



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

Maisons-Alfort, le 7 avril 2010

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif au risque zoonotique des différentes souches connues d'EST chez les petits ruminants

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 25 juin 2009 par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) d'une demande d'évaluation du risque zoonotique des différentes souches connues d'EST chez les petits ruminants.

2. CONTEXTE

Dans son avis en date du 15 mai 2006¹, l'Afssa indiquait qu'il était prématuré de conclure que les souches d'EST, autres que l'ESB, ne présentaient aucun risque pour l'homme. En effet, si aucune donnée épidémiologique n'indique de lien évident entre les formes d'EST animales autres que l'ESB classique et les cas d'EST humaines, la diversité des souches d'EST pouvant circuler chez les petits ruminants doit conduire à adopter une position prudente en matière d'évaluation du risque.

Cette considération a été reprise dans les avis ultérieurs de l'Agence concernant la police sanitaire des petits ruminants^{2,3}, notamment dans ses recommandations de retrait de la consommation de produits issus d'animaux de génotypes sensibles dans les troupeaux infectés par la tremblante classique.

L'Afssa a été saisie le 25 juin 2009 par la DGAL afin qu'elle puisse lui fournir un maximum de données expérimentales ou de démonstrations concernant ce point, à même de permettre d'argumenter plus facilement auprès des partenaires européens du bien fondé des mesures de précautions vis-à-vis des EST des petits ruminants.

L'Afssa doit, en particulier :

- préciser quels sont les différents critères qui permettent de reconnaître à une EST le statut de zoonose et récapituler les connaissances scientifiques disponibles pour chacune des EST de petits ruminants.

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

¹ Avis de l'Afssa relatif aux évolutions de la réglementation communautaire proposées par la feuille de route pour les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) en date du 15 mai 2006.

² Avis de l'Afssa relatif à l'évolution des mesures de police sanitaire dans les cheptels ovins et caprins où un cas de tremblante classique ou atypique a été détecté, en date du 15 janvier 2007.

³ Avis de l'Afssa relatif aux possibles conséquences, en termes de santé animale et de santé publique, des nouvelles données scientifiques disponibles concernant la transmission intra-spécifique de l'agent de la tremblante classique par le lait en date du 8 octobre 2008.

- définir pour quelles raisons l'absence de lien épidémiologique établi entre une EST animale et une EST humaine ne permet pas de conclure à l'absence de relation zoonotique.
- établir une synthèse récapitulant les différentes expériences déjà réalisées pour évaluer l'importance de la barrière d'espèce humaine pour les différentes souches d'EST des petits ruminants (tableau par espèces cibles, voie de contamination utilisée et conclusions éventuelles tirées de tous ces éléments par le Comité quant au niveau de risque zoonotique).

3. METHODE D'EXPERTISE

L'expertise collective a été réalisée par le Comité d'experts spécialisés (CES) « ESST» réuni les 05 novembre 2009, 17 décembre 2009, 14 janvier 2010 et 16 février 2010.

Le présent avis se fonde sur l'examen de la littérature scientifique décrivant d'une part les données épidémiologiques et d'autre part celles visant à établir la capacité de différents agents des EST à se propager d'une espèce à une autre.

L'exemple de l'ESB et du cheminement qui a conduit à la confirmation de son statut zoonotique a été également pris en compte par le Comité pour illustrer son analyse. Le risque zoonotique lié à la présence de l'ESB classique chez les petits ruminants [1] est considéré comme acquis et ne sera pas traité dans cet avis.

4. ARGUMENTAIRE

L'argumentaire de l'Afssa est fondé sur l'avis du Comité d'experts spécialisé «ESST» dont les éléments sont présentés ci-dessous :

Sommaire de l'argumentaire

4.1. Préambule	3
4.2. Les limites de l'approche épidémiologique	3
4.2.1. Les limites des dispositifs de surveillance des EST animales et humaines	3
4.2.2. Facteurs de risques associés au développement de la MCJ sporadique	4
4.2.3. Risque géographique associé au développement de la MCJ sporadique	5
4.2.4. Conclusion	6
4.3. L'inadéquation des méthodes phylogéniques moléculaires	7
4.4. Transmission des souches de prions animales et humaines à un même hôte receveur et comparaison du phénotype biologique obtenu	7
4.5. Evaluer <i>in vivo</i> la barrière de transmission PrP humaine / agents des EST de ruminants	8

4.5.1. Inoculation de primates non-humains.	8
4.5.2. Inoculation de souris transgéniques exprimant la PrP humaine	9
4.6. Transmission d'EST humaines aux petits ruminants	10
4.7. Evaluer <i>in vitro</i> la barrière de transmission PrP humaine / agents des EST de petits ruminants	11
4.8. Les différentes formes d'ESB et la difficulté de démontrer le caractère zoonotique d'une EST animale	11

4.1. Préambule

Les zoonoses sont des maladies parasitaires ou infectieuses capables de se propager de l'animal à l'homme (ou inversement). Il n'existe pas de liste officielle recensant les maladies zoonotiques et le potentiel zoonotique de certains agents infectieux peut être plus ou moins marqué (maladie à fort potentiel zoonotique comme la rage ou à plus faible potentiel comme l'ecthyma contagieux des petits ruminants).

Deux approches complémentaires et non exclusives conduisent généralement à l'identification du caractère zoonotique d'un agent infectieux conventionnel (bactérie, virus) :

- i. l'épidémiologie qui permet d'établir une association spatio-temporelle entre la survenue de maladies humaines et (i) des activités en relation avec les animaux ou (ii) la circulation d'un agent infectieux chez les animaux,
- ii. la phylogénie des agents infectieux (généralement basée sur la caractérisation des séquences en acides nucléiques) qui permet d'établir de façon univoque l'identité des agents infectieux retrouvés chez les animaux et chez des patients atteints.

Il faut noter cependant que l'origine zoonotique de certaines pathologies, bien que très fortement suspectée, peut demeurer extrêmement difficile à démontrer formellement (comme dans le cas de certaines fièvres hémorragiques - Ebola).

Enfin, la mise en évidence d'un même agent infectieux chez l'homme et l'animal ne signifie pas forcément l'existence d'un risque de transmission à l'homme à partir de l'animal, dans la mesure où certains agents pathogènes peuvent se propager à la fois chez l'homme et chez des animaux à partir d'une source externe (par exemple le tétanos).

Pour les maladies à prion, il est impossible de comparer directement les caractéristiques des agents infectieux observés chez l'homme et l'animal dans la mesure où l'agent infectieux n'est pas totalement identifié, et qu'il ne renferme pas, en l'état actuel des connaissances, d'acides nucléiques qui lui sont spécifiques. A ce jour, la caractérisation biologique de l'agent infectieux repose quasi-exclusivement sur les caractéristiques de la transmission expérimentale (taux de transmission et période d'incubation) à un hôte receveur (très généralement un rongeur de laboratoire) et sur la caractérisation détaillée du phénotype obtenu (profil moléculaire de la protéine prion pathologique dans le cerveau des animaux atteints, lésions neuropathologiques, etc.).

