

Maisons-Alfort, le 25 mars 2005

AVIS

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur l'analyse des risques
liés aux encéphalopathies spongiformes transmissibles dans les filières petits
ruminants, les forces et faiblesses du dispositif actuel et les possibilités
d'évolution**

Actualisation en mars 2005 de l'avis de décembre 2001

27-31, avenue
du Général Leclerc
BP 19, 94701
Maisons-Alfort cedex
Tel 01 49 77 13 50
Fax 01 49 77 26 13
www.afssa.fr

REPUBLIQUE
FRANÇAISE

1- Analyse des risques liés aux ESST des petits ruminants pour la santé publique	4
1.1 Analyse des données disponibles sur les risques d'occurrence de la souche d'ESB chez les petits ruminants	4
a) les populations de petits ruminants ont été exposées à l'agent de l'ESB et leur contamination a été possible	4
b) Les conditions d'un entretien ultérieur en l'absence d'exposition alimentaire existent	7
b.1) Sources et matières virulentes	7
b.2) Transmission inter individuelle	8
b.3 Vecteurs de transmission	10
b.4 Voies de pénétration	10
b.5 Transmission entre élevages	10
c) Eléments de quantification	13
c.1) Quantification fondée sur les données de typage de souche	13
c.2) Quantification fondée sur des travaux d'analyse de risque	14
c.3) conclusion sur la fréquence d'une souche indistinguishable de l'ESB chez les petits ruminants.	15
1.2 la tremblante	15
2- Analyse des bases scientifiques et techniques, des intérêts et limites des mesures actuelles de protection du consommateur en cas de présence de l'ESB chez les petits ruminants	15
2.1 Intérêt et limites du retrait des MRS pour assurer la salubrité des carcasses dans l'hypothèse de la présence de l'ESB chez les petits ruminants	17
2.2 Evaluation de la sécurité des produits laitiers en cas de présence de l'ESB chez les petits ruminants	20
a) Données épidémiologiques et expérimentales	20
b) Analyse de risque	20
2.3. Evaluation de la capacité du dispositif actuel à identifier des cheptels indemnes d'ESST	25
3- Des avancées scientifiques et technologiques ouvrent la possibilité de faire évoluer le principe des mesures actuellement en place	26
3.1- Performances des tests rapides de détection de la PrPres chez les petits ruminants	26
3.2- Identification de souches d'ESST atypiques ou discordantes	27
3.3- Evaluation de la possibilité de tester des échantillons groupés	28
3.4- bases génétiques de la résistance aux ESST chez les petits ruminants	29
4- L'épidémiologie des ESST chez les petits ruminants ouvre la possibilité de mesures basées à terme sur l'identification de cheptels de statut connu comme source de denrées alimentaires	33
4.1- Epidémiologie descriptive des ESST chez les petits ruminants comme base d'échantillonnage	33
4.2- Applicabilité des tests rapides à la qualification de cheptels	34
4.3- Identification des cheptels soumis à police sanitaire	35
4.4- Une connaissance du statut des cheptels sources permettrait l'allègement éventuel de la liste des MRS	35
4.5- Prérequis	35
5- La validation d'outils et la mise en place d'un réseau de typage de souches permettent l'adaptation des mesures dans les cheptels atteints identifiés au point 4	36
5.1- Identification des outils disponibles	36
5.2- Place des outils disponibles à court terme et perspectives	38
6- Des contrôles individuels peuvent fournir des garanties additionnelles pour certaines denrées de petits ruminants issus des cheptels de statut inconnu	39

6.1- Produits laitiers	39
6.2- Carcasses	39
6.3- Prérequis	40
7- La mise en oeuvre de plans d'amélioration génétique représenterait un axe majeur, mais retardé dans le temps, d'amélioration de la situation sanitaire	40
7.1- Principe des plans d'amélioration génétique de la résistance à la tremblante	40
7.2- Application en France	42
7.3. Limites scientifiques et techniques	43
8- Production, importation et consommation de denrées issues de petits ruminants	44
8.1- Production, importation et consommation de viande de petits ruminants	44
8.2 Production et consommation de fromages d'origine ovine et caprine	45
9-Avis	46
9.1-Contexte de l'avis	46
9.2- avantages et inconvénients de différentes options	47
a) niveau 1 : ne pas modifier le dispositif actuel	48
b) niveau 2 : diminuer progressivement l'exposition des consommateurs au risque d'ESST des petits ruminants avec une attention spécifique vis-à-vis du risque ESB	48
c) niveau 3 : diminuer rapidement le niveau d'exposition du consommateur aux agents des ESST des petits ruminants	49
9.3 Critères de choix et conséquences pour l'analyse scientifique	50
10-Références	51

Le Comité d'Experts Spécialisé sur les ESST a été consulté le 19 novembre 2004 sur l'actualisation de l'avis « l'analyse des risques liés aux encéphalopathies spongiformes transmissibles dans les filières petits ruminants, les forces et faiblesses du dispositif actuel et les possibilités d'évolution », publié en février 2002,- dans le cadre d'une saisine datée du 13 novembre 2001, sur une demande d'avis datée du 19 novembre 2001 de la Direction Générale de l'Alimentation, de la Direction de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes, et de la Direction Générale de la Santé.

Le Comité a donc conduit une analyse, quantifiée dans la mesure où les données disponibles pouvaient le permettre, sur :

- 1-les éléments disponibles sur les risques d'occurrence de la souche d'ESB chez les petits ruminants et leur interprétation,
- 2-l'analyse du degré de sécurisation que confèrent les mesures réglementaires actuelles au regard de ce risque et leurs limites éventuelles.

Par ailleurs, le Comité, au regard de ses conclusions du point 2, a considéré qu'il relevait de ses missions de fournir aux décideurs une vision aussi exhaustive que possible des mesures nouvelles rendues possibles par l'amélioration récente des connaissances scientifiques, des méthodes, ou des outils technologiques. Ces mesures et leur impact possible en matière de santé humaine et animale sont décrits aux points 3 à 7. Une attention spécifique a été apportée à la mise en évidence des contraintes de durée (en dehors de toute considération additionnelle de logistique de mise en place) ainsi qu'aux prérequis nécessaires à certains types d'action, qui pourraient conditionner certains choix d'anticipation. Enfin, le Comité a émis un avis (point 9) sur la hiérarchie de ces mesures et la chronologie de leur mise en place en fonction des critères de décision qui pourraient être retenus par les pouvoirs publics.

1- ANALYSE DES RISQUES LIES AUX ESST DES PETITS RUMINANTS POUR LA SANTE PUBLIQUE

1.1 Analyse des données disponibles sur les risques d'occurrence de la souche d'ESB chez les petits ruminants

a) les populations de petits ruminants ont été exposées à l'agent de l'ESB et leur contamination a été possible

Depuis la démonstration expérimentale de la sensibilité des ovins et des caprins par voie orale, à l'agent de l'ESB, la question du passage dans les conditions naturelles de l'agent de l'ESB aux petits ruminants a été posée. L'analyse des facteurs d'exposition par voie alimentaire conduit à considérer que les conditions ont pu être réunies dans le passé.

Ainsi, au Royaume Uni, les farines n'ont été interdites chez les petits ruminants qu'en 1988 et des conditions de contamination croisées ont pu exister au moins jusqu'en 1996, date d'interdiction complète de ces farines dans toutes les espèces. En France, l'utilisation de ces farines a été interdite en 1994. Malgré le retrait des MRS et des cadavres en 1996 pour la fabrication des farines destinées aux non ruminants, des risques de contamination ont pu subsister, comme le suggère l'apparition de cas bovins nés après cette date. L'interdiction totale des farines est datée de novembre 2000.

En France, les systèmes de production de viande ovine sont diversifiés et les schémas d'alimentation des agneaux et brebis sont nombreux et très hétérogènes (en fonction de la race [50 races ovines en France], du système d'élevage [plein air, semi plein air, bergerie], de la région de production,...). Les principaux types de production sont :

- 1- les agneaux de lait ou agnelets (production peu importante sauf dans certaines régions; poids de carcasse : de 7-13 kg)

2- les agneaux de bergerie ou agneaux de 100j ; cette production représente 50% de la viande ovine produite en France (poids de carcasse : de 15-22kg) ; ces agneaux de bergerie peuvent être issus de brebis allaitantes ou laitières ; dans le cas particulier du bassin de Roquefort, ces agneaux sont souvent élevés dans des élevages d'engraissement spécialisés ;

3- les agneaux d'herbe ou agneaux « gris » ; généralement vendus à plus de 6 mois, ils représentent 20 à 25% de la viande ovine produite en France ;

4- les brebis et béliers de réforme, qui représentent 15 à 20% du tonnage de viande ovine nationale.

Le schéma général d'alimentation des ovins comporte trois périodes principales :

- la PERIODE DE LA NAISSANCE AU SEVRAGE ; l'alimentation est essentiellement, sinon exclusivement, lactée. Selon les régions et les systèmes de production, la séparation d'avec la brebis peut intervenir très tôt (dès la naissance) ou l'allaitement durer jusqu'à 4-5 mois. Dans le premier cas, l'agneau est allaité artificiellement avec des lacto-remplaceurs. L'allaitement artificiel, dans les autres cas, est surtout utilisé en cas d'agneaux doubles ou triples que la brebis ne peut nourrir : ainsi par exemple, en région Provence-Alpes-Côte d'Azur, environ 10% des agneaux sont nourris par allaitement artificiel suivi d'un passage progressif à une alimentation solide à partir du premier mois ; il peut être noté que les brebis dont le lait est destiné à la fabrication de fromage (brebis laitières) allaitent leurs agneaux au moins jusqu'au premier mois (à l'exemple du bassin de Roquefort où le décret de l'AOC précise que le lait ne peut être utilisé pour la fabrication de fromage qu'à partir du 25^{ème} jour suivant la mise bas) ;

- la PERIODE DE CROISSANCE, qui s'étend du sevrage à la finition pour les agneaux destinés à la boucherie ou à l'incorporation dans le troupeau pour les agnelles ou béliers de renouvellement ; dans ces cas, l'alimentation peut être à base de poudre de lait (ou de lait artificiel) selon la date de séparation avec la mère, suivie d'aliments concentrés (granulés 1^{er} âge et aliment croissance ou aliment d'engraissement ; voir tableau 1 de composition des aliments complémentaires) et/ou d'herbe ;

- la PERIODE DE PRODUCTION, qui concerne les animaux adultes du troupeau (agnelles, brebis et béliers) est caractérisée par une alimentation à base d'herbe (prairies permanentes ou artificielles, parcours de montagne, chaumes, etc...), de foin, de paille, d'ensilage selon les régions et la saison. Certaines périodes de la vie des brebis et des béliers peuvent donner lieu à des complémentations par des aliments concentrés : au moment de la lutte (« flushing »), avant la mise-bas (« steaming ») et/ou lors de la lactation.

En plus de la ration de base, un complément minéral et vitaminique (CMV) peut être distribué pendant des périodes plus ou moins longues de leur vie.

En ce qui concerne le risque lié à l'utilisation de protéines et graisses d'origine animale chez les ovins et les caprins, les aliments concernés sont les concentrés, le CMV (avec le phosphate bicalcique) et les lacto-remplaceurs. La composition des aliments concentrés pour ovins et caprins est assez proche de celle des bovins et la nature des matières premières varie fortement en fonction des cours du marché.

Il convient de rappeler à ce stade que la situation française est très hétérogène selon les régions, les races et les systèmes d'élevage.

L'alimentation des ovins et caprins dans les autres pays européens, notamment dans les pays exportateurs de viande ovine en France (RU, Pays-Bas, Espagne, etc..) est très comparable, avec le même niveau d'hétérogénéité.

L'alimentation des chèvres suit le schéma général établi pour les ovins avec des spécificités liées au statut de forte productrice laitière, particulièrement dans les bassins à forte production spécialisée (à l'exemple de la région Poitou-Charentes, Midi-Pyrénées (Lot, Rocamadour) et Sud-Est (moins intensif).

Tableau 1 : Composition type des aliments concentrés destinés aux agneaux
D'après C. Dudouet, La production du mouton, Editions France Agricole (1997)

	Aliment de démarrage	Aliment de croissance
CATEGORIES D'INGREDIENTS	Grains de céréales Coproduits de sucrerie Coproduits de graines oléagineuses Coproduits de céréales Protéagineux et coproduits Fourrages séchés Prémélanges Minéraux	Grains de céréales Coproduits de sucrerie Coproduits de graines oléagineuses Coproduits de céréales Protéagineux et coproduits Fourrages séchés Prémélanges Minéraux
CONSTITUANTS ANALYTIQUES POUR CENT	Protéines brutes 17 Matières grasses brutes 2,2 Cellulose brute 7 Cendres brutes 9	Protéines brutes 16,5 Matières grasses brutes 2 Cellulose brute 10 Cendres brutes 9
VITAMINES (POUR 1 KG)	A 10000 U B1 10 mg D3 2000 U E 10 mg	A 10000 U B1 10 mg D3 2000 U E 10 mg
MODE D'EMPLOI	A distribuer dès 5 jours aux agneaux et chevrettes. Renouveler quotidiennement	Aliment pour agneaux en croissance. A donner à volonté jusqu'à 1 kg par tête et par jour. Laisser du fourrage (foin de pré ou de paille) à volonté aux agneaux

Pour ce qui concerne les usages de terrain, d'après un document de l'AFSSA¹ compilant diverses sources, les compléments concentrés énergétiques contenaient jusqu'à 0,5% de graisses animales, utilisées jusqu'en décembre 1993, et les concentrés azotés jusqu'à 0,5% de graisses animales et 5% de protéines animales (hors poissons), utilisées jusqu'en décembre 1989. Des graisses de peau ont été incorporées jusqu'en 1996. Pour les lacto-remplaceurs, les graisses animales (essentiellement suif) peuvent être présentes quand l'aliment est donné froid. Le phosphate bicalcique provient du traitement des os pour moins de 25% de la consommation. Bovins et ovins ont donc eu des régimes assez proches. Les brebis ont pu consommer légalement des concentrés azotés d'origine animale jusqu'en 1994. Les graisses animales (os, suif) sont encore utilisées mais leur utilisation décroît (anticipation d'une interdiction), sauf dans les lacto-remplaceurs (suifs). Pour ces derniers l'utilisation depuis mi-2001 de graisses bovines prélevées avant la fente de la colonne vertébrale devrait avoir considérablement limité le risque de contamination croisée correspondant.

¹ Pratiques de l'alimentation des ovins et caprins, AFSSA, 22 Novembre 2001

b) Les conditions d'un entretien ultérieur en l'absence d'exposition alimentaire existent

Les données actuellement disponibles ne suggèrent pas une distribution tissulaire de l'agent responsable de l'ESB différente chez les petits ruminants de ce qui est connu en matière de tremblante (voir § 2.1). En conséquence, l'analyse suivante des risques d'entretien de la souche d'ESB en cas de contamination initiale est essentiellement fondée sur les données connues en matière de tremblante.

b.1) Sources et matières virulentes

La transmission de l'infection par des ovins en phase préclinique repose sur des arguments convergents, issus pour la plupart d'observations réalisées en élevages atteints. L'introduction d'ovins infectés en phase préclinique est fréquemment suggérée pour expliquer l'apparition de la tremblante dans des troupeaux considérés jusque là comme indemnes (Hoinville 1996) (Ducrot & Calavas 1998). Le risque d'apparition de tremblante clinique ne semble pas différent pour les agneaux nés dans l'année précédant l'apparition des symptômes chez la mère, et pour les agneaux nés pendant la phase clinique maternelle (Parry 1983). Dans une étude épidémiologique (Hopp et al. 2001) norvégienne, il a été démontré que l'introduction de brebis était un facteur de risque (cf. infra).

Différentes sécrétions et excréments, différents organes ont été testés pour évaluer la présence d'infectiosité ou de PrPres (Tableau 1). Les résultats doivent être interprétés en tenant compte au moins du seuil de détection de la technique et de la pertinence de l'échantillon animal (espèce, nombre, génotype PRNP, tremblante naturelle ou expérimentale, phase clinique ou préclinique). Dans les conditions d'essai, aucune infectiosité n'a été décelée dans les fèces, l'urine, la salive, le colostrum, le lait, le sperme d'ovins infectés. Toutefois, une étude (Shaked et al. 2001), non confirmée par deux autres groupes (Furukawa et al, 2004 ; Serban et al., 2004) trouve de la PrPres dans l'urine de certaines espèces (bovins, hamster, homme), sans qu'une infectiosité ait été recherchée chez les bovins et l'homme. Chez le hamster, les résultats de transmission ont montré la présence de PrPres chez les receveurs, sans développement de symptômes, et ne peuvent donc être interprétés comme démontrant de manière certaine la présence d'une infectiosité dans l'urine. Aucune donnée comparable n'est disponible chez les petits ruminants. Par ailleurs, une infectiosité a été mise en évidence dans certains organes ou tissus, comme les glandes salivaires, la muqueuse nasale et les intestins (Hadlow et al. 1980a; Pattison & Millson 1962) (Hadlow et al. 1982). L'ensemble de ces éléments suggère la possibilité d'une très faible infectiosité et/ou d'une excrétion irrégulière pour l'urine, la salive, le jetage, les fèces.

En matière de tremblante naturelle, seule l'infectiosité du placenta est bien démontrée, sans être constante. La distribution de la PrPres a récemment été précisée : elle semble se cantonner principalement aux cellules trophoblastiques caronculeuses (Andreoletti et al 2002). Sur une même brebis, de la PrPres a été détectée sur le placenta lors d'une gestation et pas à la suivante (Race et al, 1998). Le déterminisme de la positivité du placenta semble lié au génotype des béliers utilisés. En effet, l'insémination d'une brebis de génotype sensible en incubation de tremblante avec de la semence issu d'un bélier de génotype sensible résulte en un agneau de génotype sensible et un placenta accumulant de la PrPres. L'insémination d'une brebis similaire avec la semence d'un bélier de génotype résistant (ARR/ARR) aboutit à un agneau hétérozygote ARR et un placenta ne contenant pas de PrPres (Tuo et al. 2001) (Andreoletti et al, 2002). La présence de PrPres placentaire a été décelée jusqu'à 470 jours avant l'apparition des premiers signes cliniques sur la brebis (Race et al, 2002). Les niveaux de PrPres observés dans les placentas sont d'environ (i) 50 à 100 fois moins élevés que dans les obex des animaux atteints en phase clinique et (ii) cinq à huit fois élevés que dans les organes lymphoïdes secondaires (Andreoletti et al 2002). Les rares données d'infectiosité disponibles (Race et al, 1998) semblent en accord avec ces chiffres. Les possibles variations de dose infectieuse ne sont pas documentées.

Le rôle du placenta dans la transmission est souvent mis en avant. Les annexes foetales souillent abondamment le périnée et la mamelle, ainsi que l'environnement. L'agneau peut alors se contaminer lors de la tétée ou par léchage. Le placenta peut être ingéré par une brebis

voisine et ainsi la contaminer. L'infectiosité ne serait pas modifiée par le passage digestif et se retrouverait alors dans les fèces (Dickinson 1976) cité par (Hoinville 1996). La contamination de l'environnement (litière, pâturage) est donc possible à partir de ces matières fécales infectées ou par persistance du placenta lui même, dans la zone d'agnelage.

En matière d'ESB ovine, les données expérimentales sont extrêmement parcellaires: elles indiquent que chez deux brebis inoculées par voie orale par de l'ESB bovine aucune accumulation de PrPres n'a été mise en évidence au niveau du cotylédon placentaire. Toutefois, les génotypes des béliers n'étant pas disponibles, ces résultats ne permettent aucune conclusion (Fodter et al, 2001)

Dans une étude épidémiologique menée en France, l'alimentation (aliments lactés et aliments composés) a été mise en cause dans la transmission de la tremblante entre élevages (Philippe, et al., 2005) (cf. infra).

b 2) Transmission inter individuelle

Un effet dose-réponse est démontré dans les essais expérimentaux de transmission, et se caractérise, quand l'inoculum est dilué, par une incidence plus faible de la maladie et un allongement de la période d'incubation (Kimberlin & Walker 1978). Dans les conditions naturelles, ces deux critères d'incidence et de durée d'incubation, dépendent de facteurs liés à l'exposition (dose d'agent infectieux à laquelle les animaux sont exposés et durée de l'exposition, en particulier pour des doses répétées) et à la réceptivité des animaux (d'origine génétique –polymorphisme du gène PRNP-, ou liée à des critères secondaires comme l'âge).

La transmission horizontale ou latérale, est bien établie (Brotherston et al. 1968) (Dickinson 1974). L'introduction de 140 agneaux, issus d'un troupeau considéré comme indemne et alors âgés de 3 ou 9 mois, dans un cheptel infecté, a conduit à l'apparition de signes cliniques de tremblante sur 5 des 140 animaux, dans un délai de 64 à 93 mois (Hourrigan et al. 1979).

L'importance relative des modalités directes et/ou indirectes de la transmission horizontale est mal connue.

La réduction du titre infectieux d'un homogénat de cerveau de hamster, expérimentalement infecté, n'était que de 2 à 3 log après 3 ans dans la terre (Brown & Gajdusek 1991). Ce résultat combiné aux connaissances sur l'extraordinaire résistance aux agents physiques et chimiques des prions, suggèrent la possibilité d'une transmission indirecte à partir de l'environnement contaminé. Toutefois cette hypothèse doit être pondérée en raison de la charge infectieuse probablement plus faible des excréta et une possible dilution, en particulier au pâturage.

Une série d'observations réalisées en Islande suggèrent un rôle de l'environnement dans le processus de contamination. Un programme d'éradication de la tremblante a été mis en œuvre dans ce pays depuis 1978 (Sigurdarson & Ducrot 1998). Le pays a notamment été divisé en zones de quarantaine dans les années cinquante, pour lutter contre l'adénomatose et le Maëdi - Visna (deux maladies virales du mouton), ce qui a permis de constituer des zones indemnes de tremblante à partir desquelles les exploitations atteintes de tremblante ont pu être repeuplées. Le programme d'éradication, bâti avec les éleveurs, est extrêmement draconien et comprend, pour tout troupeau déclaré infecté de tremblante :

- euthanasie du troupeau et enfouissement des cadavres à 1,5 m de profondeur, avec plantation d'arbres sur les zones d'enfouissement
- enfouissement des déjections, élimination du foin récolté sur l'exploitation pendant deux ans ;
- nettoyage approfondi à haute pression (150 Bar/cm²) avec une solution détergente des bergeries et du matériel, puis désinfection (500ppm hypochlorite), aérosol d'iodophores, destruction des acariens par deux traitements acaricides successifs, enduit des locaux jusqu'à 1,50 m de hauteur avec créosote et peinture. Les bergeries impossibles à nettoyer correctement sont détruites et brûlées ; les surfaces difficiles à nettoyer sont passées au lance-flammes.

- le sol autour des bâtiments est éliminé, et les alentours recouverts de terre nouvelle, de gravier ou d'asphalte.
- après deux années de vide sanitaire, repeuplement avec des ovins issus de zones indemnes de tremblante.

De 1978 à 1997, ce plan d'éradication de la tremblante a été appliqué dans 800 exploitations (145 000 ovins euthanasiés), 500 d'entre elles ayant reconstitué un troupeau ovin depuis. Parmi elles, la tremblante est réapparue dans 25 exploitations, soit dans 5% des cas. La réapparition de la maladie est intervenue le plus souvent deux à trois ans après le repeuplement du troupeau. La principale hypothèse pour expliquer la réapparition de la tremblante est le maintien de l'agent pathogène dans les exploitations, en dépit des mesures mises en œuvre. En effet, celles-ci semblent avoir été bien appliquées, y compris dans les élevages ayant connu une réapparition de tremblante.

