoins ARQ/ARQ sont morts après une durée d'incubation de 14 à 16 mois.

En revanche chez les animaux de ce génotype, (hormis le cas rapporté par Ikeda et al⁵) aucun cas de tremblante naturelle n'a encore été rapporté. Ces observations portent maintenant sur plusieurs milliers de cas confirmés (UK, 2364 cas de 1998 à 2002 : données VLA ; France, 441 cas de 1996 à 2001 : données Afssa), alors que ce génotype est relativement fréquent : 27 % des génotypes au Royaume -Uni d'après une analyse de Dawson⁶ portant sur 700 000 génotypes, 23 % en France d'après les données UPRA⁷ portant sur 100 000 génotypes.

Des résultats très récents rapportés dans le cadre du réseau français de typage de souche⁸ font état d'une transmission (et donc d'une infectiosité) pour deux isolats discordants (O642, ARQ/AHQ et O643, ARR/ARQ) inoculés par voie intracérébrale à des souris transgéniques (Tg 338) surexprimant le gène de la PrP ovine (allèle VRQ). Les animaux inoculés ont succombé à

³ Buschmann et al, 2004, J Virol Methods, 117, 27-36

⁴ Houston et al, 2003, Nature 423, 498

⁵ Ikeda et al, 1995, J Gen Virol 76, 2577-2581

⁶ Dawson, 2004, Genet Sel Evol, à paraître

⁷ Pailhière, communication personnelle

⁸ Hubert Laude, communication au réseau typage de souches

une ESST après une période d'incubation variant entre 160 et 190 jours. Les signes cliniques observés, les durées d'incubation, les profils électrophorétiques obtenus sur la PrPres cérébrale et l'absence de PrPres dans les tissus lymphoïdes périphériques sont autant de critères qui rapprochent ces isolats des cas de Nor-98 inoculés aux mêmes souris.

L'ensemble des cas discordants français fait l'objet d'une analyse approfondie dans le cadre du réseau français de typage de souche. Les résultats actuellement disponibles ne suggèrent pas que la ou les souches impliquées présentent des similitudes avec la souche d'ESB du point de vue de leurs caractéristiques biochimiques.

Discussion

L'observation de discordances dans les résultats obtenus par différents tests amène à s'interroger sur la signification biologique de la PrP anormale détectée chez ces animaux.

Certains travaux⁹ ont démontré l'existence d'une forme constitutive particulière de PrP qui co-existe avec la PrPc classique, chez certains animaux exprimant une PrP mutée, en l'absence de tout processus infectieux. L'article de Chiesa et al., notamment, fait état d'une PrP mutée (insertion de 9 motifs octa-repeat) qui forme spontanément des agrégats de petite taille et présente une résistance partielle à la PK, reproduisant ainsi quelques unes des propriétés caractéristiques des échantillons discordants. Cependant, à la lumière des premiers résultats d'inoculation expérimentale rapportés ci-dessus, l'hypothèse d'une PrPres non associée à un agent transmissible ne peut plus être évoquée de façon prépondérante dans le cas des isolats discordants.

Sur la base des données disponibles à ce jour, deux types d'hypothèses peuvent être formulées pour expliquer la mise en évidence récente de ces cas discordants :

Dans une première hypothèse, il pourrait s'agir d'une nouvelle souche de prions qui aurait la capacité d'infecter tous les génotypes de la PrP et produirait une PrPres présentant une faible résistance à la PK. Dans ce cas, il faut aussi admettre, pour expliquer l'absence apparente de cas cliniques sur le terrain, (i) soit que cette souche ne s'accompagne pas de signes cliniques (ou qu'elle est associée à des signes cliniques observables que chez des animaux très âgés), (ii) soit que cette nouvelle souche n'est apparue que récemment, les formes cliniques correspondantes étant à venir.

Ces caractéristiques expliqueraient pourquoi ces cas discordants n'ont pu être identifiés que suite à la mise en place de tests systématiques chez un grand nombre d'animaux. Le fait que différentes souches de prions soient associées à des dépôts de PrPres ayant une résistance différente au traitement PK est maintenant largement documenté dans le cas de l'ESB et de la souche Nor-98.

Dans une deuxième hypothèse, il pourrait s'agir d'une forme génétique¹⁰ ou sporadique¹¹ de tremblante qui affecterait les animaux de manière faiblement dépendante du polymorphisme PrP aux codons 136, 154 et 171. Dans cette hypothèse, il s'agirait aussi d'une maladie qui ne s'accompagne pas de signes cliniques ou n'affecte cliniquement que les animaux très âgés.