4.2. Les limites de l'approche épidémiologique

4.2.1. Les limites des dispositifs de surveillance des EST animales et humaines

Pour les EST animales, seule l'espèce bovine bénéficie, et depuis seulement 2001, d'une surveillance exhaustive sur un large territoire. Cette surveillance est basée sur la mise en évidence de la protéine prion pathologique (PrP^{Sc}) dans le tissu nerveux central des animaux à l'abattoir ou à

l'équarrissage.

Cette surveillance a révélé l'existence de formes d'EST animales jusque là inconnues, les ESB atypiques de types H et L [2, 3].

Les données épidémiologiques chez les petits ruminants d'élevage restent en revanche plus parcellaires. En effet, le dispositif de surveillance active appliquée à ces espèces a été généralement limité à un sondage, sur une période de temps restreinte.

Cette surveillance active des petits ruminants a cependant :

- i. démontré que l'estimation de la prévalence des EST chez les petits ruminants au cours des décennies précédentes était inexacte pour ces espèces (sous estimation, non détection dans certaines zones géographiques),
- ii. également contribué à la découverte d'une autre forme de tremblante jusque là inconnue : la tremblante atypique. La prévalence de la tremblante atypique apparaît aujourd'hui en Europe égale ou supérieure à celle de la tremblante classique [4]. La mise en évidence récente d'un cas autochtone de tremblante atypique sur un ovin en Nouvelle Zélande, territoire jusqu'ici considéré comme indemne d'EST animales, vient souligner les limites dans notre estimation passée et actuelle de la distribution de ces maladies.

Les formes classiques (c'est-à-dire non atypiques ou ne présentant pas de similitudes avec l'ESB) d'EST ovines et caprines sont opérationnellement regroupées sous le nom générique de « tremblante classique ». Ce terme recouvre en réalité une maladie qui peut être causée par une variété d'agents, possédant des propriétés biologiques différentes (dont la capacité à être expérimentalement transmis d'une espèce à une autre). Les connaissances relatives à la diversité des souches de prion circulant chez les petits ruminants et d'une façon plus générale chez les animaux et chez l'homme demeurent limitées.

Les outils passés ou actuels de surveillance épidémiologique ne permettent pas, sauf exception, de faire le distinguo entre ces différents agents responsables de la tremblante. Cette situation conduit sur un plan épidémiologique à considérer abusivement que tous les cas de tremblante dite classique représentent un risque identique de transmission interspécifique.

Dans leur forme la plus fréquente, les EST humaines (maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) dite sporadique) surviennent principalement chez des individus âgés (de 50 à 60 ans) avec une incidence de l'ordre d'1,5 cas par million et par an [5]. L'identification de ces cas repose sur le degré de médicalisation du pays et sur la possibilité de confirmer la maladie après le décès. Malgré une meilleure information des professionnels de santé et les initiatives nationales et transnationales visant à améliorer l'identification des cas suspects de MCJ, il demeure difficile aujourd'hui d'évaluer la sensibilité du dispositif d'épidémirosurveillance des EST humaines.

4.2.2. Facteurs de risque associés au développement de la MCJ sporadique

Différentes études ont été menées afin d'évaluer l'existence d'un lien épidémiologique entre MCJ sporadique et l'exposition aux tissus et produits animaux et en particulier à ceux issus d'animaux atteints de tremblante.

Les premiers travaux menés sur le sujet ne se fondaient pas réellement sur une démarche épidémiologique fondée sur une méthodologie d'étude scientifiquement définie, mais sur la discussion autour d'observations ou de données anciennes, pour la plupart de qualité discutable [6,7]. Bien que ces études aient été ou soient encore largement reprises dans la littérature, d'importantes réserves doivent donc être émises quant à la pertinence de ces travaux et des conclusions qui en sont tirées. La seule relation observée dans l'étude de Chatelain et al. [7] était un lien entre fréquence de MCJ et niveau d'urbanisation des zones géographiques, ce qui était vraisemblablement la conséquence d'un biais de surveillance de cette maladie chez l'homme, la détection étant meilleure dans les zones urbaines selon les auteurs eux mêmes. Masters et al. [6] ont présenté une analyse descriptive des caractéristiques de 1435 patients atteints de MCJ à travers le monde. Ils ont mentionné la présence de patients de professions médicales et de professions en relation avec les animaux ou les produits animaux, mais il n'est pas possible de

mettre en évidence un quelconque lien épidémiologique dans la mesure où la fréquence de ces activités professionnelles parmi les patients n'est pas comparée dans cette étude à celle de témoins.

Plus récemment, des études visant à identifier des facteurs de risque associés à la survenue de MCJ chez les patients ont été mises en œuvre. Le plus souvent, ces travaux reposent sur des dispositifs cas témoins, dont les plus puissants sont basés sur les données recueillies dans plusieurs pays sur une longue période.

Ainsi, l'étude publiée par Van Duijn et al [8], a été menée à l'échelle européenne sur 405 patients atteints de MCJ sporadique. Elle a recherché un lien entre la MCJ et une quarantaine de facteurs relatifs aux caractéristiques génétiques, antécédents médicaux et chirurgicaux des patients, activités professionnelles, contacts avec les animaux et alimentation. Seules quelques relations relativement faibles ont été mises en évidence entre MCJ et consommation de viande crue (risque relatif (RR) de 1,63 (intervalle de confiance à 95% : 1,18-2,23))⁴, de cervelle (RR 1,68 (1,18-2,39)), une fréquente exposition à des cuirs (autres que les habits) (RR 1,94 (1,13-3,33)), une exposition à des engras à base de cornes et d'onglons RR 2,32 (1,38-2,91)).

Une étude helvétique a été menée sur 69 patients atteints de MCJ sporadique, suite à une augmentation inexplicable de l'incidence des cas dans ce pays au début des années 2000 [9]. Plus de 130 facteurs ont été étudiés, du même type que précédemment, mais plus détaillés et en y ajoutant des aspects socio-économiques et des informations sur la consommation de médicaments, tabac et drogues. Parmi tous les facteurs d'exposition aux produits animaux (alimentation, contact etc.), seule la consommation de rognons a été trouvée significativement associée à la maladie (odds ratio (OR) de 1,96 (1,04-3,68)). Toutefois il doit être noté qu'une vingtaine d'autres facteurs relatifs à des catégories sans rapport avec une exposition aux animaux ou produits animaux sont également apparus significatifs.

En 2003, Cocco et al [10] ont publié les résultats d'une étude rétrospective sur les statistiques de mortalité aux Etats-Unis, incluant 636 patients morts de MCJ et plus de 3000 témoins, et investiguant les activités professionnelles. Ces dernières ont été classées en 154 catégories, parmi lesquelles 11 pouvaient être considérées comme permettant une exposition possible aux agents des ESST. Parmi elles, ils ont montré un lien épidémiologique entre la MCJ et l'activité de boucher (OR 6,8 (1,5-30,1)) d'une part, et le fait de travailler chez un médecin d'autre part. Des relations statistiques significatives ont aussi été observées avec une vingtaine d'autres professions. Il est à noter que le très grand nombre de facteurs testés dans ce travail introduit un risque élevé de relations faussement positives dues aux tests statistiques multiples. Ce phénomène existe aussi dans les autres études mais à un degré moindre.