La transmission de la mère à l'agneau recouvre plusieurs modalités biologiques (post-natale et ante-natale), difficiles à distinguer dans les études réalisées.

Le risque d'être ultérieurement atteint de tremblante est plus élevé pour les agneaux issus de brebis infectées que pour les agneaux du même troupeau mais issus de brebis non atteintes. Le rapport d'incidence varie de 1,85 à 4,80 selon les études (Hoinville 1996). Le risque attribué au statut infectieux des parents serait beaucoup plus réduit que le risque attribuable à une transmission horizontale ne mettant pas en cause la relation de parenté mère-agneau. Dans un troupeau à forte incidence de tremblante naturelle, aucune différence sur la présence de PrPres n'a été mise en évidence pour des agneaux de génotype PRNP S/S âgés de 3 mois, selon qu'ils sont issus de brebis S/S ou R/S infectées². Toutefois, l'analyse des risques pour ce même troupeau a montré que le statut infectieux de la mère change le risque pour les agneaux VRQ/VRQ et que, à génotype PRNP donné, un agneau né de mère sensible saine a un risque supérieur à un agneau né de mère résistante saine (Elsen et al. 1999).

Le risque de transmission post-natale a été évalué par le retrait des agneaux de l'environnement contaminé, à des âges différents (Tableau 2). Le risque de tremblante clinique semble s'accroître avec la durée de l'exposition dans un environnement contaminé. Toutefois dans ces études, il n'est pas possible de distinguer la transmission directe à partir de la mère, de la transmission indirecte à partir de l'environnement. En effet les observations sur le terrain sont souvent difficiles à interpréter à cause de la confusion de différents facteurs de contamination.

L'allaitement artificiel, associé à un retrait des agneaux de la mère, conduit à réduire l'incidence de tremblante par rapport à l'allaitement maternel, sans qu'il soit possible d'en préciser la raison (Elsen et al. 1999). Par ailleurs, quatre publications rapportent que le lait issu de brebis ou de chèvre atteinte de tremblante n'est pas infectieux (Tableau 2). Toutefois ces résultats ont été obtenus à partir d'un petit nombre d'ovins et de caprins, dont le génotype PRNP est inconnu. L'infectiosité était recherchée par inoculation à la souris (sauf dans l'étude de Pattison & Millson 1961), introduisant ainsi une barrière d'espèce et réduisant la sensibilité de détection.

L'existence d'une transmission verticale au sens strict (transplacentaire, ante-natale), n'est pas clairement documentée. L'infectiosité du sperme n'a pas été démontrée. L'infectiosité des ovaires et de l'utérus a été rapportée par une seule équipe (Hourrigan 1990). Toutefois la transmission *in utero* n'a pas été démontrée formellement.

Les résultats des essais de transfert embryonnaire sont discordants. Une équipe américaine a transféré des embryons prélevés sur des brebis infectées naturellement ou expérimentalement, à des brebis issues d'élevages indemnes. Sur les agneaux, aucun trouble clinique de tremblante n'a été détecté sur une période d'observation de 60 mois. Aucune accumulation de PrPres n'a été mise en évidence dans l'encéphale. Les brebis receveuses ne semblent pas avoir été contaminées (Foote et al. 1993; Wang et al. 2001). Toutefois le génotype PRNP des

² R correspond à l'allèle de résistance = ARR ; S correspond à un des allèles de sensibilité = ARQ ou VRQ

receveuses en particulier, n'a pas été précisé. Une équipe britannique, conclut à une transmission possible de la tremblante par l'embryon ovin mais ne peut exclure une contamination des agneaux à partir des brebis receveuses (Foster et al. 1992; Foster et al. 1996b) Ultérieurement, la même équipe, mais sur un modèle différent, n'a pas démontré la transmission d'une souche d'ESB aux animaux issus du transfert d'embryons de chèvres infectées à des chèvres indemnes (Foster et al. 1999).

b.3 Vecteurs de transmission

Différents vecteurs de transmission de la tremblante ont été suggérés, comme les acariens des fourrages dans les conditions naturelles (Wisniewski et al. 1996). Dans des conditions expérimentales, des larves de mouches de l'espèce *Sarcophaga carnaria*, alimentées sur des encéphales de hamsters infectés par la tremblante, semblent susceptibles de recontaminer des hamsters après ingestion (Post et al. 1999), mais la pertinence de cette étude dans les conditions naturelles est très faible.

Un vaccin destiné à protéger contre une encéphalite virale, le louping ill, préparé à partir de suspensions de cerveaux de moutons infectés par la tremblante, a été un probable vecteur de transmission en Grande Bretagne (Greig 1950).

Récemment, le rôle d'un vaccin dirigé contre *Mycoplasma agalactiae* a été mis en cause dans l'augmentation de l'incidence de la tremblante en Italie en 1997 -1998 (Caramelli et al. 2001).

b.4 Voies de pénétration

Les voies de pénétration orale, transcutanée par scarification et conjonctivale ont été décrites. La voie orale serait la voie majeure de contamination dans les conditions naturelles (Hoinville 1996).

b.5 Transmission entre élevages

Les modalités de transmission de la maladie d'une exploitation à une autre ont fait l'objet de peu d'études épidémiologiques. Les connaissances actuelles reposent essentiellement sur des études d'observation, cohérentes avec les modalités de transmission inter-individuelle mises en évidence.

Deux enquêtes cas-témoins visant à identifier les facteurs de risque pour l'introduction et de maintien de la maladie dans l'exploitation ont été publiées. L'une a été réalisée en Norvège, en 1997, dans 176 exploitations (42 Cas et 134 Témoins) (Hopp, et al., 2001) et l'autre en Irlande, dans 122 exploitations (61 Cas et 61 Témoins) (Healy, et al., 2004). La période d'exposition observée s'étendait sur dix ans dans l'étude norvégienne, sur un an dans l'étude irlandaise. Le risque d'introduction de la maladie dans l'exploitation par achat d'animaux a été mis en évidence dans l'étude norvégienne ($OR^3 = 8.5$; $IC^{490\%} [2.1 -34.6]$), mais pas dans l'étude irlandaise ($OR = 4.4$; $IC_{95\%} = [0.96; 20.5]$). Dans l'enquête norvégienne, l'usage partagé de pâturages ($OR = 5.3$; $IC_{90\%} = [1.7; 16.6]$), et le partage de béliers ($OR = 4.2$; $IC_{90\%} = [1.5; 11.2]$) se sont également avérés significativement associés à la maladie ; et parmi les facteurs susceptibles de maintenir une infectiosité dans l'exploitation, le nombre de bâtiments, le nombre de moutons en bergerie l'hiver, le fait de ne pas séparer les mâles des femelles au cours de la période d'agnelage, se sont révélés à risque. Dans l'enquête irlandaise, les facteurs susceptibles de maintenir une infectiosité dans l'exploitation étaient l'incorporation des placentas dans le fumier et la dissémination de ce dernier dans les pâturages. Dans l'étude norvégienne, l'alimentation n'apparaît pas comme étant à risque, alors que de manière surprenante dans l'étude irlandaise, l'alimentation des agneaux avec des concentrés du commerce apparaît avoir un effet « protectrice » vis-à-vis de l'introduction de la tremblante dans les élevages.

³ OR = Odd Ratio

⁴ IC = Intervalle de Confiance

Une troisième étude épidémiologique de type cas témoins, appariée sur la localisation géographique et la race des troupeaux, a été menée en France entre 1999 et 2000 dans 444 exploitations ovines (dont 94 Cas), afin d'identifier les facteurs de risque de propagation de la tremblante entre les troupeaux (Philippe, et al., 2005). L'analyse des données – utilisant un modèle « complémentaire log-log » ajusté, la taille du troupeau en « offset » – a mis en évidence un effet significatif de l'achat d'aliments lactés et composés sur l'apparition de la maladie dans un troupeau.

Plus précisément :

- l'achat d'aliments lactés – toutes firmes confondues – s'est avéré discriminer significativement les exploitations Cas des exploitations Témoins (OR = 1,9, IC95% = [1,2 ; 3,0]). En affinant cette analyse par la prise en compte de la firme de provenance, il s'est avéré que le risque associé aux aliments lactés n'est pas identique pour l'ensemble des firmes observées : le recours aux aliments lactés et composés provenant de la Firme X était significativement associé à la maladie (respectivement OR = 1,9, IC95% = [1,0 ; 3,5] et OR = 2,0, IC95% = [1,2 ; 3,3]),
- le recours aux aliments composés provenant de la Firme Y n'était pas significativement associé à la maladie, le risque associé aux autres firmes n'ayant pas pu être étudié car le recours à ces firmes n'était pas suffisamment fréquent dans l'étude.

A l'inverse, contre toute attente, aucun facteur de risque relevant d'une contamination par contacts directs ou indirects avec d'autres troupeaux n'a été mis en évidence. L'absence d'effet significatif de l'introduction de femelles sur l'apparition de la maladie pourrait être simplement due à un manque de puissance de l'étude (OR = 1.3 ; IC95% [1.0 – 1.8]).

Tableau 2. Infectiosité des sécrétions et excréments issues d'ovins et caprins infectés par l'agent de la tremblante

Excrétion/sécrétion	Origine		Détection		Résultat		Référence :
	Espèce	Phase clinique	Espèce	Voie	Nb de positif / Nb d'Ov ou Cp	Borne sup de l'InC à 95 %	
Fèces	Ov	-	Souris	IC	0/8	36,9	(Hadlow et al. 1982)
	Ov	?	Souris	IC	0/4	60,2	Hourrigan 1980
	Cp	+	Souris	IC	0/3	70,8	(Hadlow et al. 1980a)
	Cp	+	Cp	IC	0/1	97,5	(Pattison & Millson 1961)
	Cp	+	Cp	PO	0/ ?		(Pattison 1964)
Salive	Ov	+	Souris	IC	0/9	33,6	(Hadlow et al. 1982)
	Ov	?	Souris	IC	0/2	84,2	(Hourrigan 1990)
	Cp	+	Cp	IC	0/1	97,5	(Pattison & Millson 1961)
	Cp	+	Cp	PO	0/ ?		(Pattison 1964)
Urine	Ov	?	Souris	IC	0/4	60,2	(Hourrigan 1990)
	Cp	+	Souris	IC	0/3	70,8	(Hadlow et al. 1980a)
	Cp	+	Cp	IC	0/1	97,5	(Pattison & Millson 1961)
	Cp	+	Cp	IC	0/14	23,2	(Pattison & Millson 1962)
Liquide amniotique	Ov	?	Souris	IC	1/1		(Hourrigan 1990)
Colostrum Lait	Ov	-	Souris	IC	0/1	97,5	(Hadlow et al. 1982)
	Ov	?	Souris	IC	0/3	70,8	(Hourrigan 1990)
	Ov	?	Souris	IC	0/6	45,9	(Hourrigan 1990)
	Cp	+	Souris	IC	0/3	70,8	(Hadlow et al. 1980a)
	Cp	+	Cp	IC	0/1	97,5	(Pattison & Millson 1961)
Sperme	Ov	?	Souris	IC	0/21	16,1	(Hourrigan 1990)

IC : voie intracérébrale ; PO : per os ; InC : intervalle de confiance

Tableau 3. Relation entre l'incidence de la tremblante et la durée de l'exposition

Exposition	Age (mois) au retrait de l'exposition	Nombre d'animaux exposés	Incidence (en pourcentage)	Référence
Troupeau infecté	0	63	10	(Hourrigan et al. 1979)
	4	32	16	
	9	17	29	
	20	32	41	
Troupeau infecté	0	23	13	(Dickinson et al. 1965)
	pas de retrait	20	25	
Descendance de brebis naturellement infectées	0	7	29	Dickinson et al 1966
	pas de retrait	8	75	
Descendance de brebis inoculées	0	109	4	(Greig 1950)
	pas de retrait	115	15	

c) Eléments de quantification

Si les conditions d'exposition à la souche d'ESB et d'entretien ultérieur ont donc pu être réunies, l'analyse des risques correspondant pour la santé humaine nécessite d'évaluer quel pourrait être le niveau de prévalence passé, actuel et futur de l'infection des petits ruminants par cette souche.

Deux éléments de quantification sont disponibles : l'un fondé sur les données de typage de souche, l'autre sur une analyse de risque fondée sur le niveau d'exposition.

c.1) Quantification fondée sur les données de typage de souche

En France, tous les prélèvements issus de sondages réalisés à l'abattoir et à l'équarrissage en 2002 et 2003 dans la filière ovine et caprine révélés positifs au test de la tremblante, ont fait l'objet d'un typage systématique de l'ESB par quatre tests biochimiques et inoculation aux souris :

- dans la filière caprine, qui comprend 1223000 caprins dont 845000 chèvres, 27085 tests ont été réalisés en 2002. Un de ces isolats était indistinguishable de l'ESB : ceci correspond à une fréquence de 1/27085 sur l'échantillon testé, se traduisant par un nombre probable total de chèvres en France dont le stade d'incubation est suffisant pour révéler de la PrPres dans l'encéphale égal à $845000/27085 = 31$ ($IC^5 = 1-174$). En ce qui concerne les contrôles réalisés en 2003, parmi les 22835 animaux testés, aucun cas d'ESB n'a été identifié, ce qui correspond à une limite supérieure de l'intervalle de confiance de la prévalence de l'ordre de 136 animaux (risque alpha 0.05). En 2004, seuls 5631 contrôles ont été réalisés, définissant une limite haute de la prévalence de 553 animaux.

- dans la filière ovine 51198 et 63846 tests ont été réalisés respectivement en 2002 et 2003, sans mise en évidence de résultat positif, définissant une limite supérieure de la prévalence respective de 61 et 48 animaux (risque $\alpha = 0.05$).

⁵ IC = intervalle de confiance, alpha = 0.05

Deux facteurs majorant ces estimations doivent également être intégrés :

- compte tenu de la non détection des animaux hébergeant de la PrPres uniquement dans les tissus périphériques, ces estimations devraient être au moins multipliées par deux
- en raison de biais dans l'échantillonnage, une majoration maximale d'un facteur 10 devrait également être prise en compte (Morignat, et al., 2005)⁶

En Grande Bretagne, plus de 2000 isolats ont été criblés avec le Western Blot différentiel du VLA (Mike Stack) : en absence d'information concernant l'échantillonnage étudié, il ne nous est pas possible d'en tirer des conclusions statistiques.

c.2) Quantification fondée sur des travaux d'analyse de risque

Une analyse de risque a été publiée sur la fréquence et la durée d'une éventuelle présence de la souche d'ESB chez les moutons du Royaume Uni (Kao et al. 2001). Elle prend en compte les données de base sur la sensibilité génétique à la tremblante, les connaissances actuellement limitées sur la fréquence des allèles de la PrP au sein du cheptel britannique, les doses infectieuses (considérées au pire comme équivalentes à celles des bovins), l'exposition des ovins aux farines animales (à l'exclusion de toute autre source alimentaire) par rapport à celle des bovins. Dans ces conditions, en fonction des scénarios envisagés et du type de production, entre 0.0016% et 0.19% des moutons auraient été infectés en 1988, année considérée comme le pic d'exposition. Le nombre de cas cliniques d'ESB en 1990 chez les ovins aurait été compris entre 80 et 210 cas. Pour ce qui concerne les risques de pérennisation entre cette date d'exposition maximale initiale et l'année 2001, l'analyse ne retient que le mode de transmission d'origine maternelle, à l'exclusion de tout autre mode horizontal, ce qui ne prend pas en compte les connaissances accumulées en matière de tremblante (voir § 1.1.b). Le scénario prédit un nombre très faible de cas cliniques en 2001 (entre 0 et 19 cas). Par contre, en intégrant les risques de transmission horizontale, l'analyse prédit que le faible nombre de cas prévus pour l'année 2001 ne préjuge pas du nombre de cas à venir dans les dix prochaines années, et qu'un nombre initial de cas annuels limité actuellement à quelques dizaines reste compatible avec une cinquantaine de cas annuels en 2005 et cent cas annuels en 2015.

En résumé, cette analyse est compatible, pour ce qui concerne la situation britannique :

- avec l'existence passée, présente et future de l'ESB chez les ovins,
- avec une exposition passée, et à moindre niveau, présente, des consommateurs au risque ESB au travers de la filière mouton,
- avec un nombre de cas cliniques actuel faible, qui pourrait ne pas émerger du bruit de fond des cas de tremblante. Ceci conduit à ne pas considérer que, par comparaison avec l'ESB bovine, l'absence d'explosion du nombre de cas d'ESST chez les petits ruminants serait une preuve indirecte de l'absence de passage de la souche d'ESB dans ces espèces,
- avec une augmentation progressive de l'incidence au cours des prochaines années, qui incite à ne pas considérer la situation passée et actuelle comme une situation à risque supérieur à ce qu'elle pourrait devenir au cours des quinze prochaines années.

L'analyse détaillée de la transposition de cette analyse à la situation française doit prendre en compte différents aspects :

⁶ En effet, l'analyse de la mise en œuvre de ce programme a mis en évidence deux biais majeurs, l'hétérogénéité du sondage sur le plan géographique et l'utilisation de deux tests de performance inégales ; cela se traduit par un facteur de 1 à 3 selon le type de sous-population (ovins/caprins ; abattoir/équarissage) pour l'année 2002 entre les prévalences observées et les prévalences estimées après prise en compte des biais (Morignat et al, 2005) un facteur de 1 à 10 selon le type de sous-population pour l'année 2003.

- pour ce qui concerne la situation du cheptel français, à la fois le nombre et le devenir des ovins importés du Royaume Uni, et les modes alimentaires comparés des différents pays,
- pour ce qui concerne les consommateurs, à la fois les données de l'item précédent et les consommations de moutons britanniques : comme détaillé au § 8.1, 30% de la consommation ovine française provient du Royaume Uni.

Le Comité n'a cependant pas pu à ce jour conduire complètement cette analyse, dont il souligne qu'elle demande des investigations spécifiques, les données n'étant pas complètement disponibles. La différence d'exposition des petits ruminants entre la France et le Royaume Uni est néanmoins très probable. Ainsi dans l'hypothèse de la présence de la souche ESB chez les petits ruminants, le niveau de consommation de produits d'origine britannique, par rapport aux produits d'origine française, pourrait en faire la source la plus importante d'exposition des consommateurs français.

c.3) conclusion sur la fréquence d'une souche indistinguishable de l'ESB chez les petits ruminants.

Ainsi, en se fondant sur les travaux issus du sondage réalisé en France en 2002 et 2003, la prévalence du nombre de caprins infectés par une souche indistinguishable de l'ESB pourrait être de l'ordre de plusieurs dizaines d'animaux. L'absence d'identification d'un tel isolat chez les ovins reste compatible avec une prévalence maximale du même ordre.

1.2 la tremblante

Le Comité considère qu'aucune donnée nouvelle ne permet de suspecter une transmissibilité à l'homme de la tremblante « classique » à un niveau détectable dans les conditions d'exposition naturelle, comprenant la voie alimentaire.

2- ANALYSE DES BASES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES, DES INTERETS ET LIMITES DES MESURES ACTUELLES DE PROTECTION DU CONSOMMATEUR EN CAS DE PRESENCE DE L'ESB CHEZ LES PETITS RUMINANTS

Les avis scientifiques relatifs aux petits ruminants émis par le CIM⁷ puis le CES⁸ visent à donner les bases scientifiques d'une politique permettant de limiter l'exposition des consommateurs à des niveaux élevés de contamination par des agents des ESST provenant des petits ruminants, mais ne permettent pas de garantir l'absence d'un niveau résiduel d'exposition. Ces avis ont été justifiés par l'éventualité d'une ESB chez les petits ruminants, tout en notifiant que ces mesures seraient insuffisantes si tel était le cas. Ces propositions ont été fondées sur les connaissances et outils disponibles au moment de leur rédaction. Les lignes suivantes décrivent les points positifs et les points faibles du dispositif actuel, en se fondant sur l'approche suivante, que le Comité continuera à retenir pour l'analyse de risque du § 2.1 :

- Les tissus dans lesquels une infectiosité ou l'accumulation de PrPres ont été constatés par des méthodes conventionnelles (inoculation à la souris, immunohistochimie, western-blot, ELISA) sont considérés comme des tissus à risque potentiel pour l'homme. Bien qu'il soit en principe possible, au sein de ceux-ci, de définir des tissus à risque plus ou moins élevé en fonction du titre infectieux, le Comité considère qu'il ne lui est pas possible de retenir une démarche conduisant, par une quantification peu précise en raison de la méconnaissance de nombreux paramètres, à rendre acceptable la consommation de certains de ces tissus.
- Les tissus dans lesquels l'accumulation de PrPres aurait été constatée par certaines méthodes analytiques dotées d'une sensibilité analytique très élevée pourrait conduire à

⁷ Avis du Comité Interministériel sur les ESST du 2 février 2001

⁸ Avis du Comité d'Experts Spécialisés sur les ESST du 1er Novembre 2001

la détection de doses sans signification au plan biologique feront l'objet d'une analyse au cas par cas. Dans l'avenir, l'utilisation de techniques comme l'électrophorèse capillaire (Schmerr et al. 1999) ou la technique PMCA (cyclic amplification of protein misfolding) (Saborio et al. 2001, Soto et al 2005) pourrait ainsi conduire à des résultats nécessitant une analyse spécifique.

- Les tissus dans lesquels aucune accumulation de PrPres ou aucune infectiosité n'a été détectée doivent être analysés au regard de la sensibilité analytique des méthodes mises en jeu et du nombre d'animaux impliqués dans les expérimentations par rapport à la variabilité biologique de l'essai. Ainsi, le Comité continuera de différencier les tissus dans lesquels i) il y a convergence entre les modèles de physiopathologie et les données expérimentales négatives de détection de l'infectiosité et de la PrPres, tissus pouvant être considérés comme sans risque identifiable ii) les tissus dans lesquels il y a discordance entre ces deux types de données : dans cette hypothèse, en cas de données expérimentales de sensibilité limitée, le Comité continuera à privilégier, à titre de précaution, dans ses recommandations, les extrapolations qu'il est possible de dériver de la physiopathologie de ces maladies, dans la logique des recommandations précédentes en matière de thymus et d'intestins chez les bovins⁹.

⁹ Avis du CIM ESST du 30 Juin 1999

2.1 Intérêt et limites du retrait des MRS pour assurer la salubrité des carcasses dans l'hypothèse de la présence de l'ESB chez les petits ruminants

Le tableau suivant indique les MRS définies actuellement en France et, à titre comparatif, celles définies au Royaume Uni.

Tableau 4 : Tissus considérés comme MRS en France et au Royaume Uni (données AFSSA)

	liste des MRS ovins en France AM 17 mars 1992 modifié par l'arrêté du 7 avril 2004	modes de traitement (AM 30 décembre 1991)	recommandation (non appliquée) de l'Afssa	MRS Europe Règlement 999-2001 (pays de catégorie 3 et 4)
tous les animaux	Iléon des ovins et caprins quel que soit leur âge ;	Incinération	intestins (avis du 14/02/01)	Iléon des ovins et caprins quel que soit leur âge ;
	Tête entière, comprenant les yeux et les amygdales mais à l'exclusion de l'encéphale, de la langue et des masséters des ovins et caprins âgés de moins de 6 mois ;			Le crâne, y compris la cervelle et les yeux et les amygdales des ovins et caprins âgés de plus de 12 mois ou ayant une incisive définitive percée;
	Tête entière, comprenant l'encéphale, les yeux et les amygdales, mais à l'exclusion de la langue et des masséters, des ovins et caprins âgés de 6 mois et plus ;			
	Rate des ovins et caprins quel que soit leur âge ;			Rate des ovins et caprins quel que soit l'âge
	Moelle épinière des ovins et caprins de plus de 12kg;			Moelle épinière d'ovins et caprins âgés de plus de 12 mois ou ayant une incisive définitive percée

Les données disponibles sur la distribution de l'infectiosité ou de la PrPres dans les organes périphériques de moutons (ARQ/ARQ) infectés expérimentalement par voie orale par l'agent de l'ESB indiquent une distribution aussi large et aussi précoce que dans la tremblante (Foster et al. 2001a; Foster et al. 2001b), Bellworthy et al 2005).