⁹ Westaway et al, Cell, 1994, 76, 117-119 ; Chiesa et al, J Virol, 2003, 77, 7611-7622

¹⁰ Par forme génétique, il est entendu : cas d'ESST lié à l'existence d'une ou plusieurs mutations intervenant dans la séquence codante du gène de la PrP.

¹¹ Par forme sporadique, selon une définition proche de celle retenue pour les cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique, il est entendu : cas d'ESST apparu spontanément sans qu'aucune autre cause génétique ou infectieuse n'ait pu être identifiée à ce jour.

Avis

Les observations effectuées sur les cas associés à des résultats discordants entre les tests biochimiques (animaux positifs au test ELISA et négatifs en Western Blot) en France, en Allemagne et au Royaume-Uni, chez des animaux de tous génotypes PrP, y compris ARR/ARR, sont encore trop fragmentaires et préliminaires pour qu'il soit possible de conclure de façon définitive sur la nature et l'origine de ces cas. Cependant, les premiers résultats d'inoculation expérimentale obtenus sur deux cas discordants provenant d'ovins hétérozygote ARR chez la souris de laboratoire indiquent la présence d'un agent transmissible, et une grande similarité de comportement avec la souche Nor-98 (elle-même mal connue). Ces résultats ne peuvent toutefois être généralisés sans réserve car il n'est pas acquis aujourd'hui que les animaux qualifiés de discordants représentent un ensemble homogène. Les résultats des autres inoculations en cours (notamment sur les cas ARR/ARR) devraient permettre d'éclaircir ce point.

En absence de données épidémiologiques et expérimentales claires, l'existence de spécificités génétiques originales pouvant expliquer la présence de formes génétiques est de l'ordre de l'hypothèse de même que la possible existence de formes sporadiques chez les ovins.

Des observations et expérimentations de différentes natures doivent être mises en place pour obtenir ces informations et pour permettre une évaluation rationnelle des risques sanitaires potentiels liés à ce phénomène :

1. mise en place d'une étude épidémiologique représentative à l'échelle du territoire français, en utilisant uniquement le test Biorad en première intention. Cette étude devra être conçue de façon à déterminer la répartition géographique de ces cas discordants et à caractériser une éventuelle transmission à l'intérieur des troupeaux.
2. test de transmission à la souris et aux ovins sur un panel représentatif de la population des cas discordants,
3. caractérisation de la souche par le bio-essai standard,
4. recherche de la PrPres en dehors de l'encéphale chez les animaux discordants et étude d'une possible transmission horizontale ou verticale par exposition orale expérimentale.
- 5 réalisation d'une analyse génétique des cas discordants (et notamment des ARR/ARR concernés) en s'intéressant au gène de la PrP (qu'il conviendrait de séquencer intégralement), mais aussi à d'autres gènes, puisqu'il est maintenant établi que plusieurs gènes interviennent dans le contrôle de la durée d'incubation de la tremblante¹².

En attendant les résultats des expérimentations et recherches visant à répondre à cet ensemble de questions scientifiques, quelques conclusions provisoires peuvent être avancées :

Même s'il était définitivement démontré que des moutons de génotype ARR/ARR ont été infectés naturellement par une nouvelle souche de tremblante, les données disponibles à ce jour n'indiquent pas que ces animaux soient plus sensibles à cette nouvelle souche qui semble affecter indifféremment tous les génotypes. Ces résultats ne suggèrent donc pas d'interrompre la sélection des éleveurs sur l'allèle ARR, mais plutôt de renforcer la surveillance des animaux atteints par leur génotypage systématique après confirmation, et de mettre en place un protocole de surveillance active à grande échelle pour apprécier l'évolution de ces cas discordants. En terme de santé publique, la présence de PrP-res dans l'encéphale de moutons ARR/ARR conduit à recommander que soit maintenue l'interdiction de sa commercialisation chez l'animal âgé, quel que soit son génotype. »

¹² Lloyd et al (2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6279-9283) ; Manolakou et al, (2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 7402-7407 ; Moreno et al (2003, Genetics, 164, 2085-2091) ; Stephenson et al (2000, Genomics 69: 47-53))

III - Avis de l'Afssa

L'Afssa considère que l'avis du CES ESST apporte les éléments scientifiques de réponse actuellement disponibles aux questions soulevées par l'observation de ces nouveaux cas. Compte tenu du peu de données disponibles, il conviendrait que soient menées rapidement les expérimentations recommandées par le CES ESST, seules à même de révéler d'éventuels risques sanitaires liés à ces cas.

Martin HIRSCH