Ces différentes études de recherche de facteurs de risque de MCJ mettent ainsi en évidence certains facteurs d'exposition liés, soit à la proximité avec des produits issus d'animaux, soit à la consommation de produits animaux, sans qu'il soit précisé l'espèce animale en question (donc sans indication sur le type d'EST animale qui pourrait être à risque pour l'homme).

4.2.3. Risque géographique associé au développement de la MCJ sporadique

Un argument couramment utilisé pour rejeter l'existence potentielle d'un lien entre la survenue des cas d'EST humaines et l'exposition aux prions de petits ruminants est le fait que la prévalence apparente de la MCJ n'est pas différente dans des pays où les EST des petits ruminants sont endémiques de ceux considérés par l'OIE comme indemnes. La démonstration récente⁵ que malgré son statut indemne la Nouvelle Zélande était atteinte par la tremblante atypique et la notion de mieux en mieux étayée que cette forme de tremblante serait répartie uniformément à la surface du globe ([4]) indiquent clairement les limites de ce type d'argument.

⁴ Dans le bulletin épidémiologique hebdomadaire n° 51 (1993), Alpérövitch et al. indiquent l'existence de « petites » études cas témoins (références non mentionnées) ayant montré une relation entre MCJ et consommation de viande (porc et mouton) et en particulier de viande peu cuite.

⁵ Communiqué des Autorités sanitaires néozélandaises en date du 28 octobre 2009 <http://www.biosecurity.govt.nz/media/28-10-09/atypical-scrapie-detection>

Différentes études se sont penchées sur l'existence d'un lien, notamment géographique, entre les cas de MCJ sporadique. Une étude menée au Royaume-Uni sur les patients atteints de MCJ sporadique identifiés entre 1990 et 1998 [11] a permis de démontrer que ces cas étaient statistiquement géographiquement plus proches les uns des autres que les témoins, suggérant une exposition à un facteur externe commun. De la même façon, Huillard d'Aignaux et al. [12] ont montré en France une hétérogénéité spatiale du risque de MCJ sporadique, avec certains clusters de cas.

Une approche similaire appliquée au variant de la MCJ au Royaume-Uni [13] n'a pas permis de mettre en évidence de clusters de cas, hormis un dans le Leicestershire, qui a été attribué à certaines pratiques dans des boucheries de détail. Les auteurs en ont déduit que l'absence de cluster est probablement liée au fait que l'exposition humaine à l'agent de l'ESB s'est faite par un media diffusé à une large échelle géographique, tel par exemple les viandes séparées mécaniquement ou la préparation de viande de tête (*head meat*).

4.2.4. Conclusion

En conclusion, les études épidémiologiques disponibles laissent apparaître une relation faible mais trouvée de manière récurrente entre EST humaines et exposition aux animaux et/ou aux produits animaux. Il demeure toutefois impossible d'identifier avec précision le ou les facteurs de risque exacts à l'origine de ce lien. Compte tenu des conditions dans lesquelles ces études ont été effectuées (localisation/époque), il est très peu probable que les liaisons observées puissent être attribuées à l'ESB. L'étude des liens potentiels entre les cas sporadiques de MCJ a permis de mettre en évidence l'existence probable de 'clusters de cas' suggérant une possible exposition de certains des patients atteints de MCJ sporadique à un facteur ou plusieurs facteurs externes communs.

Pour bien interpréter ces données, il faut retenir que les travaux épidémiologiques visant à évaluer l'existence d'un lien potentiel entre EST animales et humaines souffrent de limites majeures notamment :

- i) la faiblesse du nombre de cas de MCJ inclus qui limite la puissance des analyses ;
- ii) la durée d'incubation de la MCJ qui limite la pertinence des études rétrospectives, en particulier l'évaluation fiable de l'exposition des individus au cours de leur existence aux facteurs de risque d'intérêt. En effet, l'étude du kuru, une EST humaine dont la transmission est consécutive à des rites funéraires anthropophages, a permis d'établir que les durées d'incubation de la maladie chez l'homme peuvent atteindre plusieurs décennies lors de contamination par voie périphérique ;
- iv) la connaissance imparfaite des paramètres génétiques de susceptibilité qui peuvent affecter la survenue des cas ;
- v) les phénomènes d'échanges de biens et des marchandises ainsi que les voyages, qui compliquent l'analyse des correspondances géographiques entre cas humains et cas animaux ;
- vi) la méconnaissance / non prise en compte des différences d'exposition au risque selon différentes sous-populations (par exemple exposition professionnelle ou liée aux loisirs), qui contribue potentiellement à ne pas mettre en évidence de relation par un phénomène de dilution de l'effet ;
- vii) la diversité des agents responsables des EST chez les petits ruminants. En effet dans l'hypothèse où seules certaines formes (souches) de tremblante auraient un potentiel zoonotique, il faudrait disposer de la capacité d'évaluer l'exposition à ces souches particulières pour pouvoir éventuellement établir un lien épidémiologique entre cette EST animale et la MCJ (étudier le risque spécifique de telle souche de tremblante classique sur tel type de MCJ). Une telle précision dans la caractérisation des souches identifiées grâce à la surveillance des cas d'EST est sur un plan pratique non envisageable du fait de l'extrême lourdeur des méthodes d'identification des souches d'agent des EST.

4.3. L'inadéquation des méthodes fondées sur la phylogénie moléculaire

La nature exacte de l'agent infectieux responsable des EST demeure en effet à ce jour incertaine. Son constituant essentiel est une protéine de l'hôte (la PrP^C) qui au cours du processus pathologique est convertie en un conformère anormal (PrP^{Sc}) et s'accumule sous formes d'agrégats dans le tissu nerveux et parfois lymphoïde des individus atteints. L'absence d'acides nucléiques spécifiques empêche l'utilisation des méthodes fondées sur la phylogénie, actuellement utilisées pour comparer les agents infectieux classiques.

La PrP^{Sc} peut présenter des caractéristiques biochimiques spécifiques (profil électrophorétique en gel SDS-PAGE, résistance aux protéases ou aux agents dénaturants, etc.) permettant dans une même espèce hôte la différentiation de plusieurs souches. Toutefois la séquence PrP de l'hôte influe directement sur le profil biochimique de la PrP^{Sc} d'une souche [14]. En conséquence, la comparaison directe des profils biochimiques entre des isolats humains et animaux d'EST ne peut à elle seule étayer l'existence ou l'absence d'un risque zoonotique associé aux agents des EST. Les résultats d'une étude comparative peuvent cependant motiver des investigations plus approfondies permettant une caractérisation plus précise de l'agent infectieux.

En l'absence d'approche moléculaire permettant d'identifier de façon directe et fiable les agents responsables des EST, la transmission expérimentale des EST animales et humaines à un hôte commun et la comparaison du phénotype biologique obtenu représente une approche privilégiée pour identifier l'implication d'un agent infectieux commun à ces deux maladies.