Pour mémoire, chez les moutons et les chèvres atteints de tremblante au stade clinique de la maladie, les titres infectieux mis en évidence par inoculation intracérébrale à la souris sont de l'ordre de¹⁰ :

- 5,1 à 6,5 logs DI¹¹ ou DL₅₀¹² voie intracérébrale souris/g pour l'encéphale et la moelle épinière

¹⁰ compilation SEAC 1994

¹¹ Doses infectieuses

- 4,2 à 4,8 logs DI ou DL₅₀ voie intracérébrale souris/g pour les amygdales, la rate, les ganglions lymphatiques, le colon proximal
- 2,2 à 3 logs DI ou DL₅₀ voie intracérébrale souris/g pour le thymus, le côlon distal, le nerf sciatique
- indétectables (< 1 à 2 logs DI ou DL₅₀ voie intracérébrale souris/g) pour la moelle osseuse, le poumon, le foie, le muscle strié, le sérum, le caillot sanguin.

Pour ce qui concerne les moutons expérimentalement infectés par l'ESB les données disponibles, rappelées dans un avis du Comité¹³, ne suggèrent pas de dissémination plus limitée dans l'organisme. Au contraire, les données disponibles sur la période d'incubation des souris inoculées avec le cerveau ou la rate de moutons ARQ/ARQ infectés expérimentalement avec 5 g de cerveau ESB bovin suggèrent des niveaux d'infectiosité semblables dans les deux types d'organes (de l'ordre de 5,1 logs/g, Bellworthy et al, 2005), au contraire de ce qui est observé dans la tremblante du mouton où l'infectiosité du système réticulo-histiocytaire est généralement inférieure de 10 à 100 fois à celle de l'encéphale.

Par ailleurs, l'analyse expérimentale de la physiopathologie de l'infection par voie alimentaire dans un modèle murin (Maignien, 1999) montre une propagation de l'agent infectieux des formations lymphoïdes associées au tube digestif (Plaques de Peyer, ganglions mésentériques) vers la rate et les autres ganglions lymphatiques. Ceci implique une phase de circulation précoce de l'agent infectieux par voie sanguine dans l'ensemble de l'organisme. Enfin, la présence de PrPres a été montrée dans le système nerveux périphérique (système nerveux entérique, voies sensitives et motrices du nerf vague et du système orthosympathique) chez le hamster infecté par la souche 263 K (McBride 2001).

Ainsi le Comité considère que le retrait des MRS tels que définis par la réglementation actuelle, qui prend en compte pour certains tissus des limites d'âge :

- retire du marché certains des organes où le titre infectieux est le plus élevé : encéphale, moelle épinière, yeux, amygdales,
- laisse autorisé pour la consommation :
 - des organes ou tissus dont l'infectiosité peut être élevée (colonne vertébrale en raison de la présence résiduelle de la dure mère, de fragments de moelle épinière, des ganglions rachidiens) ou moyenne (intestins, placenta, utérus, ganglions lymphatiques, système nerveux entérique). Par exemple, concernant les *formations lymphoïdes*, une étude préliminaire a été conduite portant uniquement sur des échantillons de gigots d'agneau (G. Bénard, communication personnelle) : Le gigot d'agneau moyen pèse 2.3kg (n=10) quand il est présenté "raccourci". Dans cet ensemble n'est visible que le nœud lymphatique poplité. Le nœud ischiatique reste en effet associé avec la selle de gigot et le nœud lymphatique subiliaque est enlevé au parage. Aucun autre élément lymphoïde ou nerveux n'est identifiable macroscopiquement sans dissection fine, qui n'a pas été conduite. Le nœud lymphatique poplité a un poids moyen de 1.9 g (n=10, écart-type = 0.6) avec des extrêmes variant de 0.9 à 2.6 g. Considérant une infectiosité d'environ 10^{4.5} DI ic souris/g, un facteur de conversion d'environ 10⁴ DI ic souris/DI voie orale primate, un ganglion de 1,9 g pourrait contenir 6 doses infectieuses par voie orale chez l'homme.
 - des organes ou tissus ou morceaux de découpe pour lesquels la présence de faibles quantités de PrPres a été récemment démontrée, comme les nerfs et les muscles :

¹² Doses léthales 50%

¹³ avis du 1^{er} novembre 2001 portant sur la police sanitaire dans les cheptels atteints

Nerfs

Une accumulation de PrPres anormale a été mise en évidence dans les nerfs périphériques d'ovins en incubation ou en phase clinique de la maladie (Groschup et al 1996). La protéine anormale semble associée principalement aux cellules de Schwann. Dans un modèle d'infection naturelle par la tremblante, les concentrations en PrPres sont proches de celles observées dans les échantillons de tissus musculaires positifs. Toutefois, la fréquence des échantillons positifs, notamment en phase préclinique de la maladie (après envahissement du névraxe – troisième tiers de la phase d'incubation) est plus élevée que pour les échantillons musculaires.

Muscles

Des travaux réalisés sur des modèles de tremblante souris (Bosque et al 2000) ou hamster (Thomzig et al 2003), ont mis en évidence de la protéine prion anormale dans le tissu musculaire. La PrPres a été détectée par immunohistochimie dans des myocytes de hamsters inoculés par voie périphérique (Thomzig et al 2004). Des observations similaires ont été réalisées chez des patients atteints par la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Glatzel M et al. 2003).

Chez des ovins de génotype ARQ /VRQ ou VRQ/VRQ, naturellement infectés ou inoculés avec un isolat de tremblante naturelle, de la PrPres a été mise en évidence dans des structures spécialisées, les fuseaux neuromusculaires. Cette accumulation a pu être observée plusieurs mois avant l'apparition des signes cliniques. Dans le même temps, aucune accumulation de PrPres n'a été mise en évidence chez des ovins de génotype ARR/ARR et inoculés par voie orale (Andréoletti et al 2004).

Dans le modèle utilisé, les quantités de PrPres détectées dans les échantillons de tissu musculaire positifs étaient, pour une masse équivalente de tissu, 5000 fois inférieures à celles détectées dans l'encéphale ou les nœuds lymphatiques d'ovins en phase clinique de la maladie.

L'inoculation par voie intra-cérébrale à des souris Tg338 transgéniques pour l'allèle VRQ du gène PRP ovin, de certains des échantillons musculaires biochimiquement positifs (notamment ceux des animaux exposés naturellement et en phase clinique ou préclinique) a permis la transmission de la maladie (données préliminaires non publiées). Aucune donnée sur le titre infectieux de ces échantillons n'est cependant disponible à ce jour.

Des travaux sont actuellement en cours afin de déterminer si les observations réalisées dans cette étude, et qui correspondent à un isolat particulier de tremblante, peuvent être étendues à l'ESB chez les petits ruminants.

Cependant, le risque additionnel que représenterait pour l'homme la consommation de tissus musculaires provenant d'ovins infectés apparaît négligeable au regard des forts niveaux d'infectiosité présents dans d'autres tissus (formations lymphoïdes, nerfs) consommés en même temps que les muscles.

Le cas du sang est traité plus spécifiquement dans l'analyse de la question connexe de l'infectiosité potentielle des produits laitiers.

Le Comité considère donc que chez un petit ruminant qui serait atteint par l'agent de l'ESB, le retrait des MRS tels que défini par la réglementation actuelle, même complété du retrait des vertèbres et des intestins, voire des viscères thoraciques et abdominaux, laisserait subsister sur le marché des denrées dont l'absence d'infectiosité pour l'homme ne pourrait être garantie. En conséquence le Comité ne peut suggérer aucun système de sécurisation centré sur le seul

retrait de MRS, approche qui ne serait pas de nature à offrir le même niveau de garantie que chez les bovins.

2.2 Evaluation de la sécurité des produits laitiers en cas de présence de l'ESB chez les petits ruminants

En raison de l'infectiosité beaucoup plus importante des formations lymphoïdes dans les ESST des petits ruminants (tremblante et ESB) que dans l'ESB bovine (§ 2.1), il est apparu souhaitable d'élargir l'analyse du risque chez les petits ruminants aux produits laitiers. Ce chapitre aborde donc différents éléments d'analyse de ce risque, depuis les données expérimentales, actuellement très limitées, jusqu'aux extrapolations qu'il est possible de dériver des données connues de physiopathologie dans différents modèles impliquant également largement les tissus lymphoïdes.

a) Données épidémiologiques et expérimentales

Les expériences de transmission orale ou intracérébrale à la souris à partir de lait provenant de bovins atteints d'ESB (Taylor et al. 1995 ; Middleton & Barlow 1993) ou de petits ruminants atteints de tremblante (Hourrigan et al 1990)(Hadlow et al. 1980b)(Pattison & Millson 1961) ont donné des résultats négatifs. Ces expérimentations doivent être analysées au regard du volume d'échantillon inoculable par voie intracérébrale (20µl), qui limite le seuil de détection à un niveau de l'ordre de 10 à 100 DI par voie intracérébrale chez la souris/ mL.

Mise à part l'unique description de la présence d'infectiosité dans le colostrum d'une femme japonaise atteinte de MCJ sporadique (Tamai et al. 1992), l'infectiosité du lait chez un individu/animal atteint ou en incubation d'ESST n'a jamais été rapportée. Au contraire, aucun cas de transmission par le lait n'a été rapporté, en particulier chez des enfants papous allaités par des femmes en phase clinique de kuru, et qui n'avaient pas eux-mêmes participé à un festin contaminant.

Enfin les données relatives à la transmission par le lait dans les conditions naturelles de tremblante ne peuvent pas être analysées isolément d'autres facteurs de contamination (voir § 1.1.b.2)

b) Analyse de risque

En raison de la faiblesse des données expérimentales et de l'implication large des tissus lymphoïdes dans les ESST des petits ruminants, le Comité a souhaité évaluer l'impact qu'aurait une faible infectiosité du sang sur la salubrité des produits laitiers.

Cette analyse correspond à une situation où :

i) l'ESB serait présente dans certains cheptels laitiers : le scénario n'inclut pas d'hypothèses sur le nombre de cheptels atteints et ne considère que le cas de produits dérivés de ces éventuels cheptels atteints d'ESB,

ii) le sang est infectieux chez des petits ruminants atteints d'ESB : ce scénario prend en compte deux hypothèses de niveau d'infectiosité possible, l'une correspondant à une valeur maximale dérivée de modèles de rongeurs (scénario maximaliste¹⁴), l'autre correspondant à une valeur minimale très faible dérivée des rares informations disponibles en matière d'ESB ovine expérimentale.

Les résultats correspondants doivent donc être lus comme résultant de l'application de ces hypothèses. Les différents paramètres pris en compte ont donc été les suivants :

¹⁴ Les valeurs maximales d'infectiosité définies dans ce scénario sont également celles qui ont été retenues pour l'analyse du risque du v-CJD concernant les médicaments dérivés du sang (Analyse du risque de transmission de la nouvelle variante de la maladie de Creutzfeldt Jakob par le sang et ses dérivés, AFSSAPS, 7 décembre 2000 et son actualisation en 2004)

b1 Infectiosité du sang

Une infectiosité du sang a été mise en évidence dans les modèles expérimentaux ovins, (Houston et al. 2000), primates (microcèbe) (Bons et al. 2002), ou murins de l'ESB (Cervenakova et al. 2003). Le sang est infectieux avec le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) : un receveur transfusé avec du sang d'un donneur en stade pré-clinique de vMCJ a développé une vMCJ 6 ans et demi après la transfusion (Llewelyn et al. 2004) ; un second cas de vMCJ pré-clinique a été observé après transfusion sanguine (Peden et al. 2004).

Dans le sang, des titres infectieux maximaux de 100DI voie intracérébrale souris /mL (buffy coat) et 20 DI voie intracérébrale souris /mL (plasma) ont été rapportés dans un modèle murin de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (Brown et al. 1999) . Dans un modèle murin de vMCJ, les titres infectieux maximaux du buffy coat et du plasma étaient respectivement de 35 DI voie intracérébrale souris / mL et de 30 DI voie intracérébrale souris / mL (Cervenakova et al 2003).

Dans l'expérience de Hunter et al (2002) chez le mouton, deux receveurs sur 24 transfusés ont développé une ESB. La durée d'incubation était d'environ 600 jours, ce qui est très similaire à celle des moutons ayant reçu par voie intraveineuse 0,2g d'homogénat bovin infectieux. A la date du présent rapport, plusieurs autres moutons receveurs auraient développé une ESB, conduisant à un taux de transmission de l'ESB par voie sanguine supérieur à 20 %. Aucun autre article concernant ces travaux n'a été publié depuis 2002. Néanmoins l'ensemble des données publiées suggère une infectiosité non négligeable du sang dans le modèle ovin de l'ESB. Le niveau d'infectiosité du sang dans ce modèle expérimental reste inconnu à ce jour (titrage en cours chez la souris de l'inoculum des animaux inoculés par voie intraveineuse). La durée d'incubation chez les ovins receveurs atteints, par comparaison à celle d'animaux ayant reçu des doses connues de matériel infectieux, suggère une infectiosité maximale de 10 DI voie intracérébrale souris pour 400 mL de sang soit $10^{-1.6}$ (0,025) DI voie intracérébrale souris/mL¹⁵.

b2 Infectiosité potentielle du lait dérivée de celle du sang

La contamination du lait pourrait avoir deux origines : des cellules susceptibles de transporter ou d'être associés à l'agent ou la fraction acellulaire.

Les fractions non cellulaires quantitativement importantes du lait sont l'eau, le lactose, des lipides, des matières azotées (caséines et matières azotées du lactosérum) et des matières minérales. Hormis les matières azotées solubles d'origine partiellement sanguine, et une part des minéraux et de l'eau, les autres constituants sont synthétisés dans la mamelle. La plupart des protéines du plasma sanguin sont retrouvées à de faibles concentrations dans le lait. La sérum albumine du lait est identique à celle du sang. Le passage du plasminogène du sang au lait a clairement été mis en évidence. Le plasminogène sanguin est un ligand de la PrPres. Dans le lait de vache, le plasminogène est principalement associé aux micelles de caséine (environ 80 % du plasminogène total) et à un moindre degré dans les fractions du lactosérum et des membranes de globules gras (Politis et al 1992). En l'absence de données quantifiées sur les flux plasmatiques du compartiment sanguin vers le compartiment mammaire, le risque d'infectiosité du lait a été évalué sur l'hypothèse d'une infectiosité liée aux cellules, en ne tenant pas compte de l'infectiosité du plasma.

Les cellules présentes dans le lait peuvent théoriquement provenir de 2 sources :

- de la **glande mammaire** : voir b3

- du **sang**, les cellules sanguines passant dans le lait de façon fortuite et/ou physiologique. Les cellules lymphoïdes potentiellement vectrices d'infectiosité, soit parce qu'elles multiplient l'agent, soit parce qu'elles en assurent le transport, sont les monocytes/macrophages (revue dans (Mabbott & Bruce 2001)(Manuelidis et al. 2000), les cellules dendritiques (Huang et al. 2001) (Aucouturier et al. 2001) et, peut-être, les lymphocytes B (Shlomchik et al. 2001)

¹⁵ Cette valeur résulte d'informations additionnelles non publiées fournies au groupe ad-hoc TSE du CSD.

(Montrasio et al. 2001). Aucune certitude sur la nature de la ou des populations cellulaires vectrices de l'agent n'est acquise à ce jour.

Les cellules du lait de brebis, issu de mamelles saines, sont pour 2 à 3 % des cellules épithéliales, pour 45 à 85 % des macrophages, pour 10 à 35 % des polynucléaires neutrophiles et pour 10 à 17 % des lymphocytes (Bergonier et al 2003). Les polynucléaires neutrophiles représentent jusqu'à 60 à 75 % des cellules retrouvées dans des laits sains (Haenlein 2002). Concernant les lymphocytes, des expérimentations chez la brebis (Harp et al 1987) et chez la vache (Harp et al 1988) suggèrent des modalités de recirculation lymphocytaire différentes par rapport aux non-ruminants : une proportion majoritaire des lymphocytes mammaires auraient pour origine les tissus lymphoïdes périphériques et non ceux annexés aux muqueuses. Le phénotype des sous populations lymphocytaires et monocytaires du lait sain des petits ruminants a été peu étudié (Guiguen et al 1996)(Persson-Waller et Colditz 1998). Les informations disponibles sont résumées dans le tableau 4. La présence de lymphocytes T dans le lait a été récemment confirmée (Sabbaj et al 2002).

Tableau 4 : Sous populations lymphocytaires du lait de chèvre et de brebis (en % des lymphocytes)¹⁶

	chèvre		brebis	
	lait	sang	lait	sang
Lympho B	4	22	8	21
Lympho T CD4	17	36	7	43
Lympho T CD8	61	28	51	25
Lympho T $\gamma\delta$	4	11	3	4

Le passage des cellules sanguines vers le lait est modulé par des conditions physiologiques ou pathologiques, comme décrit chez les brebis Churra allaitantes de 7 troupeaux espagnols du programme ANCHE (Gonzalo et al 2002). Ainsi, le nombre de ces cellules est susceptible d'augmenter dans des situations pathologiques locales (mammite, traumatisme...) qui sont certainement les plus fréquentes. Différents facteurs infectieux et non infectieux sont susceptibles d'accroître les concentrations en cellules somatiques du lait.

Les facteurs infectieux correspondent essentiellement aux mammites, qui sont caractérisées par une diminution des concentrations des substances synthétisées et un accroissement des substances filtrées d'origine sanguine. Chez les petits ruminants, les concentrations en leucocytes et en lymphocytes du lait ont surtout été étudiées lors de mammite aiguë, sur une très courte période post inoculation (Winter et Colditz 2002) (Persson Waller et al 1999). Ainsi, chez des brebis, lors de mammites expérimentales à *E. coli* ou *S. aureus* en période sèche, les proportions de lymphocytes tombent à moins de 10% des leucocytes, 24 h après infection (Persson Waller et al 1999). Lors de mammite aiguë les concentrations peuvent atteindre des valeurs de l'ordre de 10^7 cellules somatiques par mL (Winter et Colditz 2002) (Persson Waller et al 1999). Cet accroissement est dû à un afflux massif de cellules d'origine sanguine, avec une très forte proportion de polynucléaires neutrophiles (Bergonier et al 2003) (Leitner et al 2004a et b). Lors de mammites chroniques, les concentrations en lymphocytes du lait sont mal connues. Les infections bactériennes ou mycosiques de la mamelle sont caractérisées par un accroissement marqué des concentrations en cellules somatiques (plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions de cellules), avec des variations liées à la nature du pathogène et à la gravité de la mammite, et à la durée d'évolution.

¹⁶ Données dérivées de 6 chèvres Saanen entre 24 et 40 j de lactation (Guiguen et al 1996) et 19 brebis mérinos entre 5 et 8 semaines de lactation (Persson Waller et Colditz 1998)

Les infections par les lentivirus sont communes chez les petits ruminants. Chez la brebis, le virus Visna Maedi ne semble pas avoir d'influence nette sur les concentrations cellulaires du lait (Legrottaglie et al 1999). Chez la chèvre, l'infection par le virus de l'Arthrite Encéphalite Caprine est associée à une augmentation modérée des cellules somatiques, en particulier macrophagiques (Lerondelle et al 1995) (Sanchez et al 2001).

Des facteurs non infectieux peuvent moduler les moyennes de variation géométrique des cellules somatiques du lait (effet troupeau × campagne, stade de lactation, variations circadiennes, numéro de lactation, fractions de la traite...), qui, chez la brebis, peuvent être estimés entre 60 000 et 120 000 cellules / mL (Bergonier et al 2003) (Paape et al 2001) (Haenlein 2002).

Quantification

Sur ces bases, deux scénarios ont donc été construits avec les valeurs extrêmes suivantes,

Scénario Infectiosité maximale : 10^2 DI voie intracérébrale souris /mL

Scénario Infectivité minimale : $10^{-1.6}$ DI voie intracérébrale souris /mL

Ce scénario maximal est ainsi fondé sur des données issues d'un modèle expérimental qui ne représente pas nécessairement la situation possible chez le mouton ou la chèvre.

Il a été considéré que le ratio des leucocytes du lait sur leucocytes du sang représentait une valeur approximative du ratio d'infectiosité du lait par rapport au sang :

Scénario maximal : leucocytes/mL sang 10^7 leucocytes/mL de lait : 10^7

Scénario minimal : leucocytes/mL sang 10^7 leucocytes/mL de lait : 10^5

L'infectiosité du lait peut alors être estimée dans ce scénario maximal à équivalente de celle du sang (100 DI ic souris/mL) et, dans le scénario minimal, à très inférieure à celle-ci ($10^{-3.6}$ (0,00025)DI ic souris/mL).

Ce calcul montre que la plus large part de cette gamme d'infectiosité théorique serait indétectable par les techniques d'inoculation à la souris, ce qui est compatible avec les données expérimentales.

Exposition des consommateurs (paramètres connus avec une marge d'incertitude intégrée dans les calculs)

L'exposition des consommateurs au lait serait liée quasi-exclusivement à la consommation de fromages. Différents paramètres ou hypothèses ont été utilisés :

la traduction de DI par voie intracérébrale souris par voie rapport à la orale chez les primates : 10^4 DI voie ic souris / 1 DI voie orale primate

la quantité de lait nécessaire à la fabrication de 100 g de fromage (de 250 à 1300 mL)

la prévalence des animaux atteints (de 1% à 10%), pour prendre en compte la dilution du lait des animaux atteints au sein du mélange des laits de récolte,

Dans ces conditions de calcul les résultats sont les suivants, pour ce qui concerne les fromages issus du lait d'une exploitation atteinte :

Tableau 5 : Analyse théorique de l'exposition des consommateurs à la consommation de fromages issus d'une exploitation atteinte par l'ESB

	scénario maximaliste	scénario minimaliste
Calcul de l'infectiosité potentielle en équivalent-doses infectieuses par voie intracérébrale/homme pour 100 g de fromage issus d'un cheptel atteint		
leucocytes par ml de sang (log) (A)	7	7
leucocytes par ml de lait (log) (B)	7	5
Ratio leucocytes lait/sang (log) (C=B-A)	0	-2
infectiosité dans le sang (log/ml DI ic souris) (D)	2	-1,6
infectiosité dans le lait (log/ml DI ic souris) (E=D+C)	2	-3,6
Log taux d'animaux infectés parmi ceux en lactation (F)	-1	-2
infectiosité dans le lait de tank (log/ml DI ic souris) G=E+F	1	-5,6
quantité de lait pour 100 g de fromage (ml)	1300	250
quantité de lait pour 100 g de fromage (log ml) (H)	3,11	2,40
log DI ic souris pour 100g de fromage (I=G+H)	4,11	-3,20
DI ic souris pour 100g de fromage (J=10 ^I)	13000	0.0006
ratio DI voie orale primate/ic souris (K)	10000	10000
doses infectieuses par voie orale pour l'homme associées à 100 g de fromage (O=10 ^N)	1,3	6 10 ⁻⁸

Le Comité attire l'attention sur le fait que ces calculs n'ont pas la valeur d'une publication scientifique et doivent donc être considérés comme des hypothèses de travail, en l'absence d'analyse de risque publiée. L'exposition globale de la population n'a pas été estimée car les données pour le calcul ne sont pas disponibles. Néanmoins, en restreignant l'analyse au cas éventuel d'exploitations atteintes d'ESB, le calcul montre donc que les prévisions d'exposition au travers des produits laitiers, dans des hypothèses « haute » et « basse » de l'infectiosité du sang, varieraient de quasi-certaine à proches de zéro. Bien évidemment, en l'absence d'infectiosité du sang, ce risque tendrait également vers zéro. Le Comité attire l'attention sur le fait que des doses théoriques résiduelles inférieures à 1 ne signifient pas une absence d'infection possible. En effet, le mécanisme de production du fromage n'implique aucune partition effective : ainsi, compte tenu des caractéristiques d'agrégabilité de l'agent, et du fait qu'il reste possible qu'une dose égale à 1 ne soit pas « divisible », une dose théorique de 10^{-x} peut signifier qu'une dose potentiellement contaminante pourrait être présente pour chaque part de 100 g de fromage tous les 10^x parts. Ce type d'analyse devrait être complété par un travail de recherche spécifique prenant en compte des variables additionnelles comme l'origine et la circulation des cellules lymphoïdes entre le compartiment sanguin et les tissus périphériques chez les ruminants.

b3 Infectiosité potentielle du lait dérivée de celle de la mamelle

Si les cellules du lait de brebis, issu de mamelles saines, sont pour 2 à 3 % des cellules épithéliales, la situation est très différente chez la chèvre : la sécrétion apocrine du lait dans cette espèce conduit à retrouver des fragments de cellules épithéliales, parfois nucléés, en grand nombre. Les dénombrements cellulaires semblent plus sensibles aux facteurs de variation non infectieux (stade de lactation, oestrus, alimentation...).