4.4. Transmission des souches de prions animales et humaines à un même hôte receveur et comparaison des phénotypes biologiques obtenus

Traditionnellement, la comparaison entre deux agents d'EST issus d'espèces différentes s'appuie sur la transmission à un même hôte d'une espèce tierce (rongeurs de laboratoire). Cette approche constitue la base des outils de typage de souche développé par la Neuropathogenesis Unit (NPU) en Ecosse au début des années 1960. Dans son principe général, les isolats d'EST à typer sont transmis de façon seriée à différentes lignées de souris consanguines et plusieurs paramètres sont mesurés chez les animaux au stade terminal de la maladie ou en fin de vie : le temps de survie, la nature des signes cliniques, détection et profil électrophorétique de la PrP^{Sc} dans le cerveau (quantité, taille et proportion des différentes glycoformes de PrP observées en Western blot) et au plan neuropathologique la distribution et la nature des dépôts de PrP^{Sc} ainsi que la répartition et l'intensité de la vacuolisation ('profil lésionnel') dans le tissu cérébral. Le recouvrement de l'ensemble de ces informations permet d'établir l'éventuelle similitude entre les différents isolats initialement transmis.

Cette approche demeure toutefois limitée par le défaut de susceptibilité intrinsèque de certains hôtes à certains agents des EST provenant de différentes espèces. Ainsi, les lignées de souris congéniques polymorphes sur le gène PrP (souris C57BL/6, RIII, etc.) [15], même si elles ont historiquement démontré toute leur utilité dans l'établissement d'un lien entre ESB et vMCJ [16], ont une susceptibilité très variable aux isolats de tremblante classique. Elles semblent, de plus, réfractaires à la tremblante atypique [17]. Elles sont enfin très peu permissives⁶ aux cas de MCJ sporadique [18,19,20].

Lorsqu'un isolat EST est transmis d'une espèce à une autre (en l'occurrence à des modèles rongeurs conventionnels), la transmission dite primaire (ou premier passage) aboutit à des caractéristiques phénotypiques (durée d'incubation, profils lésionnels, etc.) qui peuvent varier d'un animal à l'autre et qui sont dans de nombreux cas instables. Plusieurs passages successifs chez le même hôte sont généralement nécessaires pour obtenir des caractéristiques stables et reproductibles : on parle alors d'agent adapté au nouvel hôte (celui-ci pouvant être

⁶ Capacité à permettre le développement d'un agent infectieux

phénotypiquement totalement différent de l'agent présent dans l'isolat d'origine). Par conséquent la comparaison de deux isolats d'EST par l'utilisation de ces modèles, pour être complète, nécessite plusieurs sous passages. Ce travail est très long, fastidieux et très onéreux.

L'ensemble de ces éléments limite très fortement les possibilités de comparaison des isolats d'EST issus de différentes espèces par l'utilisation des modèles de rongeurs conventionnels et les données validées issues de ces modèles demeurent extrêmement éparses. Une étude montre cependant que des souris C57BL/6 inoculées par un isolat de tremblante classique présentent, après un primo-passage, un profil lésionnel similaire à celui observé après transmission de cas de MCJ sporadique et iatrogène [21]. Du fait des limites du modèle énoncées ci-dessus, la portée de ce résultat demeure toutefois relative.

Plus récemment, la transmission sans barrière d'espèce apparente⁷ de cas de MCJ sporadique au campagnol (*Myodes glareolus*) a été utilisée pour explorer les similitudes/différences entre isolats d'EST humaines et animales [18]. A ce jour, les expériences publiées ne suggèrent aucune similitude phénotypique entre le panel d'isolats de tremblante et le panel de cas de MCJ sporadiques transmis. Toutefois la diversité limitée des isolats de petits ruminants inoculés ne permet pas de tirer des conclusions sur l'absence de caractère zoonotique pour la "tremblante" en général.

4.5. Evaluer *in vivo* la barrière de transmission PrP humaine / agents des EST de ruminants

La transmissibilité d'un agent des EST entre hôtes d'espèces différentes est extrêmement variable : alors que certains agents se propagent sans difficulté, d'autres peuvent s'avérer très difficile ou impossible à transmettre. Ce phénomène, appelé « barrière de transmission », ou « barrière d'espèce » est à l'heure actuelle considéré comme parfaitement imprédictible.

L'évaluation du potentiel zoonotique des agents des EST repose principalement sur l'utilisation de modèles animaux, tous imparfaits, reproduisant certains éléments constitutifs de la barrière de transmission. Il est aujourd'hui établi que les séquences en acides aminés de la protéine PrP de l'hôte et la souche de prion infectante constituent deux éléments essentiels qui déterminent la capacité de l'agent à se propager chez le nouvel hôte. Le développement de lignées de souris transgéniques exprimant une séquence PrP identique à celle de l'espèce donneuse permet en général de limiter ou de s'affranchir de la barrière de transmission considérée.

Différents modèles animaux visant à reproduire cette barrière de transmission pour l'espèce humaine ont été proposés :

- i) les primates chez lesquels la protéine PrP présente un degré d'homologie extrêmement élevé (>96%) avec la protéine humaine,
- ii) des souris transgéniques exprimant les différents allèles du gène PrP humain, en particulier le polymorphisme Met Val au codon 129 connu pour moduler la susceptibilité naturelle aux différentes formes de MCJ [22].

4.5.1. Inoculation de primates non-humains

Historiquement, les primates ont apporté la preuve du caractère transmissible des EST humaines. Après de nombreuses tentatives infructueuses de transmission à divers modèles animaux, la transmissibilité du Kuru a été démontrée par l'équipe de Gajdusek suite à l'inoculation d'homogénats de cerveaux issus de patients atteints à différentes espèces de primates [23].

Les premiers éléments en faveur du caractère zoonotique de l'ESB classique proviennent des expériences de transmission de cas d'ESB au macaque *Cynomolgus* [24]. La maladie induite est en de très nombreux points similaire au vMCJ chez l'homme (plaques « florides », profil

⁷ Absence apparente de phénomène d'adaptation (efficacité de transmission maximale dès le premier passage, diminution de la période d'incubation modeste ou inexiste au cours des passages successifs chez l'hôte considéré)

électrophorétique de la PrP^{Sc}, etc.). Depuis, le modèle primate est utilisé comme modèle de vMCJ dans les études visant à évaluer la barrière de transmission humaine vis-à-vis de l'ESB [21,25,26].

La susceptibilité des primates à un nombre limité d'isolats de tremblante a été testée, par inoculation soit (i) de matériel cérébral provenant directement de petits ruminants, soit (ii) par inoculation d'isolats de tremblante préalablement propagés itérativement à un ou plusieurs hôtes intermédiaires.

Ainsi l'isolat *Compton* (isolat de tremblante passé itérativement 9 fois chez la chèvre puis 8 fois chez la souris) induit une maladie clinique chez le macaque *Cynomolgus* après 5 ans d'incubation [27]. D'autres espèces de singes inclus dans la même étude (macaque rhésus, singe vert, chimpanzé) semblent moins permisifs. Ces expériences sont toutefois difficiles à interpréter dans la mesure où la propagation de l'agent infectieux à la souris est susceptible d'avoir altéré ses propriétés. Dans cette même publication, les auteurs annonçaient que deux macaques (*Cynomolgus*, rhésus) et un chimpanzé infectés par l'isolat *Compton* passé chez la chèvre ou par un isolat de tremblante ovine provenant des USA n'avaient pas développé de maladie clinique 4 ans après injection intracérébrale (résultats de cette expérience non publiés à ce jour). Des études de transmissibilité de la tremblante atypique au macaque *Cynomolgus* sont actuellement en cours. Elles ne sont toutefois pas suffisamment avancées pour pouvoir tirer une quelconque conclusion (E.Comoy, communication personnelle).

Le singe-écureuil est permisif par voie intra-cérébrale (transmission en 14 mois, [19]), et par voie orale [28] en 25-32 mois à l'isolat *Compton*, ayant subi 3 passages intermédiaires supplémentaires chez le hamster. Dans ce modèle, l'inoculation de cas humains de MCJ sporadique induit des périodes d'incubation similaires (11-48 mois par voie intracérébrale, 23-27 mois par voie orale).

Plus récemment, un isolat de tremblante ovine (PG 85/02) a pu être transmis par voie intracérébrale au marmouset, avec une période d'incubation plus courte que l'ESB [29].

Il est important de rappeler que les singes du nouveau-monde (singe-écureuil *saimiri*, marmouset) sont phylogénétiquement plus éloignés de l'homme que les singes de l'ancien monde (macaque, chimpanzé). Cette différence pourrait avoir des conséquences sur la pertinence relative des données obtenues dans ces deux modèles expérimentaux quant à l'évaluation des risques zoonotiques relatifs aux agents des EST. Le singe-écureuil est par exemple parfaitement susceptible à des isolats issus de cervidés atteints de la maladie du déperissement chronique (Chronic Wasting Disease), (7/8 isolats en 33-53 mois), tandis que les macaques semblent plus résistants (absence de transmission 70 mois post-inoculation, [30]).

Le concept de diversité des agents des EST était relativement peu documenté à l'époque où la plupart de ces expériences ont été menées. Ces quelques études ne permettent pas d'évaluer de façon globale le potentiel zoonotique des agents des EST des ruminants considérés dans leur diversité.

Toutefois les données obtenues démontrent la capacité de certains isolats autres que l'ESB classique à se propager dans ces modèles.

4.5.2. Inoculation de souris transgéniques exprimant la PrP humaine

Les cas de MCJ sporadique ou familiale sont difficilement transmissibles aux lignées de souris conventionnelles [18,19,20]. En revanche les souris transgéniques exprimant la PrP humaine (présentant soit une méthionine soit une valine en position 129 du gène PrP) alors que le gène murin de la PrP a été déleté (dénommées ci-après tgHu) permettent de propager les agents responsables de ces maladies sans barrière d'espèce apparente [20,31,32,33]. Ces lignées « humanisées » constituent des modèles intéressants pour évaluer en première intention le potentiel zoonotique relatif des isolats d'EST animaux et/ou caractériser d'éventuelle similitude entre ces isolats et des cas humains d'EST. Chez la souris tgHu, l'ESB classique, dont le caractère zoonotique est avéré, peut être utilisé comme « étalon » afin d'évaluer le potentiel zoonotique d'autres EST animales.

La durée de vie relativement courte des souris (~2 ans) peut constituer un handicap pour ces

études de transmission compte tenu des durées d'incubation observées chez l'homme qui peuvent excéder plusieurs dizaines d'années. La surexpression de la PrP par certains modèles de souris TgHu permet de raccourcir dans une certaine mesure les durées d'incubation, sans toutefois permettre a priori de pallier complètement cet écueil.

Les isolats d'ESB classique sont transmissibles aux souris tgHu [20,34,35]. Toutefois, les durées d'incubation ainsi que les taux d'attaque inférieurs à 100% (malgré parfois la présence de PrP^{Sc} dans les tissus des souris) observés après inoculation intracérébrale de ces isolats suggèrent l'existence d'une barrière de transmission prononcée. Lors de passages itératifs, le phénotype biologique observé tend à se superposer à celui obtenu après transmission de cas de vMCJ [34], suggérant (s'il était besoin) un lien entre ces deux agents.

Récemment, la transmission d'isolats bovins « atypiques » de type ESB-L a été rapportée sur différents modèles de souris tgHu exprimant l'allèle Met129 [36,37]. Les durées d'incubation et les taux d'attaque observés avec l'ESB de type L (après inoculation intracérébrale) suggèrent une plus grande transmissibilité de ce type d'agent que de l'ESB classique. L'absence de réduction des durées d'incubation et la stabilité des caractères phénotypiques observés au cours des passages itératifs suggèrent une propagation de l'ESB de type L sans barrière d'espèce apparente sur la séquence PrP humaine.

Les essais de transmission d'autres cas d'ESB atypique bovin de type H aux souris tgHu sont demeurés à ce jour négatifs [34].

Ces travaux indiquent que :

- i) le type ESB-L bovin, même s'il ne peut être considéré comme un agent zoonotique avéré en l'état actuel des connaissances, présente un réel potentiel, probablement supérieur à celui de l'ESB classique pour le franchissement de la barrière d'espèce humaine,
- ii) la perméabilité de la barrière de transmission humaine (modélisée par les souris Tg Hu) dépend fortement de l'agent d'EST considéré (cf. les 3 prions bovins considérés (ESB classique, L et H.,
- iii) l'extrapolation de ce concept aux EST de petits ruminants, dont la diversité biologique exacte demeure inconnue mais semble supérieure à celle observée dans l'espèce bovine, doit inciter à une grande prudence.

A notre connaissance, peu d'expériences relatives à la transmission d'isolats naturels d'EST de petits ruminants aux modèles de souris tgHu ont été rapportées. Les seules expériences publiées semblent indiquer l'absence de transmission de quelques isolats de tremblante classique chez des souris chimères co-exprimant les PrP de souris et humaine [38]. Compte tenu de l'impact du chimérisme sur la propagation des isolats d'EST [39], ces résultats sont difficilement interprétables. Des études visant à caractériser la capacité de propagation d'un panel d'isolats d'EST de petits ruminants sur différents modèles de souris tgHu sont en cours. Les résultats de ces études devraient être disponibles d'ici 2 à 3 ans. Des premiers éléments de réponses issus de l'INRA de Jouy-en-Josas avec des isolats européens de tremblante atypique provenant de petits ruminants de différents génotypes ou de souris transgéniques exprimant la PrP ovine (allèle VRQ, [40]) suggèrent que cet agent présente une forte barrière de transmission vis-à-vis de la PrP humaine (allèle Met129 ; pas de signes d'EST au premier passage ni de PrP^{Sc}, deuxième passage en cours ; V. Beringue, H. Laude, communication personnelle⁸). La possibilité qu'un agent d'une EST puisse se propager dans une espèce hétérologue sans induire de signes cliniques [18,41,42] mais tout en gardant une dangerosité lors d'une transmission secondaire à une autre espèce sensible est un facteur supplémentaire illustrant notre faible compréhension de ces phénomènes et de la difficulté de leur modélisation.