Le lait contient des concentrations de PrPc 100 fois supérieures à celles du sang. Il existe donc un substrat potentiel pour une accumulation locale d'infectiosité. Récemment (Heikenwalder et al, 2005), il a été démontré que des lésions inflammatoires sont capables d'augmenter de façon très importante la quantité de PrPres et d'infectiosité dans un organe habituellement non cible du prion, concept qui pourrait s'appliquer au tissu mammaire dans une situation de mammites. En conséquence, l'accumulation d'infectiosité localement au niveau de la mamelle ne peut pas être exclue sur la base des données de physiopathologie disponible, mais n'est pas quantifiable. Elle n'a donc pas été incluse dans l'analyse, mais est susceptible de majorer l'analyse de risque conduite au b2.

b4 conclusion sur l'infectiosité potentielle du lait

A la suite de cette analyse, il apparaît donc une très forte marge d'incertitude sur l'infectiosité potentielle des produits laitiers issus de cheptels atteints. Ainsi, dans l'hypothèse où l'ESB existerait dans des troupeaux, il apparaît que le Comité, dans l'état actuel des données disponibles, ne pourrait ni confirmer, ni exclure, une participation à l'exposition humaine liée aux produits laitiers dérivés de ces troupeaux. En conséquence le Comité anticipe que, dans l'hypothèse où des garanties scientifiques de salubrité de ces produits laitiers lui seraient demandées, il ne pourrait pas assimiler la sécurité des produits laitiers de petits ruminants à celle des bovins.

2.3. Evaluation de la capacité du dispositif actuel à identifier des cheptels indemnes d'ESST

Le dispositif actuel est fondé sur deux approches :

- la déclaration obligatoire des suspicions de tremblante. Une évaluation de l'exhaustivité des cas recensés a été conduite et démontre une sous notification importante des cas. Cette sous notification est également connue dans d'autres pays. Les données disponibles sont résumées au § 4.1. Par nature, comme l'a montré l'expérience de l'ESB chez les bovins, un réseau uniquement fondé sur des critères de maladie cliniquement exprimée n'est pas capable de permettre une exhaustivité du recensement, en particulier en raison du caractère frustrant des symptômes en début d'évolution clinique. Par ailleurs, à mesure que des sondages étaient mis en place dans ces filières (à partir de 2002), la notification des cas cliniques est devenue quasi nulle,
- des opérations de sondage effectués à partir de 2002, et de manière variable suivant les années, sur environ 5 à 10 % des animaux abattus ou envoyés à l'équarrissage : ces sondages ne sont donc pas assimilables à une surveillance active exhaustive (au sens utilisé pour l'ESB bovine).

Compte tenu de ces deux points, le dispositif actuel ne peut identifier qu'une faible fraction des troupeaux infectés, et, a contrario, ne permet pas d'identifier des cheptels indemnes. Le point 4 de cet avis identifie les conditions dans lesquelles des troupeaux pourraient offrir des garanties satisfaisantes, permettant de les considérer à risque marginal d'être atteints par une ESST. Ces conditions nécessitent par nature des délais longs (plusieurs années) avant qu'un résultat fiable ne soit acquis, et ne sont donc pas immédiatement opérationnelles, s'il devait s'avérer souhaitable de recourir à cette approche.

Ainsi, le Comité ne peut pas, dans l'état actuel des outils disponibles, suggérer de méthode rapidement opérationnelle permettant d'identifier de manière fiable des cheptels indemnes, à partir desquels des denrées alimentaires sans risque identifiable pourraient être issues et des échanges d'animaux opérés.

3.1- Performances des tests rapides de détection de la PrPres chez les petits ruminants

En 2002, lors de la mise en place du sondage chez les petits ruminants, la Commission Européenne a considéré que les tests rapides formellement validés pour le diagnostic post-mortem de l'ESB chez les bovins pouvaient être utilisés pour le diagnostic post-mortem des ESST chez les petits ruminants. Dans un premier temps, cela a concerné le test de western-blot développé par la société Prionics (Prionics check western-blot) et deux tests de type ELISA commercialisés par les sociétés Enfer et Bio-rad (tests Platelia et TeSeE). Dans un deuxième temps deux autres tests, validés à leur tour pour le diagnostic de l'ESB chez les bovins, ont pu à leur tour être utilisés. Il s'agit d'un test ELISA de Prionics (Prionics check LIA) et du test développé par la société InPro (CDI). En France, les tests de Prionics, le test Bio-rad et le test Enfer, ont été utilisés depuis cette période. La Commission Européenne effectue actuellement une évaluation portant spécifiquement sur la détection de PrPres dans les tissus de petits ruminants sur des échantillons de cerveau (tronc cérébral) ou dans des tissus lymphoïdes (rate, ganglions lymphatiques mésentériques). Les résultats de cette étude devraient être publiés très prochainement mais ne sont pas disponibles au moment où ces lignes sont écrites. Il est fort probable, cependant, que cette évaluation conduira à la validation de plusieurs tests au moins aussi efficaces pour le diagnostic post-mortem des ESST chez les petits ruminants que ceux utilisés actuellement. Par ailleurs, certains des tests en cours d'évaluation ont donné lieu à des publications dans des revues à comité de lecture démontrant leur efficacité. C'est le cas, notamment d'un nouveau test ELISA développé par la société Bio-Rad (TeSeE sheep/goat) qui est fondé sur une procédure très similaire à celle utilisée dans les tests Platelia et TeSeE mais utilise un couple d'anticorps monoclonaux spécifiquement adapté à la détection de la PrP des petits ruminants. Le fabricant annonce, pour ce test, un gain en sensibilité analytique d'un facteur 5 à 10. Ce test a permis, par exemple, de détecter de très faibles niveaux de PrPres dans des muscles de moutons infectés naturellement par la tremblante (Andréoletti et al. 2004). Dans trois autres articles, le prototype du test (développé au CEA/Saclay) a été utilisé pour détecter la PrPres dans des tissus nerveux centraux ou des tissus lymphoïdes périphériques d'ovins infectés expérimentalement par l'ESB (Lezmi et al. J Gen Virol, 2004,) ou chez des ovins infectés naturellement (Madec et al., 2004 ; Ronzon et al., 2004). Enfin le test TeSeE sheep/goat démontre une sensibilité analytique supérieure à celle du test TeSeE ou du western-blot Prionics aussi bien sur des échantillons de moelle épinière que sur des tissus lymphoïdes périphériques (plaques de Peyer, noeuds lymphatiques, amygdales et rate)¹⁷.

Le programme de sondage mené en Europe depuis 2002 a permis de tester plus de 900.000 petits ruminants (au 30/06/04, 815.000 moutons et 110.000 chèvres) et de détecter près de 1000 cas d'ESST (940 moutons et 57 chèvres) répartis à peu près équitablement entre les abattoirs (512 cas) et les équarissages (485 cas)¹⁸. Tous ces tests ont été réalisés sur un échantillon de tronc cérébral essentiellement avec le western-blot de Prionics et les tests ELISA de Bio-rad (Platelia et TeSeE). Malgré les imperfections de ce programme de sondage, il a permis d'évaluer l'ordre de grandeur de la prévalence des ESST chez les petits ruminants. Pour la France, par exemple, et pour l'année 2003 la prévalence brute est 1⁰/₀₀ pour les ovins à l'abattoir et de 1.77⁰/₀₀ pour les ovins à l'équarissage (respectivement 0,27⁰/₀₀ et 0,51⁰/₀₀ pour les caprins¹⁹).

A notre connaissance, aucun des tests utilisés à l'heure actuelle n'a été formellement validé pour le diagnostic des ESST chez la chèvre et l'étude européenne en cours n'inclut pas non plus d'échantillons de tissus caprins. Il y a tout lieu de penser cependant que les tests validés pour le mouton donnent des résultats satisfaisant sur des tissus de chèvre. D'abord, en raison

¹⁷ Avis de l'AFSSA concernant le dépistage rapide des ESST chez les petits ruminants, 19 mai 2003

¹⁸ site de la DG SANCO, http://europa.eu.int/comm/food/food/biosafety/bse/index_en.htm

¹⁹ rapport de l'AFSSA du 23/12/2004

de la grande similitude de séquence existant entre les PrP des deux espèces il est fort probable que la plupart des anticorps utilisés dans les tests soient capables de reconnaître aussi la PrP de chèvre. Ceci est ensuite clairement démontré sur le terrain puisque plusieurs dizaines de cas d'ESST ont été enregistrés depuis 2002 dans différents pays européens.

En conclusion, on peut globalement estimer que les tests utilisés aujourd'hui constituent déjà des outils analytiques efficaces. Il est très probable que l'évaluation européenne en cours va confirmer cette conclusion, identifier d'autres tests ayant des performances équivalentes ou supérieures et démontrer, en plus, la capacité de ces tests à détecter de façon beaucoup plus précoce les animaux atteints en ciblant des organes périphériques lymphoïdes (rate, nœud lymphatiques mésentériques). Cependant, les tests rapides, tels qu'ils sont utilisés actuellement ne permettent pas d'apporter une garantie absolue pour le consommateur puisqu'ils ne portent que sur une faible fraction des animaux abattus pour la consommation. D'autre part, le fait de ne réaliser les tests que sur des tissus nerveux centraux (tronc cérébral) ne permet pas d'identifier les animaux à un stade d'incubation où le niveau d'accumulation de la PrPres, et donc d'infectiosité, est proche de celui qui sera ultérieurement observé dans le SNC en fin d'incubation.

3.2- Identification de souches d'ESST atypiques ou discordantes

Au cours des dernières années, de nombreux cas d'ESST présentant des caractéristiques atypiques ont été enregistrés.

Il s'agit d'abord d'animaux infectés par la "souche" Nor-98 dont les premiers cas ont été notifiés en Norvège en 1998 (voir saisine 2002-SA-0302). Cette forme de tremblante affecte des animaux généralement âgés, en absence de signes cliniques (bien que les premiers cas aient été détectés par la surveillance passive) sans que d'autres cas soient identifiés dans le troupeau affecté. Les cas de Nor-98 sont aussi caractérisés par l'absence de lésions spongiformes dans le tronc cérébral qui contient des quantités plus faibles d'une PrPres particulièrement sensible au traitement par la protéinase K. Pour cette raison, ces cas ne sont pas identifiés par certains tests rapides utilisés aujourd'hui. Les profils électrophorétiques sont caractérisés par la présence d'une bande basse de 12-14 kDa. La détection immunohistochimique est difficile à réaliser sur l'obex, les plus fortes concentrations de PrPres tant observées dans le cervelet et le cortex. Sur les quelques cas cliniques pour lesquels les tissus lymphoïdes périphériques ont pu être analysés, il n'a pas été possible de mettre en évidence de PrPres. L'analyse génétique des cas norvégiens indique une forte association entre les cas de Nor-98 et soit l'allèle AHQ, soit la mutation L141 pour les animaux porteurs de l'allèle ARQ (Moum et al, 2005). Des cas de Nor-98 ont été déclarés dans plusieurs autres pays (Suède, Belgique, Portugal) et il est maintenant acquis que des animaux de génotype ARR/ARR peuvent être infectés par cette souche.

Parallèlement, depuis la mise en place de sondages chez des petits ruminants (2002) de nombreux pays (Grande Bretagne, France, Allemagne, Pays Bas, Portugal, Irlande, Belgique) ont identifié des cas atypiques (aussi appelés discordants) caractérisés par un résultat positif avec le test ELISA de la société Biorad et négatif avec d'autres tests rapides, avec des difficultés de confirmation en immunohistochimie²⁰. Dans certains pays (Grande Bretagne, Allemagne) ces cas discordants représentent près de 50% des cas d'ESST identifiés. L'analyse génétique partielle réalisée en France et en Grande Bretagne montre que cette forme de tremblante affecte de façon assez uniforme l'ensemble des génotypes rencontrés chez les moutons y compris les animaux ARR/ARR (plus de 30 cas recensés en Europe à ce jour). Un nombre croissant de données s'est récemment accumulé montrant qu'une partie de ces cas discordants présentent un phénotype Nor-98. Ceci apparaît notamment lors de la transmission expérimentale de ces discordants à des souris tg338 et Tga 20 (INRA Jouy, ENVAIfort, données non publiées), y compris pour des animaux de génotype ARR/ARR. A ce jour, nous ne savons

²⁰ Avis du Comité d'Experts Spécialisé sur la mise en évidence de résultats positifs aux tests de dépistage de la tremblante chez des ovins de génotype ARR/ARR (1^{er} juin 2004)

pas si tous les discordants peuvent être rattachés à des cas Nor-98 ou si ce groupe contient aussi d'autres phénotypes.

En tout état de cause, les isolats atypiques (Nor-98 ou discordants) ont un phénotype clairement distinct de la souche ESB. En raison de la sensibilité accrue que présente la PrPres associée à ces cas atypiques, de la présence de plus faibles quantités de PrPres dans le tronc cérébral (obex) et de l'absence possible de PrPres dans les tissus périphériques (si cette donnée est confirmée pour l'ensemble des cas atypiques), le diagnostic de ces formes atypiques est plus difficile. Le fait qu'un seul cas soit généralement observé par troupeau et l'absence de PrPres (et donc potentiellement d'infectiosité) en périphérie semble cependant indiquer que cette forme d'ESST est peu transmissible. Il n'est pas exclu, d'autre part qu'il s'agisse de formes génétiques de la tremblante. L'existence de ces cas atypiques qui affectent aussi les génotypes de mouton réputés résistants (notamment les ARR/ARR) ne remet pas en cause l'intérêt des plans de sélection génétique fondés sur une sélection de l'allèle ARR, puisque les génotypes concernés n'apparaissent pas plus sensibles à ces formes atypiques. Cependant, il apparaît maintenant clairement que ces plans ne permettront pas d'éradiquer la tremblante dans les cheptels ovins.

3.3- Evaluation de la possibilité de tester des échantillons groupés

Un des principaux obstacles à la mise en œuvre de tests systématiques chez les petits ruminants est le coût des tests actuels (évalué à 64 Euros par animal testé aujourd'hui) par rapport à la valeur économique d'une carcasse (jusqu'à 50 Euros). Pour remédier à ce problème, il a été envisagé d'avoir recours à une approche fondée sur l'analyse d'échantillons groupés. Le Comité a évalué les avantages et limites de cette approche sur la base d'un des tests disponibles pris à titre d'exemple. Il en ressort les points suivants :

- le mélange des prélèvements d'encéphale est possible au prix d'une faible perte de sensibilité dans le repérage des animaux infectés; pour ce qui est des prélèvements de tissus lymphoïdes, le groupage ne semble pas possible sans perte importante d'efficacité ; une hypothèse à étudier pourrait être de grouper les prélèvements d'encéphale et de tissu lymphoïde pour chaque animal,
- le groupage devrait affecter de façon plus importante la détection des cas atypiques qui sont souvent associés à des concentrations plus faibles de PrPres,
- compte tenu de coûts incompressibles (réalisation du prélèvement, transport, et extraction avant la réalisation du test) qui représentent plus de 50% du coût total des tests, l'économie réalisée ne porte que sur une fraction des coûts totaux.

Les performances exactes varient avec chacun des tests et sont largement dépendantes de leur sensibilité analytique. Le Comité est prêt à examiner les données fournies par chaque fabricant pour préciser les limites d'emploi de chacun de ces tests.

3.4- bases génétiques de la résistance aux ESST chez les petits ruminants

La variabilité génétique de la sensibilité aux ESST des ovins est bien documentée. Des lignées ovines sélectionnées sur la durée d'incubation de la tremblante ont été mises en place en 1961 au Royaume Uni. L'étude de ces lignées a permis de montrer, dès 1968 (Dickinson *et al.* 1968), l'existence d'un déterminisme génétique mendélien (gène Sip, pour Scrapie Incubation Period avec deux allèles sA (short) et pA (prolonged)). La liaison génétique de ce gène Sip avec des marqueurs RFLP du gène de la PrP (glycoprotéine membranaire ubiquiste) a été montrée en 1989 (Hunter *et al.* 1989). L'identité de Sip et PrP a été formellement démontrée depuis par transgénèse. Trente-trois allèles du gène PrP sont connus chez le mouton, correspondant à des variations en différents codons de ce gène (Tableau 6).

Tableau 6 : Allèles du gène PrP chez le mouton (d'après Moore, communication personnelle).

Codon	Variant	Breed/country	Référence
101	Q/R	Various/Spain	Acin et al. 2004
112	M/T	Romanov/France Ile-de-France/France Suffolk/Japan Khalkh/Mongolia Yeroo/Mongolia Orkhon/Mongolia Khangai/Mongolia Khalkh/Mongolia	Lapl anche et al. 1993 Laplanche et al. 1993 Ikeda et al. 1995 Gombojav et al. 2003 Gombojav et al. 2003 Gombojav et al. 2003 Gombojav et al. 2003
116	A/P	St CroixWhite/USA	Seabury and Derr 2003
127	G/S G/V	Khalkh/Mongolia	Gombojav et al. 2003
136*	A/V*	common	
	A/T	Greece	Billinis et al. 2004
137	M/T	Sarda/Italy	
			Vaccari et al. 2001 Boss
138	S/N	Iceland	Thorgeirsdottir et al. 1999
	S/R	USA	DeSilva et al. 2003
141	L/F	Cheviot/UK Sarda/Italy Norway	Hunter et al. 1995 Vaccari et al. 2001 Moum et al (2005)
<u>143</u>	H/R		DeSilva et al. 2003
<u>151</u>	R/C	Iceland	Thorgeirsdottir et al. 1999
	R/G	Various/Spain	Acin et al. 2004
	R/H	Various/Spain	Acin et al. 2004
154*	R/H	Common	Goldmann et al. 1991
167	R/S	USA	DeSilva et al. 2003
171*	Q/R*	Common	
	Q/H*	Common	Guo et al. 2003
	Q/K	Dorper, Barbados Blackbelly, St Croix, Suffolk/USA Khalkh/Mongolia	Guo et al. 2003 Gombojav et al. 2003
172	Y/D	Various/Spain	Acin et al. 2004
175	Q/E	Various/Spain	Acin et al. 2004
<u>176</u>	K/N	Sarda/Italy Various/Spain	Vaccari et al. 2001 Acin et al. 2004
	K/D		
180	H/Y		DeSilva et al. 2003
189	Q/R	Khalkh/Mongolia Khalkh/Mongolia	Gombojav et al. 2003
	Q/L		
195	T/S	USA	DeSilva et al. 2003
196	T/S	USA	DeSilva et al. 2003 Guo et al. 2003
211	Q		Belt et al, 1996
241	S	USA	Heaton et al. 2003

La sensibilité à la tremblante naturelle, définie par les signes cliniques de cette maladie, varie selon les génotypes en PrP. Parmi les différents allèles du gène, celui qui code pour les acides

aminés Alanine (A) au codon 136, Arginine (R) aux codons 154 et 171 confère une résistance à la tremblante : cet allèle est codifié ARR. Sur la base de milliers d'observations réalisées dans tous les pays confrontés à la tremblante, les ovins dont les deux copies du gène sont de type ARR (moutons homozygotes ARR/ARR) ne montrent jamais de signes cliniques (à une exception près, *cf. infra*), alors que les hétérozygotes ARR sont très rarement cliniquement atteints (Hunter 2000). A titre d'exemple, une étude épidémiologique menée à l'échelle européenne n'a permis de détecter aucun ARR/ARR parmi 1587 cas de tremblante confirmés par histopathologie, tandis que ce génotype représentait 15,5 % de la population de 9141 témoins (rapport annuel n°3 du projet CT973305 de la commission Européenne (DGVI)) ; autre exemple, aucun ARR/ARR n'a été trouvé parmi les 2364 cas recensés au Royaume Uni par le VLA entre 1998 et 2002, alors que ce génotype représentait 27% de la population de 700 000 individus typés. Le seul cas de mouton ARR/ARR tremblant rapporté à ce jour est celui d'un Suffolk japonais (Ikeda et al. 1995). A l'opposé, l'allèle qui code pour Valine en 136, Arginine en 154 et Glutamine en 171 (allèle codifié VRQ) confère une grande sensibilité à la tremblante : dans l'étude européenne, les animaux VRQ/VRQ représentaient 13,7 % des tremblants et 0,6% des témoins.

La résistance / sensibilité d'un génotype peut varier avec la souche de prion. La plus grande sensibilité des ARQ/ARQ comparés aux VRQ/VRQ inoculés expérimentalement par les souches d'ESB et CH1641, alors que l'inverse est observé- avec la souche SSBP/1, a été démontrée il y a 10 ans par Goldmann *et al* (1994). Les ovins AHQ/AHQ, qui sont le plus souvent résistants à la tremblante naturelle (*e.g.*, Elsen *et al*, 1999), semblent au contraire parmi les plus sensibles à la souche Nor98 (Moum *et al*, 2005). Par ailleurs, dans la même étude de Moum *et al* (2005), 9 des 38 moutons affectés par cette souche Nor98 et détectés dans des élevages de production norvégiens étaient porteurs de l'allèle ARR (soit une fréquence de cet allèle de 11,8% contre 25,6% chez les témoins des mêmes élevages et 34,3% dans la population générale), sans qu'aucun d'entre eux ne soit homozygote.

La mise en évidence de symptômes chez des ovins ARR / ARR après infection par une souche particulière d'EST ne peut donc être exclue.