4.6. Transmission d'EST humaines aux petits ruminants

Des expériences miroir d'essai de transmission d'isolats de MCJ aux petits ruminants ont été réalisées au début des années 80. En 1980, Hadlow et son équipe ont inoculé par voie intracérébrale des extraits de cerveau de deux patients atteints de MCJ sporadique, à 4 et 3

⁸ Ainsi que le rapport PNRA/GIS Prions Tremblante atypique

chèvres respectivement [43]. Quarante-trois mois post-inoculation, un animal de chaque groupe développa une pathologie indiscernable de la tremblante, suggérant la possibilité que la barrière d'espèce entre l'homme et la chèvre puisse être franchie, tout au moins dans les conditions expérimentales utilisées.

4.7. Evaluer *in vitro* la barrière de transmission PrP humaine / agents des EST de petits ruminants

Sur un plan conceptuel, alors que certains modèles cellulaires murins permettent de détecter de très faibles niveaux d'infectiosité de prion murin (absence de barrière d'espèce, [44]), ils montrent également une forte sélectivité quant à la nature des souches qu'ils peuvent propager sans que nous en comprenions les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle cellulaire exprimant la PrP humaine qui soit suffisamment permissif pour envisager la propagation efficace de prions d'origine humaine et a fortiori l'évaluation de la transmissibilité d'isolat d'EST d'origine animale [45,46,47].

Par conséquent il est très difficile d'envisager dans un futur proche le développement de modèles cellulaires pertinents pour évaluer la perméabilité des barrières de transmission.

La capacité de propagation d'un prion sur une séquence PrP hétérologue a également été abordée à l'aide de modèles acellulaires de conversion. Dans sa version la plus simplifiée, la méthode consiste à incuber de la PrP pathologique semi-purifiée avec de la PrP cellulaire radio-marquée [48]. L'efficacité de conversion est mesurée par quantification de la PrP anormale protéase-résistante radio-marquée. Des expériences de ce type ont suggéré que la PrP cellulaire humaine était difficilement convertible par de la PrP pathologique extraite de cerveaux de moutons infectés par la tremblante [49].

La mise au point récente d'une méthodologie dénommée PMCA (*Protein Misfolding Cyclic Amplification*, [50]) a permis de surmonter l'écueil relatif à la très faible efficacité de conversion des premiers systèmes acellulaires. Au cours de la PMCA, de faibles quantités de PrP pathologique sont mélangées à un large excès de PrP cellulaire. Le mélange est ensuite soumis à des cycles d'incubation et de sonication permettant de convertir une partie de la PrP cellulaire en PrP anormale. La quantification de la PrP anormale protéase-résistante amplifiée permet de mesurer l'efficacité de conversion. La capacité de conversion des variants polymorphiques (MM, MV, VV) de la PrP normale humaine par différents agents d'EST a très récemment été rapportée [51]. Aucun des 3 variants génotypiques ne semble (facilement) transconformable par de la PrP anormale extraite de cerveaux de mouton Suffolk homozygote pour l'allèle ARQ et infecté par la tremblante (agent ou souche non précisés). En revanche, l'ESB expérimentalement ovinisée (ARQ 2x) est capable de convertir les variants MM et MV de la PrP normale.

L'interprétation des résultats issus de ces approches de conversion *in vitro* doit se faire avec une grande prudence. En effet, il demeure impossible à l'heure actuelle de juger du caractère transposable des données obtenues par ces modèles à des systèmes biologiques complexes (animaux). La validation ou l'invalidation de ces approches pour la caractérisation de la capacité des prions à franchir les barrières de transmission nécessitera de nombreux travaux et sans doute plusieurs années.

4.8. Les différentes formes d'ESB et la difficulté de démontrer le caractère zoonotique d'une EST animale

L'exemple de l'ESB dans sa forme dite classique (ESB-C) illustre toute la difficulté de démontrer formellement le caractère zoonotique d'une maladie à prion. A ce jour, l'ESB-C est la seule EST animale dont le caractère zoonotique a été clairement établi. L'exposition alimentaire à cet agent des EST a été responsable à partir de 1995 de l'émergence du variant de la maladie de Creutzfeldt-

Jakob (vMCJ) chez l'homme. Toutefois, la démonstration de cette causalité relève d'une combinaison de circonstances tout à fait particulières :

1 – Malgré une exposition massive de la population humaine, en tout cas britannique, à des tissus infectés par l'agent de l'ESB classique, un nombre relativement restreint (de l'ordre de 200 cas) de vMCJ ont été identifiés à ce jour, dans le monde. D'un point de vue quantitatif, ces cas de vMCJ survenus n'ont pas eu d'impact significatif sur le niveau de prévalence globale de la MCJ (toutes formes confondues), y compris au Royaume-Uni. En d'autres termes, l'analyse de l'évolution de la prévalence des cas de MCJ (toutes formes confondues) n'aurait en aucun cas permis de déceler le caractère zoonotique de l'agent de l'ESB.

2 – Les fluctuations du nombre de cas réels de MCJ (toutes formes confondues) peuvent être très difficiles à distinguer de celles de la surveillance (par exemple au Royaume-Uni, avant même la découverte du vMCJ, on dénombrait 33 cas de MCJ confirmés en 1990 et 62 cas en 1994, pour respectivement 53 et 119 suspicieux, le ratio de confirmation proche entre ces deux années indiquant bien le défaut de sensibilité du dispositif de surveillance). Dans ce contexte, l'identification du vMCJ n'a été permise que du fait de l'apparition soudaine et sur une courte période, d'abord au Royaume-Uni, d'une série de cas aux caractéristiques très particulières (10 en 1996), les singularisant de l'ensemble des autres formes de MCJ (âge des sujets, tableau clinique, lésions neuropathologiques (présence de plaques dites « florides »)). Seule l'existence de telles particularités a permis de focaliser les investigations expérimentales sur de tels cas, en vue d'obtenir la caractérisation de l'agent infectieux impliqué. Notons que l'identification de ces cas a très certainement été favorisée par le contexte de l'épidootie de très grande ampleur de l'ESB classique, qui a pu contribuer à une plus grande vigilance vis-à-vis des maladies neuro-dégénératives chez l'homme.

3 – La transmission expérimentale, d'isolats bovin d'ESB-C et de cas de vMCJ à un panel de souris conventionnelles a permis d'identifier des signatures biologiques similaires (durée d'incubation dans chaque lignée, distribution des lésions de spongioses dans différents sites cérébraux), indiquant une probable identité des agents impliqués [16]. Il s'agit là d'une situation quasi « idéale » qui ne représente pas la norme : en effet la transmission d'autres isolats naturels d'EST à ces modèles de souris permet rarement une discrimination univoque du ou des agents présents. Si des doutes sur la validité de cette seule méthodologie peuvent se manifester, la conviction l'a emporté s'agissant du vMCJ, du fait des données épidémiologiques et des arguments issus d'autres études expérimentales, notamment la transmission au macaque [24] et aux souris transgéniques exprimant la PrP bovine [52] ou humaine [31].

Ces éléments permettent de comprendre pourquoi le caractère zoonotique d'une maladie à prion peut être difficile, sinon impossible à établir.

Un exemple concret de ce questionnement peut-être illustré en miroir par l'ESB atypique de type L pour laquelle il existe maintenant (cf. supra) des arguments expérimentaux convergents plaident pour une transmissibilité à l'homme notablement plus élevée que celle de l'ESB classique (virulence accrue par rapport à l'ESB après transmission au macaque [53] et à la souris transgénique humaine [34,37]), mais dans une situation épidémiologique caractérisée par un nombre de cas très limité (28 cas identifiés au 14 janvier 2010 en Europe, T. Baron, communication personnelle et [54]).

Il serait extrêmement difficile aujourd'hui de mettre en évidence un lien épidémiologique entre l'ESB de type L et une maladie à prion humaine. En effet, l'ESB-L chez les bovins est détectée dans les différents pays où elle est recherchée à une fréquence extrêmement faible, et a priori sa fréquence varierait peu dans le temps. Dans ce contexte, l'apparition ou l'augmentation de fréquence d'une maladie humaine dans une zone géographique déterminée apparaît difficile à détecter, ce qui supprime les principaux points d'analyse du lien épidémiologique. Une autre façon de procéder consisterait à étudier grâce à des approches épidémiologiques prospectives chez l'homme, l'effet d'une exposition au risque ESB-L, cela étant par ailleurs extrêmement difficile à mettre en œuvre :

1 – Aucune répercussion sur l'incidence de la MCJ n'est évidemment attendue, d'autant que l'apparition de ces cas rares chez les bovins est probablement relativement constante dans le temps, dans l'hypothèse probable d'une maladie « sporadique ». Si de tels cas étaient à l'origine

d'une maladie humaine, il serait cependant attendu que les cas humains liés à cette exposition disparaissent avec le retrait des matériels à risque spécifiés (MRS) de la consommation humaine, renforcé par les tests de dépistage ; cependant compte tenu de la période d'incubation probablement très longue et hétérogène lors d'une transmission alimentaire, ceci ne pourrait être constaté qu'après plusieurs décennies.

2 – Les caractéristiques d'une éventuelle maladie humaine liée à ces cas d'ESB de type L sont a priori inconnues, et pourraient ne pas être révélées par l'émergence soudaine d'une nouvelle entité pathologique chez l'homme. Cette maladie humaine devrait alors être recherchée au milieu du « bruit de fond » des maladies neuro-dégénératives humaines. Il n'est pas certain que de tels cas soient nécessairement identifiés parmi les cas suspects de MCJ tels qu'actuellement définis. En effet, il convient de ne pas considérer le paysage des maladies à prion humaines comme figé : l'identification récente [55], y compris en Europe [56], de nouvelles formes de maladies à prion (dites « prionopathies sensibles aux protéases ») ne réunissant pas nécessairement tous les critères de suspicion de la MCJ, en est une illustration.

3 - Contrairement à l'ESB-C, il n'existe pas à ce jour un socle de connaissances permettant d'établir avec une certaine confiance des similitudes entre les agents responsables de l'ESB de type L et une forme de maladie à prion humaine. Au contraire, si l'on considère les données actuelles obtenues par transmission à un très large panel de modèles expérimentaux (souris conventionnelles, hamster, campagnol, souris transgéniques exprimant des PrP bovine, ovine ou humaine), il apparaît une complexité déconcertante de(s) l'agent(s) infectieux impliqué(s) dans cette maladie bovine, qui rend l'interprétation des données expérimentales pour le moment très difficile.

5. CONCLUSION

L'Afssa considère, qu'aucun lien épidémiologique formel entre EST animales et EST humaines n'a pu être établi à ce jour, à l'exception de celui entre vMJC et ESB classique. Le risque zoonotique de l'ESB a pu être démontré en raison d'une combinaison de circonstances favorables (émergence soudaine d'une nouvelle maladie animale, puis d'une nouvelle maladie humaine, toutes deux associées à des caractéristiques phénotypiques uniques) et de nombreux travaux ; circonstances et travaux dont on ne sait pas si ils pourront être réunis pour d'autres agents des EST.

Les études épidémiologiques visant à établir un lien entre la survenue de cas de MCJ et l'exposition aux animaux ou produits animaux ont une faible puissance. Ceci tient à la combinaison de plusieurs paramètres dont les principaux sont : les limites et les biais possibles des dispositifs de surveillance ou de détection, la très faible prévalence de ces maladies, l'imprécision de la mesure de l'exposition (notamment alimentaire) liée à la très longue période d'incubation, la méconnaissance des paramètres génétiques de susceptibilité, la difficulté de prendre en compte une exposition spécifique à des sous populations humaines en fonction des activités professionnelles ou de loisir, la diversité des formes d'EST à la fois chez l'animal et l'homme.

Cependant, une relation faible mais récurrente entre EST humaines et exposition aux animaux et/ou aux produits animaux apparaît dans certaines études et pourrait indiquer un lien épidémiologique entre EST animales et humaines, sans pouvoir identifier le type d'EST et la pathologie humaine.

En l'état actuel des connaissances et des méthodologies, l'évaluation du risque zoonotique associé aux agents des EST ne peut se fonder que sur l'examen d'un faisceau d'éléments indirects, dont aucun pris individuellement ne saurait constituer une preuve formelle pour rejeter ou affirmer qu'un agent EST animal a la capacité de se transmettre à l'homme. Parmi ces différents éléments, la capacité d'un agent EST à se propager chez des primates ou à des animaux transgéniques pour le gène codant pour la protéine PrP humaine paraît le plus pertinent.

Ainsi, l'Afssa réaffirme qu'il n'est pas scientifiquement pertinent de considérer qu'aucun agent animal des EST, autre que l'ESB classique, ne présente de risque zoonotique. La récente mise en évidence de la capacité de l'ESB-L à se propager plus efficacement que l'ESB classique dans des modèles expérimentaux de primates et de souris transgéniques « humanisées » illustre clairement

l'existence d'un risque zoonotique potentiel pour cette nouvelle souche. Ces incertitudes justifient le maintien de mesures de précaution, visant à limiter l'exposition humaine aux agents des EST circulant dans les populations animales.