Comme développé au § 3.2, en France, 51 cas « atypiques » ou « discordants » ont été observés de 2002 à 2004 (parmi 160 000 tests réalisés dont 43% avec le test susceptible de les détecter). Parmi ces 51 cas, 46 ont été génotypés. 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 le western-blot Prionics ou AFSSA (3) négatifs aux tests en 2002, ainsi que (4) la moyenne UPRA relevée dans le cadre du programme de sélection de la DPEI (Palhière, communication personnelle, typages faits en 2002, avant le démarrage de la sélection et donc représentatifs de l'ensemble du cheptel français)

Tableau 7 : Distribution des allèles de la PrP chez les cas discordants, les cas non discordants et la population générale

Génotype	Discordants n= 46 (100%)	Non discordants (Positifs confirmés) n= 103 (100%)	Négatifs n= 496 (100%)	UPRA n= 98517 (100%)
VRQ/VRQ		2 (2)	2 (0)	634 (1)
ARQ/VRQ	3 (6.5)	37 (36)	25 (5)	4684 (5)
ARQ/ARQ	17(37)	59 (57)	117 (24)	26189 (27)
VRQ/AHQ		1 (1)	0 (0)	236 (0)
ARQ/AHQ	3 (6.5)	1 (1)	15 (3)	2259 (2)
AHQ/AHQ			2 (0)	149 (0)
VRQ/ARR	1 (2.2)	3 (3)	32 (7)	5118 (5)
ARQ/ARR	15 (32.6)		182 (37)	34120 (35)
AHQ/ARR	2 (4.3)		8 (2)	1969 (2)
ARR/ARR	5 (10.9)		113 (23)	23159 (23)

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 sont indifféremment susceptibles 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 50630 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 29201 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

En Allemagne, un total de 186 cas ont été détectés par les sondages au cours de la période 2002-2004 (plus de 250 000 petits ruminants observés) et confirmés soit par immunohistochimie soit par le Western-blot de l'OIE. Sur 38 des cas initialement repérés par le test ELISA Biorad avant juillet 2003, 24 n'ont pas été confirmés en Western Blot Prionics, alors que tous les cas initialement repérés en WB Prionics ont été confirmés par ELISA (Buschmann *et al*, 2004). 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. Sur l'ensemble de la période 2002-2004, 71 des 186 cas appartenaient à la classe des atypiques. Aucun des cas « classiques » analysés ne correspondait à une souche ESB (Gretzschel *et al*, 2005). 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.

L'ensemble de ces observations démontre que les cas atypiques sont fréquents (de l'ordre de 50% des cas détectés en surveillance active dans les pays rapporteurs). Les caractéristiques biochimiques des isolats de ce type indiquent que ces cas pourraient tous être du type Nor98 tel que décrit initialement par Benestad *et al* (2003) en Norvège. Les premiers essais prouvent que

ces isolats peuvent être infectieux, y compris quand l'individu atteint est de génotype ARR/ARR, dans un modèle d'inoculation intra cérébrale aux souris transgéniques Tg338 porteuses de l'allèle ovin VRQ ou surexprimant la PrP murine (données en cours de publication). La question de la contagiosité pour leurs congénères des cas atypiques dont la présence de PrPres pourrait être limitée au CNS, reste posée.

Par ailleurs, les résultats des expériences d'inoculation par voie intracérébrale des ovins avec des isolats de tremblante ou d'ESB montrent que les animaux ARR/ARR peuvent développer une encéphalopathie spongiforme dans ces conditions extrêmes, avec une durée d'incubation très supérieure à celle qui est observée chez les animaux naturellement sensibles (la durée d'incubation est 2 à 3 fois plus longue chez les ARR).

Les inoculations *per os* ne semblent pas permettre la transmission de la maladie aux animaux résistants : dans l'expérience de Jeffrey *et al* (2001) les moutons ARR/ARR et ARR/ARQ (25 moutons par génotype) ne montraient aucun signe clinique ESST ni n'accumulaient de PrPres en quantités détectables 24 mois après inoculation alors que leurs témoins ARQ/ARQ présentaient des dépôts de PrPres dès 4 mois dans les tissus lymphoïdes intestinaux et dès 16 mois dans le système nerveux central, les signes cliniques apparaissant à l'âge de 21 mois . Les inoculations d'ESB par voie intracérébrale, qui contournent la barrière naturelle, permettent par contre l'infection des ARR/ARR comme l'a démontré l'expérience de Houston *et al* (2003) dans laquelle 3 des 19 ovins résistants inoculés étaient cliniquement atteints après 1008, 1124 et 1127 jours, et comme le confirment les observations françaises (Lantier *et al*, communication personnelle) sur un lot de 10 moutons Poll Dorset.

Enfin, le portage asymptomatique d'une souche d'ESST, par des ovins génétiquement résistants, est très rare dans les conditions naturelles et n'a pour l'instant été détecté que dans le cerveau des quelques cas « discordants » évoqués plus haut. En particulier, lors d'exposition naturelle à la tremblante, la recherche de PrPres est négative sur tous les tissus des ovins ARR/ARR de tous âges, et en particulier sur des ovins plus âgés que ce qui est observé habituellement en troupeaux commerciaux.

En conclusion, même s'il n'est pas démontré à ce stade que les ovins de génotype résistant ARR/ARR puissent développer spontanément des ESST cliniques, ni qu'ils soient contagieux quand atteints par une forme atypique de tremblante (Nor98), l'accumulation d'informations issues de sources variées montrant que certaines souches de tremblante peuvent contaminer ce génotype invite à la plus grande prudence quant à la sélection en aveugle de l'allèle ARR. Ainsi, sans remettre en cause le bien fondé de cette sélection pour protéger les populations ovines contre la plupart des EST, et notamment de l'ESB, ces données incitent à poursuivre l'effort de surveillance systématique des EST ovines : génotypage de tous les cas cliniques, surveillance active avec typage des isolats.

4- L'EPIDEMIOLOGIE DES ESST CHEZ LES PETITS RUMINANTS OUVRE LA POSSIBILITE DE MESURES BASEES A TERME SUR L'IDENTIFICATION DE CHEPTELS DE STATUT CONNU COMME SOURCE DE DENREES ALIMENTAIRES

4.1- Epidémiologie descriptive des ESST chez les petits ruminants comme base d'échantillonnage

De 1996 à fin 2001, le seul système de surveillance épidémiologique de la tremblante des petits ruminants consistait en un réseau de surveillance clinique de la population des animaux adultes. Deux études réalisées à l'étranger amènent quelques indications sur le pourcentage de cheptels atteints. Une étude publiée en 1993 a été conduite aux Pays Bas (Schreuder *et al*. 1993) pour estimer la prévalence de la maladie, sous la forme d'une enquête postale auprès de 700 éleveurs ovins (265 questionnaires retournés) et d'interviews auprès de 137 éleveurs. Dans ces deux échantillons, 6% des éleveurs environ avaient indiqué avoir déjà observé par le passé des cas de tremblante dans leur troupeau. Au Royaume-Uni (Hoinville *et al*. 2000), une enquête postale effectuée en 1999 auprès de plus de 6000 éleveurs ovins, sous couvert de l'anonymat, a montré que 5,3% des éleveurs estimaient avoir eu des cas de tremblante dans leur troupeau dans les six années écoulées, et 2,4% dans l'année écoulée, ces chiffres étant huit fois

supérieurs au nombre de cas déclarés aux autorités. Malgré les précautions prises dans ces études pour définir ce qu'est la tremblante, il est probable que l'opinion des éleveurs sur ce qu'ils considèrent ou non comme des cas de tremblante n'est ni très spécifique (certains troubles ne sont peut-être pas de la tremblante), ni très sensible (certains cas de tremblante peuvent ne pas avoir été repérés par les éleveurs, notamment dans les formes sporadiques de la maladie). Néanmoins, en l'absence d'informations plus précises, il paraissait opportun de se baser sur ces études pour donner une fourchette estimée de prévalence de la tremblante en France. En faisant l'hypothèse maximaliste défavorable que le taux de sous-identification / sous déclaration des cas était de 90 %, par transposition à la France des données précédemment rappelées concernant le Royaume-Uni, un ordre de grandeur du pourcentage de cheptels atteints pouvait être estimé en 2001 de l'ordre de 3% pour les ovins. Toutefois, compte tenu de l'existence possible de cas sporadiques de maladie difficilement identifiables dans les troupeaux et donc non intégrés dans les résultats des études britannique et néerlandaise, le pourcentage de troupeaux ovins atteints pourrait être supérieur à cette estimation sans qu'il soit possible d'estimer dans quelle proportion. Chez les caprins, en l'absence de données sur le taux de sous-identification ou sous-déclaration, la proportion de cheptels atteints est encore plus difficilement estimable.

A partir de 2002, la mise en œuvre d'un programme de surveillance active a entraîné, à l'instar de ce qui a été observé pour l'ESB, un désaffection pour la déclaration de cas au réseau de surveillance clinique. Alors que 48 élevages ovins incidents avaient été repérés en moyenne chaque année par le réseau de surveillance clinique entre 1996 et fin 2001, 25, 17 et 0 élevages ovins incidents ont été repérés respectivement en 2002, 2003 et 2004 (données au 1^{er} octobre 2004) par le réseau de surveillance clinique.

A partir de 2002, des programmes de surveillance active par sondage ont été mis en œuvre à l'initiative de l'Union Européenne. Un tel programme a été mis en œuvre en France chaque année depuis 2002 (Morignat, et al., 2004; Morignat, et al., 2005; Morignat, et al., 2003;). L'objectif premier de ce programme de surveillance active est de fournir une estimation de la prévalence de la tremblante chez les petits ruminants au plan national, à partir d'un sondage dans les populations de petits ruminants de plus d'un an à l'équarrissage d'une part, à l'abattoir d'autre part. Il faut noter que ce programme fournit une estimation de la prévalence dans ces différentes sous populations et espèces « au niveau animal ». Compte tenu d'une part de la faible proportion supposée des élevages de petits ruminants atteints de tremblante, d'autre part de la faible prévalence d'animaux détectables par les tests dans les élevages atteints, la probabilité de détecter un élevage atteint par ce type de programme est faible. Une étude de modélisation menée en Norvège a montré que dans le meilleur des cas, le programme mis en œuvre, qui suivait les directives européennes, n'était capable d'identifier que 9 % des élevages atteints (Hopp, et al., 2003). Ce modèle n'a pas à ce jour été appliqué aux données et paramètres français, mais on peut faire l'hypothèse réaliste que le programme de surveillance active n'est en mesure d'identifier qu'une faible proportion des élevages atteints en France.

Au sein des troupeaux atteints, le taux d'incidence annuelle de la maladie clinique est extrêmement variable, de l'ordre de 1% dans les formes sporadiques à plus de 10% dans les formes enzootiques. Dans ce contexte, et dans une optique de santé publique, le plan d'échantillonnage dans les troupeaux d'un programme de surveillance de la tremblante destiné à dépister les exploitations atteintes devrait être basé sur un taux d'incidence annuel très faible d'animaux détectables, de l'ordre de 1%, de manière à s'assurer de détecter les formes sporadiques de tremblante. Divers facteurs interviennent vraisemblablement pour expliquer le taux d'atteinte des troupeaux, au nombre desquels le degré de résistance génétique à la tremblante du troupeau, et les facteurs de diffusion de l'agent pathogène présents dans l'exploitation. Aussi, le plan d'échantillonnage pourrait-il dépendre dans l'absolu du degré de résistance génétique à la maladie au sein du troupeau.

4.2- Applicabilité des tests rapides à la qualification de cheptels

Compte tenu des performances démontrées par les tests rapides pour le diagnostic des ESST chez les petits ruminants et de l'arrivée attendue de tests encore plus performants, le Comité considère donc que les bases techniques existent pour identifier à une échelle de temps de

quelques années les cheptels offrant des garanties satisfaisantes d'absence d'ESST. Dans son avis précédent, le comité avait déjà considéré que des tests réalisés sur des échantillons de système nerveux central auraient une utilité certaine. Les données acquises au cours des dernières années ont montré que, de plus, il était parfaitement envisageable d'effectuer des tests en situation ante-mortem sur des prélèvements d'amygdale (Olivier Andréoletti, résultats non publiés), ce qui ne peut que renforcer la qualité de la qualification. Le Comité est prêt à analyser des dispositions détaillées permettant de qualifier de tels élevages.

4.3- Identification des cheptels soumis à police sanitaire

Le Comité rappelle²¹ que la mise en place d'un dispositif de police sanitaire renforcé dans les cheptels identifiés comme atteints de tremblante sur un plan symptomatologique et sur une base déclarative conduisait à un risque de sous-déclaration, proportionnel aux contraintes s'exerçant sur les élevages. Pour cette raison, le Comité estime que l'impact favorable de la mise en place des mesures de police sanitaire dans les élevages en matière de santé animale, et, le cas échéant, de santé publique, est tributaire d'un dépistage systématique des troupeaux atteints au travers de la mise en place de tests rapides sur un échantillon d'animaux appropriés de ces troupeaux. Les conditions d'échantillonnage permettant de qualifier des cheptels sont également applicables à l'identification des cheptels infectés.

4.4- Une connaissance du statut des cheptels sources permettrait l'allègement éventuel de la liste des MRS

Les risques qu'un petit ruminant soit atteint d'une forme classique d'ESST ou d'ESB est fonction de deux sources de contamination possibles :

- une contamination par voie alimentaire, pour laquelle une date d'absence probable de risque de contamination pourrait être définie en fonction des dispositions réglementaires, des contrôles de leur application, et des données issues de dépistage actif. En fonction du jeune âge auquel est abattue la très grande majorité des petits ruminants consommés, contrairement aux bovins, des données favorables pour les critères précités pourraient permettre une analyse de risque positive effective peu de temps après leur démonstration,
- une contamination horizontale ou verticale (voir § 1), pour laquelle des garanties pourraient être apportées par la connaissance du statut du cheptel d'origine.

La situation apparaît beaucoup moins bien documentée pour les formes atypiques, pour laquelle une origine génétique ne peut être exclue.

Il apparaît donc au Comité, qu'une éventuelle approche d'allègement de la liste des MRS chez les petits ruminants pourrait s'appuyer sur des garanties solides sur les troupeaux d'origine, pour ce qui concerne les risques de tremblante classique et d'ESB, et sur l'absence de mise en évidence d'infectiosité dans les tissus lymphoïdes pour les formes atypiques.

4.5- Prérequis

La qualification de troupeaux de petits ruminants indemnes d'ESST, et la mise en évidence des troupeaux atteints, rendent indispensable la mise en œuvre de l'identification individuelle des animaux, la traçabilité des échanges entre troupeaux et la maîtrise des échappements possibles de petits ruminants au dispositif de surveillance (par enfouissement de cadavres par exemple). En première analyse, et sous réserve d'une prise en compte de cas spécifiques, ces mesures impliquent de pouvoir contrôler strictement les échanges d'animaux entre troupeaux, et en particulier d'interdire toute sortie d'animaux de troupeaux atteints vers d'autres troupeaux, et

²¹ Avis du Comité d'Experts Spécialisé sur les ESST du 1^{er} novembre 01 sur le projet d'arrêté du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche modifiant l'arrêté du 28 mars 1997 fixant les mesures de police sanitaire relatives à la tremblante ovine et caprine

toute entrée d'animaux provenant de troupeaux non qualifiés et a fortiori de troupeaux atteints dans des troupeaux qualifiés ou en cours de qualification.

5- LA VALIDATION D'OUTILS ET LA MISE EN PLACE D'UN RESEAU DE TYPAGE DE SOUCHES PERMETTENT L'ADAPTATION DES MESURES DANS LES CHEPTELS ATTEINTS IDENTIFIES AU POINT 4

Les difficultés quant à la définition des mesures adéquates en matière d'ESST des petits ruminants sont étroitement liées à l'incertitude sur la présence chez les ovins, et sur la fréquence chez la chèvre, de la souche d'ESB. Cette incertitude rend difficile la définition aussi bien des mesures de portée générale pour l'ensemble des populations animales concernées, que de celles correspondant spécifiquement aux cheptels dans lesquels une ESST a été diagnostiquée. Néanmoins, dans la mesure où différents outils sont actuellement disponibles, leur utilisation peut désormais être raisonnée.

5.1- Identification des outils disponibles

La caractérisation de souches d'ESST correspond à une méthodologie pour laquelle aucun standard n'est acquis. L'approche qui est actuellement la mieux établie correspond à l'inoculation de souris et la définition d'une typologie basée sur la période d'incubation et la distribution des lésions. Ainsi, différentes souches de tremblante ont été définies à partir d'isolats du terrain (Bruce 1996). Un exemple de différenciation d'une souche d'ESB ovine par rapport à une souche de tremblante après inoculation expérimentale au mouton est donné par le travail de Foster (Foster et al. 1996a). Dans cet exemple, des souris RIII, C57BL, VM, IM et C57BLxVM ont été utilisées, démontrant des différences considérables dans les temps d'incubation pour un même isolat entre les différentes lignées murines, et, de manière intéressante, au sein de certaines lignées entre cette souche ESB et cette souche de tremblante. Au plan anatomopathologique, les « profils lésionnels » entre la souche ESB et cette souche de tremblante étaient notoirement différents chez la souris RIII (alors que cette lignée démontrait des temps d'incubation proches pour les deux souches : 300-400 jours).

La lourdeur de cette approche limite néanmoins son usage à un nombre restreint d'isolats. Certains laboratoires, en particulier français, ont développé ou adapté des méthodes de typage biochimique de la PrPres qui peuvent désormais être utilisées comme un filtre initial permettant de n'engager les typages sur souris que sur un nombre limité d'isolats. Les deux grands types d'outils actuellement disponibles et leurs propriétés sont présentés ci-dessous. Leur utilisation en matière d'analyse phénotypique des souches est discutée, en particulier en ce qui concerne la mise en évidence de marqueurs d'une souche ESB chez les petits ruminants.

i) Phénotype de la PrPres in vitro

Profil électrophorétique par technique Western-Blot : la mise en évidence d'une bande non glycosylée de plus faible poids moléculaire serait indicatrice d'une souche de type ESB, associée à une différence de proportion entre les différentes formes glycosylées entre souche d'ESB et souches de tremblante. Il en est de même du critère d'absence de liaison d'anticorps reconnaissant la partie N-terminale, comme l'anticorps P4. La valeur prédictive positive de ce marqueur est faible (c'est-à-dire que des souches de tremblante classique possèdent ce marqueur, comme la souche de tremblante expérimentale ovine CH1641, (Hope et al. 1999) et la souche 0100, récemment identifiée par le réseau en France). Par contre, sa valeur prédictive négative est élevée (un résultat négatif permet d'écarter avec une forte probabilité la souche ESB, en tout cas sous l'hypothèse où les animaux seraient infectés seulement par la souche d'ESB) : en effet, à ce jour, il n'existe pas de situation connue où ce marqueur soit absent sur des isolats correspondant à des transmissions expérimentales de la souche ESB à différentes espèces, y compris lors de changements successifs d'espèces (typiquement bovin, espèce x puis souris). Nous ne disposons néanmoins pas, et ne disposerons jamais, de validation

standard de sensibilité, qui aurait correspondu à l'étude de très nombreux échantillons d'ESB expérimentale de petits ruminants, en particulier dans tous les génotypes présents sur le terrain.

Résistance de la partie N-terminale à la protéolyse : Dans des conditions contrôlées de protéolyse, la partie N-terminale de la PrPres présenterait une sensibilité accrue à la protéolyse pour les souches de type ESB comparativement aux souches de tremblante classiques, tandis que le reste de la protéine pathologique ne serait pas affectée. Les techniques de Western blot et ELISA, développées sur ce principe par le CEA en France, permettent, par le biais de deux conditions de protéolyse différentes menées en parallèle, de mettre également en évidence les souches de tremblante atypiques (ou discordantes), avec les mêmes limites que les techniques de western blot précédentes. Le test ELISA se révèle plus adapté que le Western Blot au traitement de nombreux échantillons, mais le Western Blot apporte la confirmation du profil électrophorétique.

En résumé, ces tests représentent un outil de tri efficace pour repérer des échantillons qui pourraient correspondre à des souches de type ESB.

ii) Phénotype après inoculation aux souris

La description du phénotype d'une souche en passage primaire à la souris comprend l'enregistrement de plusieurs paramètres : létalité, durée et homogénéité de l'incubation, typologie des lésions histologiques, typologie des dépôts de PrPres, profil biochimique de la PrPres après digestion à la protéinase K (PK). Chacun de ces critères, ou une combinaison d'entre eux, peut être utilisé pour décrire le phénotype d'une souche. Si l'on se focalise sur l'identification d'une souche ESB, certaines combinaisons souris/critère, apparaissent les plus pertinentes. En effet, les résultats obtenus au cours de ces dernières années, en particulier dans le réseau typage de souches en France, montrent que :

- La lignée RIII est la mieux caractérisée en ce qui concerne le profil lésionnel. Une souche d'ESB ovine expérimentale y révèle un profil particulier (Foster et al. 1996a). Néanmoins, la durée d'incubation est longue (environ 300-400 jours). C'est cependant la durée la plus courte des lignées conventionnelles, ce qui, outre l'homogénéité des lésions, justifie aussi son choix. Elle est néanmoins parfois remplacée par la lignée C57Bl6, pour des raisons techniques, pour laquelle les profils lésionnels de la souche ESB et de plusieurs isolats de tremblante sont disponibles.
- La lignée INRA transgénique ovine (VRQ) Tg3 et ses dérivées (dont la lignée Tg338) possèdent une durée d'incubation relativement courte (2 à 8 mois; Vilotte et al. 2001), qui est inférieure à la souris Tga20 (souris transgéniques qui surexpriment le gène PrP murin) pour les souches de tremblante (VRQ/VRQ, ARQ/ARQ OU VRQ/ARQ.), et plus longue (480 jours) que la Tga20, pour une souche d'ESB ovine (ARQ/ARQ). Dans certaines conditions de Western Blot, la souche ESB montre une bande non glycosylée de 20 kDa, différente des isolats classiques de tremblante (21 kDa) et de certaines souches de type CH1641 et O100 (19 kDa). Elle conserve un profil correspondant à une forme majoritaire biglycosylée.
- La lignée INRA transgénique bovine Tg540 démontre une durée d'incubation plus courte (environ 300 jours) que la Tg338 pour la souche ESB²². Ainsi, l'inoculation simultanée de Tg338 et Tg540 pourrait fournir un indice important de la présence de l'ESB sur la base des durées d'incubation comparées.
- La lignée AFSSA transgénique ovine (ARQ) Tg4 montre la présence d'abondantes "plaques florides" (Crozet et al. 2001a) pour un isolat d'ESB expérimentale ovine (ARQ/ARQ) par rapport à des isolats de tremblante naturelle, issus du réseau de surveillance français, y compris d'origine ARQ/ARQ. (Crozet et al. 2001b). Des problèmes de stabilité d'expression avec cette lignée, désormais surmontés, ont retardé la validation de ce modèle.

²² Cette propriété est partagée par certaines souches de tremblante d'un cluster particulier, par ailleurs distinguables de l'ESB en ce qui concerne les propriétés biochimiques de la PrPres

- La lignée Tga20, surexprimant le gène PrP murin, fournit une durée d'incubation de l'ordre de 330-380 j pour un isolat d'ESB ovine expérimentale, donc plus courte que chez les Tg338. Les profils lésionnels sont parfaitement lisibles, avec un profil pour la souche d'ESB ovine expérimentale distinct de celui déterminé pour quelques isolats de tremblante. Sa spécificité est en cours de précision vis-à-vis d'un plus grand nombre de cas de tremblante. Les profils en Western-blot sont comparables à ceux obtenus avec la souris Tg338.

Dans ce contexte, l'identification d'une souche ESB chez les petits ruminants reposerait sur la combinaison de critères suivants : typologie lésionnelle identique à la souche de référence (ESB ovine) sur souris RIII, C57B6 ou Tga20, durée d'incubation plus longue chez les souris Tg338 que chez les souris Tg540, et profil en WB de la PrPres indistinguishable de celui de la souche d'ESB dans les lignées correspondantes. A ce jour, ces critères ont été remplis pour un unique isolat caprin (CH636)²³.

Les outils et validations disponibles sont donc désormais suffisants pour pouvoir en quelques jours, identifier un isolat suspect d'ESB au travers de tests biochimiques, puis confirmer son identité au travers d'inoculation aux souris après une incubation de l'ordre d'un an.

Il convient de souligner que le très faible nombre d'échantillons de référence ne permet pas de déterminer la sensibilité, conditionnant la valeur prédictive négative des tests rapides. En effet, ont été analysés, pour les tests biochimiques, quelques échantillons d'ESB ovine expérimentale (cf EIL européen, génotype ARQ/ARQ), et, pour les bioessais, un seul échantillon d'ESB ovine expérimentale (génotype ARQ/ARQ). Il n'existe par conséquent aucune donnée de référence sur des échantillons d'ESB caprine expérimentale, d'ESB ovine pour des animaux de génotypes autres que ARQ/ARQ, ni pour des échantillons correspondant à des passages secondaires d'ESB chez les petits ruminants²⁴.

Ainsi, si sur le plan scientifique les critères d'exclusion d'ESB apparaissent robustes, la sensibilité des méthodes face à la diversité des isolats de terrain n'est pas évaluée.

5.2- Place des outils disponibles à court terme et perspectives

La validation de la sensibilité des tests rapides de typage, et donc de leur valeur prédictive négative, constitue une priorité. Dans cette attente, l'utilisation de ces outils pour écarter la possibilité qu'un cheptel soit atteint par la souche d'ESB serait fondée sur l'hypothèse que les caractéristiques de la souche d'ESB ne varient pas en fonction de l'espèce cible (ovin ou caprin), du génotype (pour ce qui concerne les ovins, car aucun déterminisme génétique n'est connu chez la chèvre), et des passages successifs. A ce stade, en absence de données venant formellement démontrer cette hypothèse, les tests ne peuvent être considérés comme des outils totalement fiables. Leur spécificité, et donc la valeur prédictive d'un résultat positif (au sens des critères précédents) est perfectible. Néanmoins, ils ont démontré leur capacité à jouer un rôle de filtre, et des résultats positifs enregistrés avec ces tests devraient conduire à une analyse spécifique par inoculation aux souris.

A ce titre, ils ont vocation à être engagés dans des enquêtes à large échelle de manière à écarter (avec un niveau de certitude calculable en fonction de l'échantillonnage) ou à quantifier la présence de l'ESB chez les petits ruminants, avec les limites découlant du paragraphe précédent.

En ce qui concerne leur utilisation pour adapter les mesures de police sanitaire dans un cheptel atteint par une ESST, leur possible emploi est détaillé au § 9.2.

²³ Bilan du réseau typage de souches au 15 janvier 2005

²⁴ il est néanmoins probable que les caractéristiques biologiques et biochimiques de cette souche restent stables, en référence aux données de transmission primaire et secondaires interspécifiques de la souche d'ESB, par exemple chez les primates (Lasmez et al. 2001)

6- DES CONTROLES INDIVIDUELS PEUVENT FOURNIR DES GARANTIES ADDITIONNELLES POUR CERTAINES DENREES DE PETITS RUMINANTS ISSUS DES CHEPTELS DE STATUT INCONNU

6.1- Produits laitiers

Sous l'hypothèse de la circulation d'une souche d'ESB, en fonction des éléments développés au § 2.2, le Comité ne pourrait suggérer, dans l'état actuel des connaissances, aucune stratégie garantissant la salubrité des produits laitiers en l'absence de connaissance du statut des effectifs d'origine.

6.2- Carcasses

Les données concernant la pathogénie de la tremblante naturelle montrent clairement la relation étroite entre l'accumulation de la protéine prion pathologique dans les tissus périphériques et dans le système nerveux central, associée à l'infectiosité, et le génotype du mouton. L'accumulation de cette protéine prion pathologique est détectable plus précocement chez les moutons dont le génotype est connu pour accélérer le délai d'apparition de la maladie. Elle est plus tardive chez les animaux de génotype faiblement sensible. Pour les animaux de génotype résistant (ARR/ARR aux codons 136, 154 et 171 du gène prion) qui paraissent pouvoir résister entièrement dans les conditions de vie habituelle des animaux de rente, les données actuellement disponibles n'ont pas démontré la présence de cette protéine anormale ni dans les tissus périphériques, ni dans le système nerveux central. Ainsi, l'évaluation du risque potentiel représenté par la consommation des différents tissus et organes pourrait prendre en compte le statut génétique de l'animal.

Il doit néanmoins être souligné que les données disponibles concernant les relations entre le génotype de l'animal et l'infection chez les petits ruminants avec la souche d'ESB restent actuellement très limitées, bien qu'aucune donnée publiée ne soit contraire aux connaissances générales établies dans la tremblante naturelle²⁵.

D'une façon plus générale, la question d'un éventuel portage de l'agent infectieux chez les animaux génétiquement résistants, en particulier dans les tissus périphériques, doit également être envisagée.

Les tests rapides de détection de la protéine prion anormale peuvent offrir une garantie supplémentaire, dès lors que l'utilisation de tels tests est validée chez les petits ruminants. Néanmoins, dans ces espèces, l'absence de protéine anormale en quantité détectable dans le système nerveux central ne garantit pas son absence dans les tissus périphériques, où l'accumulation est généralement plus précoce. L'utilisation de tests validés pour un diagnostic précoce et fiable dans les tissus périphériques est donc hautement souhaitable.

En résumé, le Comité considère que, sous réserve des prérequis du § 6.3, il pourrait être possible de définir, au plan scientifique, des conditions permettant de limiter les risques de contamination des carcasses par un agent des ESST. Leur degré d'efficacité sera directement fonction de la sensibilité analytique des tests appliqués aux tissus périphériques, qu'il sera possible d'évaluer plus précisément dès les résultats de validation disponibles. Néanmoins, s'agissant de mesures basées au moins en partie sur le contrôle individuel des animaux, le nombre de tests annuels à réaliser pour un même objectif de santé publique serait beaucoup plus important que pour la stratégie d'identification de cheptels qualifiés développée au chapitre 4. Par contre, cette mesure pourrait être appliquée dès lors que la réalisation des prérequis du § 6.3 serait acquise, contrairement à la mesure de qualification des cheptels qui nécessite un recul plus long. Ainsi, ces deux types de mesures peuvent apparaître comme chronologiquement complémentaires.

²⁵ Voir également : Avis du Comité d'Experts Spécialisé sur les ESST du 1^{er} novembre 01 sur le projet d'arrêté du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche modifiant l'arrêté du 28 mars 1997 fixant les mesures de police sanitaire relatives à la tremblante ovine et caprine

6.3- Prérequis

Deux facteurs sont actuellement limitants :

- la disponibilité de tests applicables aux tissus périphériques : cette limite devrait pouvoir être levée à terme proche,
- l'absence de système d'identification des animaux géré au plan national, et incluant en particulier la date de naissance.

7- LA MISE EN OEUVRE DE PLANS D'AMELIORATION GENETIQUE REPRESENTERAIT UN AXE MAJEUR, MAIS RETARDE DANS LE TEMPS, D'AMELIORATION DE LA SITUATION SANITAIRE

7.1- Principe des plans d'amélioration génétique de la résistance à la tremblante

Les connaissances actuelles permettent d'envisager d'utiliser le polymorphisme du gène PrP pour améliorer la résistance des moutons à la tremblante (et probablement également à l'ESB) ainsi que l'absence de portage des populations ovines (voir par exemple (Dawson et al. 1998)). A noter que l'utilisation de béliers ARR/ARR donnerait très rapidement une protection importante des élevages puisque les hétérozygotes ARR sont très peu sensibles à la tremblante. Le « génotypage » des animaux pour leur gène PrP peut être organisé à grande échelle. Plusieurs techniques sont disponibles pour réaliser ce génotypage (Taqman, PCR-RFLP, séquençage systématique). En Europe, trois pays ont déjà organisé ce typage à un niveau national (Royaume Uni, France et Pays Bas) et les techniques sont disponibles dans la plupart des pays.

Au Royaume Uni et au Pays Bas, l'amélioration de la résistance à la tremblante des populations ovines est basée sur l'adhésion individuelle des éleveurs sélectionneurs à des programmes de qualification de reproducteurs et de cheptel (National scrapie plan, voir <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-science/scrapie/nsp/nsp.html>, Dutch Scrapie Control Programme, voir (Smits et al. 2000)). En France, l'amélioration génétique des animaux est organisée par une loi sur l'élevage datant de 1966, et fait appel à un ensemble de structures dont les UPRA, Unités de Promotion de Races, rassemblant les éleveurs sélectionneurs, qui jouent un rôle moteur dans l'évolution génétique des races. La Commission Nationale pour l'Amélioration Génétique (CNAG) du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche organise les aides publiques pour ces actions de sélection..

Un bilan a été réalisé à la demande de l'Union Européenne sur des échantillons représentatifs de toutes les races ovines pour évaluer les fréquences des allèles du gène PRNP ("Survey of the Prion Protein genotype of sheep breeds which are native or which form a significant population in the territory (Commission Decision 2002/1003)"). Cet inventaire donne pour chaque race les éléments nécessaires pour une organisation de la sélection sur la résistance à la tremblante. Parmi les races françaises, les fréquences des allèles ARR, ARQ, VRQ et AHQ varient respectivement de 0 à 93 %, 2 à 95 %, 0 à 35 % et 0 à 36 %.

Tableau 8 :Fréquence des allèles PRNP
par race avant la sélection en faveur de l'allèle ARR

	f(ARR)	f(AHQ)	f(ARQ&ARH)	f(VRQ)
Aure et Campan	0,288	0,061	0,606	0,045
Avranchin	0,933	0,004	0,057	0,006
Barégeoise	0,300	0,050	0,650	0,000
Basco-Béarnaise	0,328	0,002	0,669	0,001
Belle Isle	0,585	0,000	0,415	0,000
Berrichon de l'Indre	0,412	0,000	0,500	0,088
Berrichon du Cher	0,735	0,082	0,147	0,036
Bizet	0,580	0,000	0,420	0,000
Blanche du Massif Central	0,254	0,010	0,660	0,076
Bleu du Maine	0,686	0,000	0,085	0,229
Boulonnaise	0,433	0,000	0,553	0,014
Castillonnaise	0,286	0,000	0,704	0,010
Caussearde des Garrigues	0,327	0,091	0,582	0,000
Causses du Lot	0,151	0,174	0,604	0,071
Charmoise	0,348	0,014	0,493	0,145
Clun-Forest	0,660	0,180	0,149	0,010
Corse	0,412	0,070	0,516	0,001
Cotentin	0,764	0,000	0,018	0,219
Dorset-Down	0,478	0,011	0,511	0,000
Est à Laine Mérinos	0,170	0,010	0,816	0,005
Finnoise	0,053	0,000	0,947	0,000
Grivette	0,414	0,000	0,570	0,016
Hampshire	0,548	0,000	0,436	0,016
Ile de France	0,773	0,000	0,092	0,135
Inra 401	0,370	0,060	0,470	0,100
Lacaune (meat breed)	0,597	0,026	0,336	0,040
Lacaune (milk breed)	0,641	0,012	0,341	0,006
Landaïse	0,217	0,004	0,630	0,149
Landes de Bretagne	0,536	0,000	0,464	0,000
Limousine	0,435	0,000	0,562	0,003
Lourdais	0,278	0,019	0,685	0,019
Manech Tête Noire	0,455	0,005	0,535	0,005
Manech Tête Rousse	0,216	0,002	0,761	0,021
Mérinos d'Arles	0,375	0,020	0,589	0,016
Mérinos de Rambouillet	0,554	0,364	0,038	0,044
Mourérous	0,252	0,019	0,715	0,014
Mouton Charollais	0,385	0,000	0,449	0,165
Mouton Vendéen	0,194	0,000	0,785	0,022
Noire du Velay	0,222	0,000	0,738	0,039
Ouessant	0,736	0,000	0,264	0,000
Préalpes du Sud	0,411	0,007	0,569	0,013
Rava	0,427	0,002	0,556	0,015
Rayole	0,390	0,000	0,610	0,000
Romanov	0,183	0,098	0,587	0,131
Rouge de l'Ouest	0,616	0,001	0,278	0,105
Rouge du Roussillon	0,342	0,061	0,587	0,010
Roussin	0,150	0,008	0,490	0,352
Solognote	0,350	0,000	0,650	0,000
Southdown	0,321	0,191	0,488	0,000
Suffolk	0,650	0,005	0,310	0,035
Tarasconnaise	0,398	0,009	0,579	0,014
Texel	0,313	0,026	0,576	0,084
Thônes et Marthod	0,142	0,009	0,849	0,000
moyenne	0,417	0,032	0,504	0,048

Quatre objectifs peuvent être considérés :

Eliminer l'allèle VRQ.

L'élimination de l'allèle VRQ devrait être systématique, car l'ensemble des observations sur la tremblante dans le monde montre qu'une fréquence élevée de cet allèle représente un facteur de risque important.

Renouveler les cheptels atteints avec des reproducteurs protégés contre la tremblante.

La constitution d'un cheptel de béliers ARR/ARR dûment identifiés au sein de chaque race pourrait devenir une nécessité si ces béliers ARR/ARR devaient être utilisés de façon exclusive dans les élevages atteints. Dans les cas d'abattage total ou partiel, il serait par ailleurs très souhaitable de repeupler les élevages avec des brebis au moins hétérozygotes ARR pour éviter les récurrences fréquemment observées.

Sélectionner l'allèle ARR dans le noyau de sélection.

L'amélioration progressive de la résistance d'une race aux ESST passe par une augmentation de la fréquence de l'allèle ARR chez les reproducteurs. L'objectif devrait être que 100% des géniteurs mâles et femelles soient ARR/ARR à une échéance pouvant varier selon les races. Il est cependant indispensable de prévoir une augmentation de la résistance aux EST qui respecte les équilibres entre caractères et notamment n'ait pas pour conséquence de diminuer le niveau génétique moyen de la race sur les caractères de production, ni de réduire sa variabilité génétique disponible.

Utiliser des béliers ARR/ARR pour la production d'agneaux de boucherie.

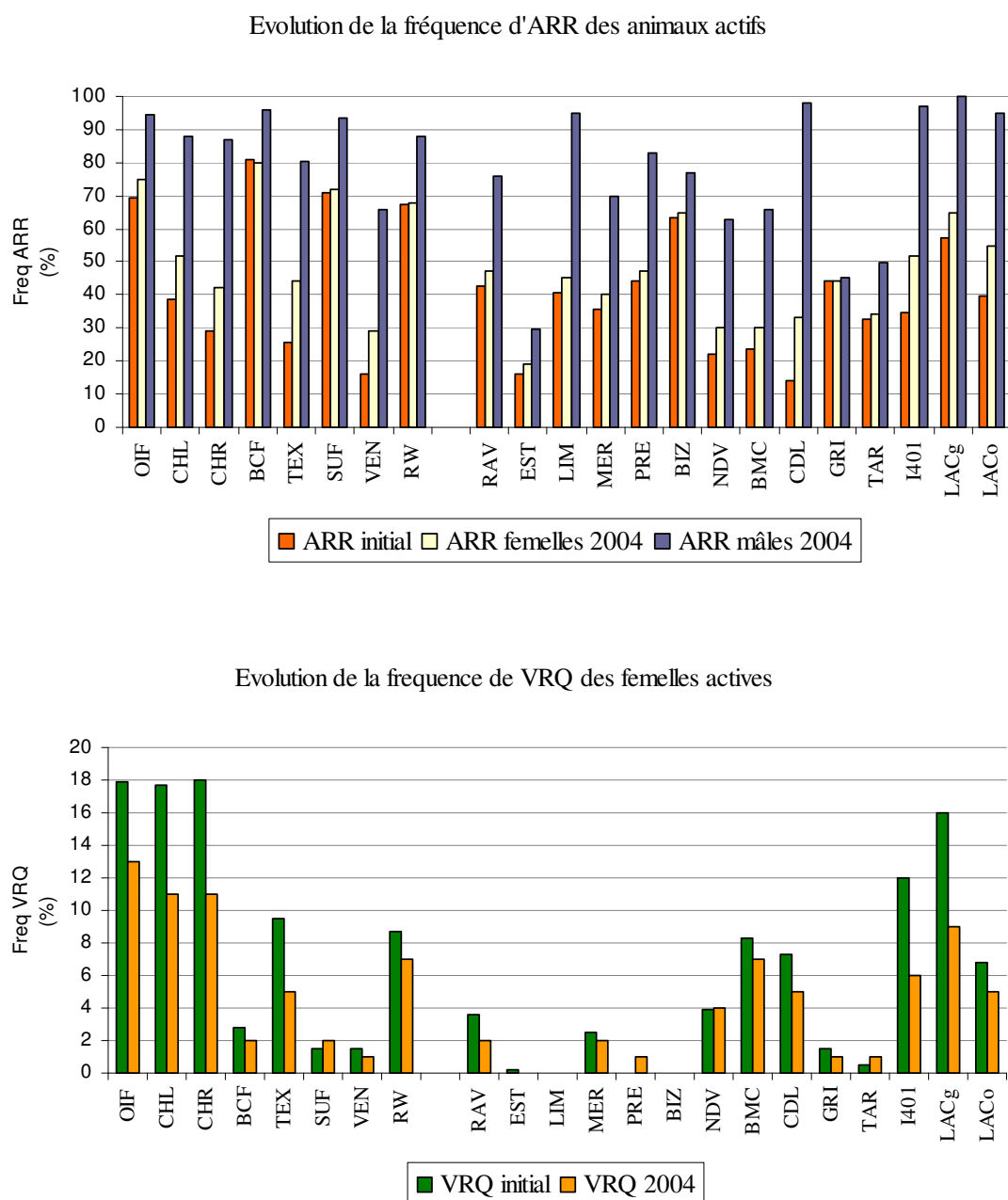
La commercialisation exclusive d'agneaux porteurs de l'allèle ARR pourrait former la base d'une politique sanitaire visant à protéger les consommateurs d'un risque potentiel de transmission d'une EST (notamment l'ESB) qu'ils subiraient en consommant de la viande ovine. Elle est envisagée dans le « Contingency Plan » proposé par le DEFRA du Royaume Uni dans l'éventualité où des cas d'ESB seraient détectés chez des ovins²⁶. La mise en œuvre la plus simple est l'utilisation exclusive de béliers ARR/ARR dans les élevages de production. Il faut pour cela les produire et les identifier en quantité importante.

7.2- Application en France

Les méthodes de génotypages moléculaires du gène PrP ont été appliquées en France en visant les objectifs cités ci-dessus dans le cadre d'un plan organisé et financé par le MAAPAR depuis 2002. S'il est encore un peu tôt pour conclure en termes de résultats mesurés par l'évolution du nombre de nouveaux foyers, l'évolution des fréquences alléliques du gène PrP (figure 1) montre que la sélection a été appliquée efficacement sur le plan strictement génétique

²⁶ Defra (2001). Contingency plan : for the emergence of naturally occurring BSE in sheep in the United Kingdom National flock. 28 septembre 2001, 50p

Figure 1 : Evolution de la frequencies des alleles ARR et VRQ



7.3. Limites scientifiques et techniques

A ce jour, il n'est pas démontré que l'ESB puisse infecter naturellement les animaux ARR/ARR. Une sélection en faveur de ce génotype est donc toujours une voie pour limiter les risques de transmission de cet agent à l'homme, via la consommation de produits ovins. Toutefois, l'observation de formes atypiques de tremblante démontre l'existence de souches d'ESST, différentes de l'ESB, présentes dans tous les génotypes PrP : ceci conforte la suggestion de typer au long terme les génotypes atteints par des cas d'ESST.

La sélection des populations permet en théorie d'améliorer de façon durable le niveau du caractère faisant l'objet de cette sélection. Ce caractère pérenne des résultats ne s'obtient qu'au prix d'une organisation sur le long terme des mesures (le génotypage du gène PrP pour l'amélioration de la résistance à la tremblante), du choix des reproducteurs et dans certains cas de leurs accouplements selon leur valeur génétique pour le caractère d'intérêt. Les principales contraintes techniques de ces opérations sont donc l'obligation d'un travail au long terme et le coût du génotypage des reproducteurs.

Enfin, l'amélioration génétique de la résistance à la tremblante n'aura pas une efficacité immédiate du fait des délais de renouvellement des cheptels. Une forte protection des agneaux de boucherie, qui seraient tous issus de père ARR/ARR, pourrait cependant être obtenue en relativement peu de temps (de l'ordre de 2 à 5 ans selon les races). En résumé, l'outil génétique ne permet pas d'apporter des solutions à effet immédiat sur le court terme, mais permet d'anticiper des solutions à d'éventuelles situations d'urgence.

8- PRODUCTION, IMPORTATION ET CONSOMMATION DE DENREES ISSUES DE PETITS RUMINANTS

Le Comité a réuni les différentes données disponibles permettant de quantifier l'exposition des consommateurs au travers des types de productions et des origines géographiques.

8.1- Production, importation et consommation de viande de petits ruminants

Ce chapitre décrit la production et l'importation de viande ovine, les données de production de viande caprine n'ayant pas pu être collectées, et les données de consommation de viande ovine et caprine²⁷.

La **production** ovine en France correspond à **131000** TEC (tonnes-équivalent carcasses) dont 83% en production d'agneaux de bergerie et 17% de brebis. Les abattages en France représentent ces 131000 TEC moins 6000 TEC qui sont exportés sur pied (vif), plus 5000 TEC en importation sur pied (vif) : au total donc 130000 TEC sont abattus en France dont 125000 TEC sont strictement d'origines françaises.

Le nombre de brebis allaitantes (production d'agneaux de bergerie) a diminué depuis 1989 (de 6.5 millions en 1989 à 4.7 millions en 2003) alors que le nombre des brebis laitières a plutôt tendance à augmenter (de 1.17 million à 1.3 million au cours de la même période).

La **consommation** totale en France est de **263000** TEC qui sont répartis comme suit :

- 115000 TEC d'origine strictement française dont 100000 TEC de viande d'agneau (le solde de 10000 TEC entre les 125000 TEC abattus et la consommation correspond aux exportations françaises de viande ovine)

- 5000 TEC correspondant aux ovins importés vivants et abattus en France

- 138000 TEC de viandes importées dont 22% de viandes congelées

- 5000 TEC de viande caprine

Les données individuelles de consommation sont les suivantes :

²⁷ source : Institut de l'Elevage, données 2003

Tableau 9 : Consommation comparée de viande de petits ruminants et de bovins en 2003

	<i>En milliers de TEC</i>		<i>En Kg/habitant</i>	
	1990	1999	1990	1999
Ovin-caprin	313	263	5.5	4.3
Boeuf-veau	1685	1664	29.7	27

Ainsi, la consommation individuelle de viande de petits ruminants correspond à environ 16% de la viande de bovin consommée.

Les données **d'importation** pour l'année 2003 sont les suivantes

Tableau 10 : Importation de viandes ovines en 2003 (données : Institut de l'Elevage)

		Viande ovine (en milliers de tonnes)			
Provenance	Ovins sur pied (en milliers de têtes)	Toutes viandes	Dont frais + réfrigéré	Dont congelé	Total équivalent carcasse (en milliers de tonnes)
Royaume-Uni	45	52,7	52,1	0,6	53,3
Irlande	2	30,2	29,8	0,4	30,2
Pays-Bas	190	1,2	1,1	0,1	2,9
Espagne	106	9,4	7	2,4	10,9
Belgique-Lux	...	3,9	3,2	0,7	3,9
Total UE	394	97,8	93,3	4,5	102,3
Nouvelle-Zélande	...	35,8	12,9	22,9	35,8
Australie	...	2,0	1,6	0,4	2,0
Total Autres pays	7	40,1	14,8	25,3	40,2
TOTAL	401	137,9	108,1	29,8	142,5

En résumé la France, en 2003, a produit **13 %** de l'offre de viande ovine de l'Union Européenne, derrière le Royaume-Uni qui en assure 30 % et l'Espagne 26 %. Mais surtout, elle dépend des approvisionnements extérieurs, puisqu'elle ne produit que 51 % de ce qu'elle consomme. En 2003, le Royaume-Uni et l'Irlande ont fourni l'équivalent de 32 % de la consommation intérieure française, et la Nouvelle Zélande 14%. Des mesures qui ne concerneraient que les ovins autochtones n'auraient donc qu'un impact limité sur l'exposition des consommateurs.

8.2 Production et consommation de fromages d'origine ovine et caprine

Les données relatives à la consommation moyenne des français ont été fournies par l'Observatoire des Consommations Alimentaires²⁸ et extraites de l'enquête INCA qui a recueilli toutes les prises alimentaires des individus pendant une semaine entière. Les données de consommation alimentaire ont été obtenues à partir de carnets de consommation, renseignés sur une période de 7 jours consécutifs par les enquêtés. L'enquête a été réalisée auprès de 3000 individus, enfants et adultes représentatifs de la population française. La représentativité

²⁸ sources : Note technique OCA/AD/2001-289 et note AFSSA Unité évaluation du risque biologique du 21/11/01

nationale de l'échantillon a été assurée par stratification (région d'habitation et taille d'agglomération) et par la méthode des quotas (âge, sexe, PCS individuelle et taille du ménage).

L'échantillon des adultes regroupe donc 1474 individus de plus de 14 ans.

Tableau 11 : Estimation de la consommation annuelle et individuelle de fromages de chèvre ou de brebis (en grammes /personne/an) (Source : enquête INCA 1999)

	Population	Effectif	Moyenne	Ecart type	P90 (90 ^{ème} percentile)	Taux d'individus consommateurs
Fromage de chèvre	Adultes	1474	1387	3078	4693	31%
	Enfants	1018	537	1603	2086	18%
Fromage de brebis	Adultes	1474	890	2497	4171	19%
	Enfants	1018	234	1320	0	7%

Ainsi, la consommation annuelle moyenne des adultes (15 ans et plus) en fromage de chèvre est d'environ 1,4 kg par an. Celle des enfants est d'environ 500 g. La consommation moyenne annuelle des adultes en fromage de brebis est de 890 g et celle des enfants de 230 g.

La consommation totale de fromage de chèvre ou de brebis représente un volume total de 2,3 kg/an pour un adulte avec 90^{ème} percentile à 8,8 kg/an sur une consommation totale annuelle de 14,3 kg de fromage/personne adulte (soit environ 16%).

9-AVIS

9.1-Contexte de l'avis

Le dispositif actuellement en place dans les populations de petits ruminants d'élevage ne permet d'évaluer que de manière très imprécise le risque de circulation d'une souche d'ESB dans ces espèces. Si les conditions nécessaires à ce passage et à son entretien ultérieur ont certainement été remplies, jusqu'à récemment, aucun élément scientifique ne permettait en revanche d'établir la réalité de ce passage, ni d'infirmer son existence. La mise en place d'études à large échelle en France à partir de 2002 a permis le typage d'isolats d'ESST collectés dans le cadre de sondages à l'abattoir et à l'équarrissage en s'appuyant sur un réseau de laboratoires de l'AFSSA, du CEA, de l'INRA et des Ecoles Vétérinaires. Ces analyses ont conduit à l'identification d'un isolat d'ESST chez une chèvre indistinguishable de l'ESB²⁹. Bien que cette information ne modifie pas profondément l'évaluation du risque conduite en 2001, elle conduit à en souligner certains aspects, tenant à sa perception et à son évaluation quantitative :

- le Comité rappelle que cette chèvre a été identifiée à l'abattoir dans le cadre d'un sondage aléatoire portant sur une fraction (13%) des animaux abattus. Ainsi, il est probable que des animaux de même statut aient été introduits dans la chaîne alimentaire. En l'absence de mesures nouvelles, l'hypothèse que d'autres petits ruminants porteurs de la souche d'ESB soient abattus pour la consommation humaine ne peut donc être écartée. Cette identification ne remet néanmoins pas en cause le fait que, dans l'état actuel des estimations disponibles, parmi les troupeaux caprins atteints d'ESST, ceux atteints d'ESB devraient représenter au plus une faible fraction (§ 1). La situation peut être comparée à celle existant chez les bovins. Compte tenu de la prévalence actuelle (54 bovins atteints en 2004), du test systématique des carcasses et du retrait des MRS très efficace dans cette espèce, le risque résiduel pour le consommateur tend vers 0. Chez les chèvres, l'estimation du nombre d'animaux atteints est au moins du même ordre de grandeur que chez les bovins (voir § 1.1 c.1), mais elles ne font pas l'objet de détection

²⁹ Courrier du réseau « typage de souches » du 12/01/2005 à la DGAL et l'AFSSA ; confirmation du Laboratoire communautaire de référence du 28/01/2005

systématique et le retrait des MRS n'offre pas les mêmes garanties d'efficacité (§ 2.1). Chez les moutons, l'absence de démonstration à ce jour de cas d'ESB et la progression de schémas de sélection génétique vers des génotypes résistants à l'ESB dans certaines races rendent plus difficile l'évaluation, qui reste néanmoins compatible avec une situation comparable à celle des chèvres. Dans le contexte actuel où la présence de l'ESB est démontrée chez les chèvres, les espèces de petit ruminants représentent donc actuellement un risque nettement supérieur à celui représenté par les bovins compte tenu des dispositions réglementaires en vigueur³⁰,

- deux hypothèses peuvent rendre compte de l'existence de cette souche chez la chèvre : i) préexistence à l'épizootie bovine pouvant donc être à l'origine des cas bovins ou ii) contamination par voie alimentaire suivant un mécanisme identique aux bovins. Les conséquences pour le gestionnaire du risque ne sont pas neutres : l'hypothèse i) conduirait à considérer le cheptel caprin comme une source potentielle d'ESB en dehors de tout contexte d'exposition alimentaire (en particulier en référence aux dates d'interdiction des farines et de sécurisation des graisses). L'hypothèse ii) renforcerait la notion que ce signal d'alerte observé lors d'un sondage aléatoire chez la chèvre serait également valide pour les ovins de génotype non résistants, qui ont été exposés de manière similaire à l'ESB, retirant ainsi tout rationnel scientifique à la restriction aux chèvres d'éventuelles modifications de mesures de gestion du risque,

- le Comité confirme l'avis de 2001, suivant lequel le dispositif actuel, reposant sur le retrait des MRS, qui mériterait d'être complété par la non mise à la consommation des intestins de petits ruminants de tout âge³¹, retire de la chaîne alimentaire la plupart des tissus les plus infectieux ; néanmoins, il n'est pas de nature à offrir, vis-à-vis des produits issus d'animaux qui seraient contaminés, une garantie absolue de maîtrise des risques d'exposition pour le consommateur pour les raisons exposées au § 2. Ces notions ont été renforcées par les données scientifiques acquises depuis 2001. L'exposition des consommateurs est donc directement liée à la fréquence actuellement inconnue de cette forme d'EST indistinguishable de l'ESB,

- une donnée nouvelle par rapport à 2001 est l'existence fréquente d'isolats atypiques, différents de l'ESB, qui ont été décrits au § 3.2 de ce rapport. L'absence d'information sur ces isolats, sur leur éventuelle variabilité, sur leur capacité de transmission intra- et interspécifique, sur les limites des plans de sélection génétique pour en maîtriser la dispersion, ainsi que le fait qu'un seul des tests de diagnostic utilisés en France les détecte représentent un enjeu nouveau.

Les outils et connaissances désormais disponibles permettent de proposer des mesures complémentaires de celles fondées sur le retrait des MRS, qui diminueraient dès maintenant l'exposition potentielle des consommateurs à une ESB des petits ruminants. Par ailleurs, ces mesures peuvent être modulées suivant différentes options de gestion des formes atypiques de tremblante.

9.2- avantages et inconvénients de différentes options

Le Comité a analysé différentes options de lutte, correspondant à trois niveaux croissants de sécurité dans la maîtrise du risque pour le consommateur et pour la santé animale. Les avantages et inconvénients de chaque niveau ont été évalués sur les deux critères de santé publique ou animale, à l'exclusion de critères de coût, d'impact socio-économique ou de conformité à la réglementation communautaire actuelle.

Si le premier niveau correspond à la situation actuelle, les autres envisagent une démarche active de maîtrise de ce risque. Par ailleurs, quel que soit le niveau retenu, les données de consommation rappelées au § 8.1 et 8.2 impliquent d'appliquer les mêmes règles pour les produits importés.

³⁰ La mise en place très récente chez les chèvres, à titre transitoire, d'un dépistage élargi au plan européen, et exhaustif en France à partir de prélèvements d'obex uniquement, est de nature à compenser partiellement cette estimation (voir § 9.2).

³¹ Avis du CIM sur les ESST du 2 février 2001; Avis du CES sur les ESST du 1 novembre 2001

a) niveau 1 : ne pas modifier le dispositif actuel

Au titre des points favorables, le dispositif actuel exclut de la consommation humaine la plupart des tissus les plus infectieux chez les petits ruminants (et devrait, dans cette logique, inclure les intestins de petits ruminants quel que soit leur âge³²).

Au titre des inconvénients, les dispositions actuelles laissent subsister de manière proportionnelle à la fréquence de la présence de l'ESB chez les petits ruminants autochtones ou importés, une exposition des consommateurs liée :

- i. à ce que la plupart des effectifs atteints d'ESST ne sont pas identifiés, compte tenu de l'absence de dépistage systématique et de politique de qualification des troupeaux qui pourrait fournir une garantie d'origine aux denrées,
- ii. à ce que le retrait des MRS laisse subsister des tissus à infectiosité démontrée.

b) niveau 2 : diminuer progressivement l'exposition des consommateurs au risque d'ESST des petits ruminants avec une attention spécifique vis-à-vis du risque ESB

Les mesures qui pourraient être retenues sont les suivantes :

- a) compléter le système national de gestion de l'identification des petits ruminants, incluant la date de naissance, et mettre en œuvre un contrôle des effectifs, maîtrisant les échappements,
- b) afficher comme objectif prioritaire l'identification des troupeaux atteints par une ESST : mettre donc en place un dépistage systématique³³ des ESST basé sur l'utilisation de tests rapides³⁴ sur les cadavres et chez les animaux de réforme, associée à un typage des isolats correspondants. Une telle mesure aurait vocation à identifier les cheptels atteints auxquels devraient s'appliquer les mesures de police sanitaire,
- c) définir des mesures de police sanitaire adaptées en fonction de la nature des souches définie par les tests rapides de discrimination³⁵:
 - c.1 destruction complète du troupeau en cas de souches de type ESB, confirmé par plus d'un test biochimique de typage selon les recommandations européennes,
 - c.2 mesures de police sanitaire comparable à l'existant en cas d'isolat classique de tremblante, c'est-à-dire variable en fonction de l'espèce chèvre ou mouton, en s'appuyant pour cette dernière espèce sur le génotype de résistance des animaux. De plus, en fonction des objectifs de santé publique et de santé animale, un allègement des mesures de polices sanitaire est envisageable. Il n'est pas apparu possible au Comité de contribuer à définir de manière plus détaillée les options disponibles, sans que soient précisés les critères de choix décrits au § 9.4,
 - c.3 mesures de police sanitaire variable en fonction du degré de précaution souhaité en matière de santé animale et humaine pour les isolats atypiques³⁶,

³² Avis du CIM sur les ESST du 2 février 2001

³³ Par test systématique, il faut comprendre la mise en place de tests intéressant la totalité des troupeaux, dans des conditions d'échantillonnage individuel des animaux conformes aux objectifs de sensibilité de détection souhaitée (c'est-à-dire non obligatoirement exhaustif). A ce titre, un ciblage initial sur les troupeaux les plus atteints est moins contraignant en terme d'échantillonnage au sein des troupeaux, et permet d'optimiser les ressources consacrées au dépistage.

³⁴ Le Comité recommande de n'utiliser que des tests dont la capacité à détecter des isolats atypiques aura été validée

³⁵ Comme précisé au chapitre 5.1, la capacité de ces tests rapides de discrimination à pouvoir écarter de manière certaine un isolat d'ESB n'est pas formellement démontrée : néanmoins, leurs possibles erreurs par défaut dans la détection d'une souche ESB sont bien évidemment plus faibles que celles résultant de l'absence de test dans la très grande majorité des troupeaux, comme c'est actuellement le cas.

- d) sur la base de ce dépistage, définir des conditions de qualification de cheptels à risque résiduel marginal d'être infecté par une ESST, et favoriser les introductions d'animaux à partir de cheptels qualifiés,
- e) favoriser l'application de plans d'amélioration génétique visant à augmenter la résistance des cheptels ovins aux souches classiques de tremblante et à l'ESB.

Les avantages de cette approche sont :

- l'application des mesures de police sanitaire à un nombre accru de troupeaux atteints d'ESST identifiés diminuerait progressivement l'exposition globale des consommateurs aux risques potentiels liés aux denrées autochtones (à l'exclusion des produits importés),
- la combinaison d'un système d'identification fiable, d'une connaissance de cheptels qualifiés à risque résiduel marginal d'être infecté par une ESST, permettrait à terme d'arriver à un niveau de protection du consommateur équivalent au niveau 3 dans des conditions beaucoup moins mobilisatrices de moyens,
- sous certaines conditions, la liste des MRS pourrait être réduite chez les animaux issus de ces troupeaux qualifiés,
- ces mesures auraient un impact direct en matière de protection de la santé animale.

Les inconvénients de cette approche sont

- une durée de quelques années avant que des troupeaux à risque résiduel marginal d'être infectés par une ESST, soient identifiés avec une fiabilité satisfaisante,
- une durée de plusieurs années avant que la poursuite des programmes d'amélioration génétique ait un impact majeur, et la nécessité de poursuivre le génotypage des animaux infectés,
- l'absence pendant cette période de garantie absolue de salubrité des produits considérés individuellement, même si, comme précisé antérieurement, l'exposition globale des consommateurs devrait diminuer progressivement.

c) niveau 3 : diminuer rapidement le niveau d'exposition du consommateur aux agents des ESST des petits ruminants

Les mesures qui peuvent être proposées sont les suivantes, et doivent être comprises comme complémentaires des précédentes :

- f) Utiliser les tests rapides validés pour tester le système nerveux central et les tissus périphériques de chaque carcasse destinée à la consommation humaine, et conditionner leur consommation à l'obtention d'un résultat négatif, puis passer progressivement d'une logique de tests individuels d'animaux à la qualification des troupeaux d'origine pour les animaux consommés (point d.)
- g) Organiser transitoirement la collecte de laits à partir de tous les troupeaux, sauf ceux connus comme atteints par une ESST, à moins que celle-ci soit identifiée comme différente de l'ESB³⁷; à la fin de cette période transitoire, n'autoriser la collecte de lait que dans les exploitations qualifiées indemnes d'ESB et, éventuellement, de formes atypiques, en fonction du degré de précaution souhaité.

³⁶ Même s'il est désormais établi que le repeuplement à base d'animaux de génotype ARR/xxx n'est pas de nature à limiter la circulation de ces isolats, il est prématuré d'en recommander l'abandon dans ces troupeaux en raison de la protection que confèrent ces génotypes aux isolats classiques de tremblante et à l'ESB.

³⁷ incluant donc pendant cette période transitoire les troupeaux de statut inconnu, actuellement très majoritaires.

- h) Adopter des mesures équivalentes pour les produits importés en provenance de pays de statut équivalent.

Par rapport à l'option 2, les avantages supplémentaires sont les suivants

- une diminution importante dès leur mise en place et au fur et à mesure de leur application, du niveau d'exposition potentielle du consommateur aux ESST des petits ruminants,
- la capacité, sous réserve de l'examen des modalités détaillées d'application, de fournir une garantie individuelle de salubrité des produits, conforme aux connaissances scientifiques actuelles.
- L'absence de nécessité absolue d'identification des animaux,

Le Comité souligne qu'il est prêt à examiner sur saisine spécifique toute demande de contribution à une définition plus précise des mesures ci-dessus, tout particulièrement concernant le point c.3.

9.3 Critères de choix et conséquences pour l'analyse scientifique

Le Comité rappelle que les mesures actuellement en place, si elles ont semblé initialement relever exclusivement d'un principe de précaution, peuvent maintenant être analysées comme des mesures de prévention : ainsi, l'identification d'un isolat indistinguishable de l'ESB chez une chèvre dans le cadre d'un sondage aléatoire à l'abattoir conforte *a posteriori* la mise en place de mesures chez les petits ruminants. Le Comité considère que le choix parmi les trois niveaux décrits, ou une combinaison d'entre eux, nécessite de prendre en compte, pour ce qui relève de l'analyse scientifique ultérieure de l'adéquation des mesures retenues, les deux critères suivants :

i) le niveau de risque qu'il est possible de retenir sur l'exposition globale des consommateurs : à ce titre, le niveau 2 vise à la satisfaction d'une diminution progressive de l'exposition globale, sans pour autant assurer une garantie individuelle de salubrité identique à celle de la filière bovine,

ii) le niveau de garantie individuelle de salubrité des produits qu'il est souhaitable de privilégier : compte tenu que l'option proposée début 2002 de mise en place d'un dispositif permettant la connaissance du statut des cheptels n'a pas été retenue, le niveau 3 apparaît désormais le seul de nature à fournir des garanties individuelles très élevées au regard de l'état des connaissances, au moins au cours des prochaines années.

Le Comité considère qu'il existe différents objectifs possibles assignables à la lutte contre les ESST des petits ruminants : en matière de santé publique, limiter l'exposition globale des consommateurs ou viser un critère de garantie individuelle de salubrité des denrées ; en matière de santé animale, viser un assainissement des troupeaux infectés et/ou une protection des troupeaux indemnes vis-à-vis des différentes formes de tremblante. Ces objectifs ne peuvent pas être définis, même implicitement, par une instance scientifique. Une précision par l'AFSSA et/ou les ministères de tutelle des objectifs mentionnés ci-dessus permettrait au Comité de conduire une analyse scientifique pertinente au regard des mesures de gestion sanitaire qui seront proposées par l'Etat chez les petits ruminants.

Fait à Maisons-Alfort le 24 mars 2005

Le Directeur général

Martin HIRSCH

10-REFERENCES

- ACIN.C, MARTIN-BURRIEL I., MONLEON E., RODELLAR C., BADIOLA J. J. AND ZARAGOZA P. (2004) PrP polymorphisms in Spanish sheep affected with natural scrapie. *Vet Rec* **155**, 370-2.
- ANDREOLETTI O., SIMON S., LACROUX C., MOREL N., TABOURET G., CHABERT A., LUGAN S., CORBIERE F., FERRE P., FOUCRAS G., LAUDE H., EYCHENNE F., GRASSI J. AND SCHELCHER F. (2004) PrPSc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med* **10**, 591-3
- ANDREOLETTI O., LACROUX C., CHABERT A., MONNEREAU L., TABOURET G., LANTIER F., BERTHON P., EYCHENNE F., LAFOND-BENESTAD S., ELSEN J. M. AND 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**, 2607-16.
- 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**, pp. 3115-3126.
- AUCOUTURIER,P., GEISSMANN,F., DAMOTTE,D., SABORIO,G.P., MEEKER,H.C., KASCSAK,R., KASCSAK,R., CARP,R.I. & WISNIEWSKI,T. (2001) Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J.Clin.Invest*, **108**, pp. 703-708.
- BELLWORTHY S. J., HAWKINS S. A., GREEN R. B., BLAMIRE I., DEXTER G., DEXTER I., LOCKEY R., JEFFREY M., RYDER S., BERTHELIN-BAKER C. AND SIMMONS M. M. (2005) Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to the onset of clinical disease after oral challenge. *Vet Rec* **156**, 197-202.
- BELT P. B., MUILEMAN I. H., SCHREUDER B. E., BOS-DE RUIJTER J., GIELKENS A. L. AND SMITS M. A. (1995) Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol* **76** (Pt 3), 509-17.
- BENCsik A., PHILIPPE S., VIAL L., CALAVAS D. AND BARON T. (2005) Automatic quantitation of vacuolar lesions in the brain of mice infected with transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol Methods* **124**, 197-202.
- BENESTAD S. L., SARRADIN P., THU B., SCHONHEIT J., TRANULIS M. A. AND BRATBERG B. (2003) Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec* **153**, 202-8.
- BERGONIER D., DE CREMOUX R., RUPP R., LAGRIFFOUL G. AND BERTHELOT X. (2003) Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res* **34**, 689-716.
- BILLINIS C., PSYCHAS V., LEONTIDES L., SPYROU V., ARGYROUDIS S., VLEMMAS I., LEONTIDES S., SKLAVIADIS T. AND PAPADOPOULOS O. (2004) Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. *J Gen Virol* **85**, 547-54.
- BONS N, LEHMANN S, MESTRE-FRANCES N, DORMONT D, BROWN P. (2002) Brain and buffy coat transmission of bovine spongiform encephalopathy to the primate *Microcebus murinus*. *Transfusion*. May;**42**(5):513-6.
- BROTHERSTON,J.G., RENWICK,C.C., STAMP,J.T., ZLOTNIK,I. & PATTISON,I.H. (1968) Spread and scrapie by contact to goats and sheep. *J.Comp Pathol.*, **78**, pp. 9-17.
- BROWN P., CERVENAKOVA L., MCSHANE L. M., BARBER P., RUBENSTEIN R. AND DROHAN W. N. (1999) Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *Transfusion* **39**, 1169-78.

- BROWN,P. & GAJDUSEK,D.C. (1991) Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet*, **337**, pp. 269-270.
- BRUCE,M. (1996) Strain typing studies of scrapie and BSE. In: *Prion diseases* Humana Press, , Totowa NJ.
- BUSCHMANN A., BIACABE A. G., ZIEGLER U., BENCSIK A., MADEC J. Y., ERHARDT G., LUHKEN G., BARON T. AND GROSCHUP M. H. (2004) Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods* **117**, 27-36.
- CALAVAS,D., DUCROT,C., BARON,T., MORIGNAT,E. , VINARD,J.L., BIACABE,A.G., MADEC,J.Y., BENCSIK,A., DEBEER,S. & ELIAZSEWICZ,M. (2001) Prevalence of BSE in western France by screening cattle at risk: preliminary results of a pilot study. *Vet.Rec.*, **149**, pp. 55-56.
- CARAMELLI,M., RU,G., CASALONE,C., BOZZETTA,E., ACUTIS,P.L., CALELLA,A. & FORLONI,G. (2001) Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against *Mycoplasma agalactiae*. *Vet.Rec.*, **148**, pp. 531-536.
- CERVENAKOVA L., YAKOVLEVA O., MCKENZIE C., KOLCHINSKY S., MCSHANE L., DROHAN W. N. AND BROWN P. (2003) Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with human-derived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* **43**, 1687-94.
- CROZET,C., BENCSIK,A., FLAMANT,F., LEZMI,S., SAMARUT,J. & BARON,T. (2001a) Florid plaques in ovine PrP transgenic mice infected with an experimental ovine BSE. *EMBO Rep.*, **2**, pp. 952-956.
- CROZET,C., FLAMANT,F., BENCSIK,A., AUBERT,D. , SAMARUT,J. & BARON,T. (2001b) Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *J.Virol.*, **75**, pp. 5328-5334.
- DAWSON,M., HOINVILLE,L.J., HOSIE,B.D. & HUNTER,N. (1998) Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group. *Vet.Rec.*, **142**, pp. 623-625.
- DESILVA U., GUO X., KUPFER D. M., FERNANDO S. C., PILLAI A. T., NAJAR F. Z., SO S., FITCH G. Q. AND ROE B. A. (2003) Allelic variants of ovine prion protein gene (PRNP) in Oklahoma sheep. *Cytogenet Genome Res* **102**, 89-94.
- DESLYS,J.P., COMOY,E., HAWKINS,S., SIMON,S., SCHIMMEL,H., WELLS,G., GRASSI,J. & MOYNAGH,J. (2001) Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature*, **409**, pp. 476-478.
- DICKINSON,A.G. (1976) Scrapie in sheep and goats. *Front Biol.*, **44**, pp. 209-241.
- DICKINSON,A.G. (1974) Letter: Scrapie. *Nature*, **252**, pp. 179-180.
- DICKINSON,A.G., YOUNG,G.B., STAMP,J.T. & RENWICK,C.C. (1965) An analysis of natural scrapie in Suffolk sheep. *Heredity*, **20**, pp. 485-503.
- DUCROT,C. & CALAVAS,D. (1998) Hypothèses sur la transmission de la tremblante à partir de l'analyse épidémiologique de 15 élevages atteints de tremblante. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **149**, pp. 831-840.
- ELSEN, J. M., BARILLET, F., FRANÇOIS, D, BOUIX, J, BIBE, B, AND PALHIÈRE, I. 2002Génétique de la sensibilité à la tremblante. Bulletin GTV
- ELSEN,J.M., AMIGUES,Y., SCHELCHER,F., DUCROCQ,V., ANDREOLETTI,O., EYCHENNE,F., KHANG,J.V., POIVEY,J.P., LANTIER,F. & LAPLANCHE,J.L. (1999) Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch. Virol.*, **144**, pp. 431-445.
- FOOTE,W.C., CLARK,W., MACIULIS,A., CALL,J.W., HOURRIGAN,J., EVANS,R.C., MARSHALL,M.R. & DE CAMP,M. (1993) Prevention of scrapie transmission in sheep, using embryo transfer. *Am.J.Vet.Res.*, **54**, pp. 1863-1868.
- FOSTER,J.D., PARNHAM,D., CHONG,A., GOLDMANN,W. & HUNTER,N. (2001a) Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *Vet.Rec.*, **148**, pp. 165-171.

- FOSTER,J.D., PARNHAM,D.W., HUNTER,N. & BRUCE,M. (2001b) Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J.Gen.Virol.*, **82**, pp. 2319-2326.
- FOSTER,J., MCKELVEY,W., FRASER,H., CHONG,A., ROSS,A., PARNHAM,D., GOLDMANN,W. & HUNTER,N. (1999) Experimentally induced bovine spongiform encephalopathy did not transmit via goat embryos. *J.Gen.Virol.*, **80** (Pt 2), pp. 517-524.
- FOSTER,J.D., BRUCE,M., MCCONNELL,I., CHREE,A. & FRASER,H. (1996a) Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep. *Vet.Rec.*, **138**, pp. 546-548.
- FOSTER,J.D., HUNTER,N., WILLIAMS,A., MYLNE,M.J., MCKELVEY,W.A., HOPE,J., FRASER,H. & BOSTOCK,C. (1996b) Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer. *Vet.Rec.*, **138**, pp. 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**, pp. 341-343.
- FURUKAWA H., DOH-URA K., OKUWAKI R., SHIRABE S., YAMAMOTO K., UDONO H., ITO T., KATAMINE S. AND NIWA M. (2004) A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine. Contamination with bacterial outer membrane proteins. *J Biol Chem* **279**, 23661-7.
- GLATZEL M., ABELA E., MAISSEN M. AND AGUZZI A. (2003) Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* **349**, 1812-20.
- GOLDMANN,W., HUNTER,N., SMITH,G., FOSTER,J. & HOPE,J. (1994) PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J.Gen.Virol.*, **75** (Pt 5), pp. 989-995.
- GOLDMANN W., HUNTER N., MARTIN T., DAWSON M. AND HOPE J. (1991) Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short, G-C-rich element within the protein-coding exon. *J Gen Virol* **72** (Pt 1), 201-4.
- GOMBOJAV A., ISHIGURO N., HORIUCHI M., SERJMYADAG D., BYAMBAA B. AND SHINAGAWA M. (2003) Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *J Vet Med Sci* **65**, 75-81.
- GONZALO C., ARIZNABARRETA A., CARRIEDO J. A. AND SAN PRIMITIVO F. (2002) Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *J Dairy Sci* **85**, 1460-7.
- GRASSI J, COMOY E., SIMON S., CREMINON C., FROBERT Y., TRAPMANN S., SCHIMMEL H., HAWKINS S. A., MOYNAGH J., DESLYS J. P. AND WELLS G. A. (2001) Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. *Vet Rec* **149**, 577-82.
- GREIG,J.R. (1950) Scrapie in Sheep. *Journal of Comparative Pathology*, **60**, pp. 263-266.
- GRETZSCHEL A., BUSCHMANN A., EIDEN M., ZIEGLER U., LUHKEN G., ERHARDT G. AND GROSCHUP M. H. (2005) Strain typing of german transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **52**, 55-63.
- GROSCHUP MH, WEILAND F, STRAUB OC, PFAFF E (1996) Detection of scrapie agent in the peripheral nervous system of a diseased sheep. *Neurobiol Dis.*; **3**(3):191-5
- GUIGUEN F., GREENLAND T., PARDO E., PANAYE G. AND MORNEX J. F. (1996) Flow cytometric analysis of goat milk lymphocytes: subpopulations and adhesion molecule expression. *Vet Immunol Immunopathol* **53**, 173-8.
- GUO X., KUPFER D. M., FITCH G. Q., ROE B. A. AND DESILVA U. (2003) Identification of a novel lysine-171 allele in the ovine prion protein (PRNP) gene. *Anim Genet* **34**, 303-5.
- HADLOW,W.J., KENNEDY,R.C. & RACE,R.E. (1982) Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J.Infect.Dis.*, **146**, pp. 657-664.
- HADLOW,W.J., KENNEDY,R.C., RACE,R.E. & EKLUND,C.M. (1980a) Virologic and neurohistologic findings in dairy goats affected with natural scrapie. *Vet.Pathol.* , **17**, pp. 187-199.

- HADLOW, W.J., KENNEDY, R.C., RACE, R.E. & EKLUND, C.M. (1980b) Virologic and Neurohistologic Findings in Dairy Goats Affected with Natural Scrapie. *Veterinary Pathology*, **17**, pp. 187-199.
- HEALY A. M., HANNON D., MORGAN K. L., WEAVERS E., COLLINS J. D. AND DOHERTY M. L. (2004) A paired case-control study of risk factors for scrapie in Irish sheep flocks. *Prev Vet Med* **64**, 73-83.
- HEATON M. P., LEYMASTER K. A., FREKING B. A., HAWK D. A., SMITH T. P., KEELE J. W., SNELLING W. M., FOX J. M., CHITKO-MCKOWN C. G. AND LAEGREID W. W. (2003) Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer. *Mamm Genome* **14**, 765-77.
- HEIKENWALDER M., ZELLER N., SEEGER H., PRINZ M., KLOHN P. C., SCHWARZ P., RUDDLE N. H., WEISSMANN C. AND AGUZZI A. (2005) Chronic lymphocytic inflammation specifies the organ tropism of prions. *Science* **307**, 1107-10.
- HOINVILLE, L.J., HOEK, A., GRAVENOR, M.B. & MCLEAN, A.R. (2000) Descriptive epidemiology of scrapie in Great Britain: results of a postal survey. *Vet. Rec.*, **146**, pp. 455-461.
- HOINVILLE, L.J. (1996) A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev. Sci. Tech.*, **15**, pp. 827-852.
- HOPE, J., WOOD, S.C., BIRKETT, C.R., CHONG, A., BRUCE, M.E., CAIRNS, D., GOLDMANN, W., HUNTER, N. & BOSTOCK, C.J. (1999) Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641. *J. Gen. Virol.*, **80** (Pt 1), pp. 1-4
- HOPP P., WEBB C. R. AND JARP J. (2003) Monte Carlo simulation of surveillance strategies for scrapie in Norwegian sheep. *Prev Vet Med* **61**, 103-25.
- HOPP, P., ULVUND, M.J. & JARP, J. (2001) A case-control study on scrapie in Norwegian sheep flocks. *Prev. Vet. Med.*, **51**, pp. 183-198.
- HOURRIGAN, J.L. (1990) Experimentally induced bovine spongiform encephalopathy in cattle in Mission, Tex, and the control of scrapie. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, **196**, pp. 1678-1679.
- HOURRIGAN, J.L., KLINGSPORN, A., CLARK, W.W. & DE CAMP, M. (1979) Epidemiology of scrapie in the United States. In: *Transmissible Diseases of the Nervous System* (Ed. by S.B. Prusiner & W.J. Hadlow), pp. 331-356. Academic Press, New York.
- HOUSTON F., GOLDMANN W., CHONG A., JEFFREY M., GONZALEZ L., FOSTER J., PARNHAM D. AND HUNTER N. (2003) Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature* **423**, 498.
- HOUSTON F, FOSTER JD, CHONG A, HUNTER N, BOSTOCK CJ. (2000) Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet*. Sep 16; **356**(9234):999-1000.
- HUANG F. P., FARQUHAR C. F., MABBOTT N. A., BRUCE M. E. AND MACPHERSON G. G. (2002) Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol* **83**, 267-71.
- 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*. Nov; **83**(Pt 11):2897-905
- HUNTER, N. (2000) Transmissible Spongiform encephalopathies. In: *Breeding for Disease resistance in Farm animals* pp. 325-339. RFE Axford CABI Publishing, New York
- HUNTER N., FOSTER J. D., GOLDMANN W., STEAR M. J., HOPE J. AND BOSTOCK C. (1996) Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol* **141**, 809-24.
- HUNTER, N., FOSTER, J.D., DICKINSON, A.G. & HOPE, J. (1989) Linkage of the gene for the scrapie-associated fibril protein (PrP) to the Sip gene in Cheviot sheep. *Vet. Rec.*, **124**, pp. 364-366.
- IKEDA, T., HORIUCHI, M., ISHIGURO, N., MURAMATSU, Y., KAI-UWE, G.D. & SHINAGAWA, M. (1995) Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. *J. Gen. Virol.*, **76** (Pt 10), pp. 2577-2581.
- JEFFREY, M., RYDER, S., MARTIN, S., HAWKINS, S.A., TERRY, L., BERTHELIN-BAKER, C. & BELLWORTHY, S.J. (2001) Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform

- encephalopathy (BSE). 1. Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera. *J.Comp Pathol.*, **124**, pp. 280-289.
- KAO R. R., GRAVENOR M. B., BAYLIS M., BOSTOCK C. J., CHIHOTA C. M., EVANS J. C., GOLDMANN W., SMITH A. J. AND MCLEAN A. R. (2002) The potential size and duration of an epidemic of bovine spongiform encephalopathy in British sheep. *Science* **295**, 332-5.
- KIMBERLIN, R.H. & WALKER, C.A. (1978) Pathogenesis of mouse scrapie: effect of route of inoculation on infectivity titres and dose-response curves. *J.Comp Pathol.*, **88**, pp. 39-47.
- LAPLANCHE J. L., CHATELAIN J., WESTAWAY D., THOMAS S., DUSSAUCY M., BRUGERE-PICOUX J. AND LAUNAY J. M. (1993) PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* **15**, 30-7.
- LASMEZAS, C.I., FOURNIER, J.G., NOUVEL, V., BOE, H., MARCE, D., LAMOURY, F., KOPP, N., HAUW, J.J., IRONSIDE, J., BRUCE, M., DORMONT, D. & DESLYS, J.P. (2001) Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: implications for human health. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, pp. 4142-4147
- LEITNER G, CHAFFER M, SHAMAY A, SHAPIRO F, MERIN U, EZRA E, SARAN A, SILANIKOVE N. (2004a) Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *J Dairy Sci.* Jan;**87**(1):46-52.
- LEITNER G, MERIN U, SILANIKOVE N. (2004b) Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *J Dairy Sci.* Jun;**87**(6):1719-26.
- LEGROTtaglie R., MARTINI M., BARSOTTI G. AND AGRIMI P. (1999) The effects of ovine lentivirus infection on some productive aspects in a Sardinian sheep flock from Italy. *Vet Res Commun* **23**, 123-31.
- LERONDELLE C., GREENLAND T., JANE M. AND MORNEX J. F. (1995) Infection of lactating goats by mammary instillation of cell-borne caprine arthritis-encephalitis virus. *J Dairy Sci* **78**, 850-5.
- LEZMI S., MARTIN S., SIMON S., COMOY E., BENCSIK A., DESLYS J. P., GRASSI J., JEFFREY M. AND BARON T. (2004) Comparative molecular analysis of the abnormal prion protein in field scrapie cases and experimental bovine spongiform encephalopathy in sheep by use of Western blotting and immunohistochemical methods. *J Virol* **78**, 3654-62.
- LLEWELYN C. A., HEWITT P. E., KNIGHT R. S., AMAR K., COUSENS S., MACKENZIE J. AND WILL R. G. (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* **363**, 417-21.
- MABBOTT, N.A. & BRUCE, M.E. (2001) The immunobiology of TSE diseases. *J.Gen.Virol.*, **82**, pp. 2307-2318.
- MADEC J. Y., SIMON S., LEZMI S., BENCSIK A., GRASSI J. AND BARON T. (2004) Abnormal prion protein in genetically resistant sheep from a scrapie-infected flock. *J Gen Virol* **85**, 3483-6.
- MAIGNIEN, T., LASMEZAS, C.I., BERINGUE, V., DORMONT, D. & DESLYS, J.P. (1999) Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J.Gen.Virol.*, **80** (Pt 11), pp. 3035-3042
- MANUELIDIS, L., ZAITSEV, I., KONI, P., LU, Z.Y., FLAVELL, R.A. & FRITCH, W. (2000) Follicular dendritic cells and dissemination of Creutzfeldt-Jakob disease. *J.Virol.*, **74**, pp. 8614-8622.
- MCBRIDE P. A., SCHULZ-SCHAEFFER W. J., DONALDSON M., BRUCE M., DIRINGER H., KRETZSCHMAR H. A. AND BEEKES M. (2001) Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol* **75**, 9320-7.
- MIDDLETON DJ, BARLOW RM (1993) Failure to transmit bovine spongiform encephalopathy to mice by feeding them with extraneural tissues of affected cattle. *Vet Rec.* May 29;**132**(22):545-7
- MONTRASIO, F., COZZIO, A., FLECHSIG, E., ROSSI, D., KLEIN, M.A., RULICKE, T., RAEBER, A.J., VOSSHENRICH, C.A., PROFT, J., AGUZZI, A. & WEISSMANN, C. (2001) B lymphocyte-restricted expression of prion protein does not enable prion replication in prion protein knockout mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, pp. 4034-4037.

MORIGNAT E., CAZEAU G., BIACABE A.-G., VINARD J.-L., BENCSIK A., MADEC J.-Y., DUCROT C., BARON T., CALAVAS D. (2005). Estimates of small ruminant TSE prevalence in France in 2002. *Veterinary Record*, Sous presse,

MORIGNAT E., CAZEAU G., BIACABE A.-G., VINARD J.-L., BENCSIK A., MADEC J.-Y., DUCROT C., BARON T., CALAVAS D. (2004). Simulations to get unbiased estimates of small ruminant Scrapie prevalence in France in 2002. In First International Conference of the European Network of Excellence NeuroPrion, Paris-France, Proceedings, 1.

MORIGNAT E., CAZEAU G., CALAVAS D. (2004). Surveillance active de la tremblante chez les petits ruminants. Analyse du programme 2003. Synthèse. 11 pp

MORIGNAT E., CAZEAU G., CALAVAS D. (2003). Surveillance active de la tremblante chez les petits ruminants. Analyse du programme 2002. Synthèse. 16 pp.

MOYNAGH, J. & SCHIMMEL, H. (1999) Tests for BSE evaluated. Bovine spongiform encephalopathy. *Nature*, **400**, pp. 105.

MOUM T., OLSAKER I., HOPP P., MOLDAL T., VALHEIM M. AND BENESTAD S. L. (2005) Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol* **86**, 231-5.

OESCH, B., DOHERR, M., HEIM, D., FISCHER, K., EGLI, S., BOLLIGER, S., BIFFIGER, K., SCHALLER, O., VANDEVELDE, M. & MOSER, M. (2000) Application of Prionics Western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs. *Arch. Virol. Suppl*, pp. 189-195.

PARRY, H. B. (1983) *Pathology of Natural Scrapie*, Academic Press edn. Ed: By, London.

PATTISON, I. H. (1964) The spread of scrapie by contact between affected and healthy sheep, goats or mice. *The Veterinary Record*, **76**, pp. 333-336.

PATTISON, I. H. & MILLSON, G. C. (1962) Distribution of the scrapie agent in the tissue of experimentally inoculated goats. *Journal of Comparative Pathology*, **72**, pp. 233-244.

PATTISON, I. H. & MILLSON, G. C. (1961) Experimental transmission of scrapie to goats and sheep by the oral route. *Journal of Comparative Pathology*, **71**, pp. 171-176.

PEDEN A. H., HEAD M. W., RITCHIE D. L., BELL J. E. AND IRONSIDE J. W. (2004) Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* **364**, 527-9.

PERSSON-WALLER K. AND COLDITZ I. G. (1998) Expression of surface antigens on blood and mammary leukocytes in lactating and dry ewes. *Vet Immunol Immunopathol* **62**, 273-8.

PHILIPPE S., DUCROT C., ROY P., REMONTET L., JARRIGE N., CALAVAS D. (2005). Epidemiological evidence of the transmission of ovine scrapie with proprietary feedstuffs in France. *Emerging Infectious Diseases*, submitted.

POLITIS I., BARBANO D. M. AND GOREWIT R. C. (1992) Distribution of plasminogen and plasmin in fractions of bovine milk. *J Dairy Sci* **75**, 1402-10.

POST, K., RIESNER, D., WALLDORF, V. & MEHLHORN, H. (1999) Fly larvae and pupae as vectors for scrapie. *Lancet*, **354**, pp. 1969-1970.

RACE, R., JENNY, A. & SUTTON, D. (1998) Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis. *J. Infect. Dis.*, **178**, pp. 949-953.

SABBAJ S., EDWARDS B. H., GHOSH M. K., SEMRAU K., CHEELO S., THEA D. M., KUHN L., RITTER G. D., MULLIGAN M. J., GOEPFERT P. A. AND ALDROVANDI G. M. (2002) Human immunodeficiency virus-specific CD8(+) T cells in human breast milk. *J Virol* **76**, 7365-73.

SABORIO, G. P., PERMANNE, B. & SOTO, C. (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, **411**, pp. 810-813.

SANCHEZ A., CONTRERAS A., CORRALES J. C. AND MARCO J. C. (2001) Relationships between infection with caprine arthritis encephalitis virus, intramammary bacterial infection and somatic cell counts in dairy goats. *Vet Rec* **148**, 711-4.

- SCHALLER,O., FATZER,R., STACK,M., CLARK,J., COOLEY,W., BIFFIGER,K., EGLI,S., DOHERR,M., VANDEVELDE,M., HEIM,D., OESCH,B. & MOSER,M. (1999) Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol.(Berl)*, **98**, pp. 437-443.
- SEABURY C. M. AND DERR J. N. (2003) Identification of a novel ovine PrP polymorphism and scrapie-resistant genotypes for St. Croix White and a related composite breed. *Cytogenet Genome Res* **102**, 85-8.
- SCHMERR,M.J., JENNY,A.L., BULGIN,M.S., MILLER,J.M., HAMIR,A.N., CUTLIP,R.C. & GOODWIN,K.R. (1999) Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy. *J.Chromatogr.A*, **853**, pp. 207-214.
- SCHREUDER,B.E., DE JONG,M.C., PEKELDER,J.J., VELLEMA,P., BROKER,A.J. & BETCKE,H. (1993) Prevalence and incidence of scrapie in The Netherlands: a questionnaire survey. *Vet.Rec.*, **133**, pp. 211-214.
- SERBAN A, LEGNAME G, HANSEN K, KOVALEVA N, PRUSINER SB. Immunoglobulins in urine of hamsters with scrapie. *J Biol Chem*. 2004 Nov 19;**279**(47):48817-20.
- SHAKED,G.M., SHAKED,Y., KARIV-INBAL,Z., HALIMI,M., AVRAHAM,I. & GABIZON,R. (2001) A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J.Biol.Chem.*, **276**, pp. 31479-31482.
- SHLOMCHIK,M.J., RADEBOLD,K., DUCLOS,N. & MANUELIDIS,L. (2001) Neuroinvasion by a Creutzfeldt-Jakob disease agent in the absence of B cells and follicular dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, pp. 9289-9294.
- SIGURDARSON, S. AND DUCROT, C. 1998 Icelandic Scrapie eradication program.European Scrapie Network.
- SMITS, M. A., BARILLET, F., HARDERS, F. L., BOSCHER, M. Y., VELLEMA, P., AGUERRE, X, HELLINGA, M, MCLEAN, A. R., BAYLIS, M., AND ELSSEN, J. M. 2000Genetics of scrapie susceptibility and selection for resistance. 51th meeting of the EAAP August 21-24 2000 , The Hague, The Netherlands, Session SIV
- SOTO C, ANDERES L, SUARDI S, CARDONE F, CASTILLA J, FROSSARD MJ, PEANO S, SAA P, LIMIDO L, CARBONATTO M, IRONSIDE J, TORRES JM, POCCHIARI M, TAGLIAVINI F. (2005) Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *FEBS Lett*. Jan 31;**579**(3):638-42
- TAMAI,Y., KOJIMA,H., KITAJIMA,R., TAGUCHI,F., OHTANI,Y., KAWAGUCHI,T., MIURA,S., SATO,M. & ISHIHARA,Y. (1992) Demonstration of the transmissible agent in tissue from a pregnant woman with Creutzfeldt-Jakob disease. *N.Engl.J.Med.*, **327**, pp. 649.
- THOMZIG A., SCHULZ-SCHAEFFER W., KRATZEL C., MAI J. AND BEEKES M. (2004) Preclinical deposition of pathological prion protein PrPSc in muscles of hamsters orally exposed to scrapie. *J Clin Invest* **113**, 1465-72.
- THOMZIG A., KRATZEL C., LENZ G., KRUGER D. AND BEEKES M. (2003) Widespread PrPSc accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie. *EMBO Rep* **4**, 530-3.
- THORGEIRSDOTTIR S., SIGURDARSON S., THORISSON H. M., GEORGSSON G. AND PALSDOTTIR A. (1999) PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *J Gen Virol* **80** (Pt 9), 2527-34.
- TUO,W.B., ZHUANG,D.Y., KNOWLES,D.P., CHEEVERS,W.P., SY,M.S. & OROURKE,K.I. (2001) PrP-C and PrP-Sc at the Fetal-Maternal Interface. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, pp. 18229-18234.
- VACCARI G., PETRAROLI R., AGRIMI U., ELENi C., PERFETTI M. G., DI BARI M. A., MORELLI L., LIGIOS C., BUSANI L., NONNO R. AND DI GUARDO G. (2001) PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. Brief report. *Arch Virol* **146**, 2029-37.
- VILOTTE,J.L., SOULIER,S., ESSALMANI,R., STINNAKRE,M.G., VAIMAN,D., LEPOURRY,L., DA SILVA,J.C., BESNARD,N. , DAWSON,M., BUSCHMANN,A., GROSCHUP,M., PETIT,S., MADELAINE,M.F., RAKATOBES,S., LE DUR,A., VILETTE,D. & LAUDE,H. (2001) Markedly increased

susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J.Virol.*, **75**, pp. 5977-5984.

WANG,S., FOOTE,W.C., SUTTON,D.L., MACIULIS,A., MILLER,J.M., EVANS,R.C., HOLYOAK,G.R., CALL,J.W., BUNCH,T.D., TAYLOR,W.D. & MARSHALL,M.R. (2001) Preventing experimental vertical transmission of scrapie by embryo transfer. *Theriogenology*, **56**, pp. 315-327.

WINTER P. AND COLDITZ I. G. (2002) Immunological responses of the lactating ovine udder following experimental challenge with *Staphylococcus epidermidis*. *Vet Immunol Immunopathol* **89**, 57-65.

WISNIEWSKI,H.M., SIGURDARSON,S., RUBENSTEIN,R., KASCSAK,R.J. & CARP,R.I. (1996) Mites as vectors for scrapie. *Lancet*, **347**, pp. 1114.