Le directeur général

MARC MORTUREUX

MOTS-CLES

Mots clés : ESST, petits ruminants, tremblante, risque zoonotique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Eloit M, Adjou K, Couplier M, Fontaine JJ, Hamel R, et al. (2005) BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec* 156: 523-524.
2. Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, Baron T (2004) Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep* 5: 110-115.
3. Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, et al. (2004) Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3065-3070.
4. Fediaevsky A, Tongue SC, Noremark M, Calavas D, Ru G, et al. (2008) A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Vet Res* 4: 19.
5. Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, Budka H, Jarius C, et al. (2005) Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology* 64: 1586-1591.
6. Masters CL, Harris JO, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr., Bernoulli C, et al. (1979) Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Ann Neurol* 5: 177-188.
7. Chatelain J, Cathala F, Brown P, Raharison S, Court L, et al. (1981) Epidemiologic comparisons between Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie in France during the 12-year period 1968-1979. *Journal of the Neurological Sciences* 51: 329-337.
8. van Duijn CM, Delasnerie-Lauprêtre N, Masullo C, Zerr I, de Silva R, et al. (1998) Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-95. *The Lancet* 351: 1081-1085.
9. Ruegger J, Stoeck K, Amsler L, Blaettler T, Zwahlen M, et al. (2009) A case-control study of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in Switzerland: analysis of potential risk factors with regard to an increased CJD incidence in the years 2001-2004. *BMC Public Health* 14: 18.
10. Cocco PL, Caperna A, Vinci F (2003) Occupational risk factors for the sporadic form of Creutzfeldt-Jakob disease. *Med Lav* 94: 353-363.
11. Linsell L, Cousens S, Smith P, Knight R, Zeidler M, et al. (2004) A case-control study of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: analysis of clustering. *Neurology* 63: 2077-2083.
12. Huillard d'Aignaux J, Cousens SN, Delasnerie-Lauprêtre N, Brandel JP, Salomon D, et al. (2002) Analysis of the geographical distribution of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in France between 1992 and 1998. *International Journal of Epidemiology* 31: 490-495.
13. Cousens SN, Everington D, Ward HJT, Huillard J, Will RG, et al. (2003) The geographical distribution of variant Creutzfeldt-Jakob disease cases in the UK: what can we learn from it? *Statistical methods in medical research* 12: 235-246.
14. Scott MR, Groth D, Tatzelt J, Torchia M, Tremblay P, et al. (1997) Propagation of prion strains through specific conformers of the prion protein. *J Virol* 71: 9032-9044.
15. Bruce ME (2003) TSE strain variation. *Br Med Bull* 66: 99-108.
16. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, et al. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 498-501.
17. Le Dur A, Beringue V, Andreoletti O, Reine F, Lai TL, et al. (2005) A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16031-16036.
18. Nonno R, Di Bari MA, Cardone F, Vaccari G, Fazzi P, et al. (2006) Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog* 2: e12.
19. Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC (1973) Experimental subacute spongiform virus encephalopathies in primates and other laboratory animals. *Science* 182: 67-68.

20. Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, et al. (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389: 448-450, 526.
21. Lasmezas CI, Fournier JG, Nouvel V, Boe H, Marce D, et al. (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: 4142-4147.
22. Wadsworth JD, Collinge J (2007) Update on human prion disease. *Biochim Biophys Acta* 1772: 598-609.
23. Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr. (1971) Transmission of two subacute spongiform encephalopathies of man (Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease) to new world monkeys. *Nature* 230: 588-591.
24. Lasmezas CI, Deslys JP, Demaismay R, Adjou KT, Lamoury F, et al. (1996) BSE transmission to macaques. *Nature* 381: 743-744.
25. Herzog C, Riviere J, Lescoutra-Etchegaray N, Charbonnier A, Leblanc V, et al. (2005) PrPTSE distribution in a primate model of variant, sporadic, and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* 79: 14339-14345.
26. Lasmezas CI, Comoy E, Hawkins S, Herzog C, Mouthon F, et al. (2005) Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates. *Lancet* 365: 781-783.
27. Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC (1972) Transmission of scrapie to the cynomolgus monkey (Macaca fascicularis). *Nature* 236: 73-74.
28. Gibbs CJ, Jr., Amyx HL, Bacote A, Masters CL, Gajdusek DC (1980) Oral transmission of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie to nonhuman primates. *J Infect Dis* 142: 205-208.
29. Baker HF, Ridley RM, Wells GA (1993) Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset. *Vet Rec* 132: 403-406.
30. Race B, Meade-White KD, Miller MW, Barbian KD, Rubenstein R, et al. (2009) Susceptibilities of nonhuman primates to chronic wasting disease. *Emerg Infect Dis* 15: 1366-1376.
31. Asante EA, Linehan JM, Desbruslais M, Joiner S, Gowland I, et al. (2002) BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *Embo J* 21: 6358-6366.
32. Beringue V, Le Dur A, Tixador P, Reine F, Lepourry L, et al. (2008) Prominent and Persistent Extraneuronal Infection in Human PrP Transgenic Mice Infected with Variant CJD. *PLoS ONE* 3: e1419.
33. Kong Q, Huang S, Zou W, Vanegas D, Wang M, et al. (2005) Chronic wasting disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models. *J Neurosci* 25: 7944-7949.
34. Beringue V, Herzog L, Reine F, Le Dur A, Casalone C, et al. (2008) Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein. *Emerg Infect Dis* 14: 1898-1901.
35. Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383: 685-690.
36. Beringue V, Viloteau JL, Laude H (2008) Prion agent diversity and species barrier. *Vet Res* 39: 47.
37. Kong Q, Zheng M, Casalone C, Qing L, Huang S, et al. (2008) Evaluation of the Human Transmission Risk of an Atypical Bovine Spongiform Encephalopathy Prion Strain. *J Virol*.
38. Gombojav A, Shimauchi I, Horiuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M, et al. (2003) Susceptibility of transgenic mice expressing chimeric sheep, bovine and human PrP genes to sheep scrapie. *J Vet Med Sci* 65: 341-347.
39. Collinge J, Palmer MS, Sidle KC, Hill AF, Gowland I, et al. (1995) Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature* 378: 779-783.
40. Viloteau JL, Soulier S, Essalmani R, Stinnakre MG, Vaiman D, et al. (2001) Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J Virol* 75: 5977-5984.
41. Hill AF, Joiner S, Linehan J, Desbruslais M, Lantos PL, et al. (2000) Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10248-10253.
42. Race R, Chesebro B (1998) Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature* 392: 770.

43. Hadlow WJ, Prusiner SB, Kennedy RC, Race RE (1980) Brain tissue from persons dying of Creutzfeldt-Jakob disease causes scrapie-like encephalopathy in goats. *Ann Neurol* 8: 628-632.
44. Mahal SP, Demczyk CA, Smith EW, Jr., Klohn PC, Weissmann C (2008) Assaying prions in cell culture: the standard scrapie cell assay (SSCA) and the scrapie cell assay in end point format (SCEPA). *Methods Mol Biol* 459: 49-68.
45. Cronier S, Beringue V, Bellon A, Peyrin JM, Laude H (2007) Prion strain- and species-dependent effects of antiprion molecules in primary neuronal cultures. *J Virol* 81: 13794-13800.
46. Vilette D (2008) Cell models of prion infection. *Vet Res* 39: 10.
47. Crozet C, Beranger F, Lehmann S (2008) Cellular pathogenesis in prion diseases. *Vet Res* 39: 44.
48. Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, et al. (1995) Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 375: 698-700.
49. Raymond GJ, Hope J, Kocisko DA, Priola SA, Raymond LD, et al. (1997) Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature* 388: 285-288.
50. Castilla J, Saa P, Morales R, Abid K, Maundrell K, et al. (2006) Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods Enzymol* 412: 3-21.
51. Jones M, Wight D, Barron R, Jeffrey M, Manson J, et al. (2009) Molecular model of prion transmission to humans. *Emerg Infect Dis* 15: 2013-2016.
52. Scott MR, Will R, Ironside J, Nguyen HO, Tremblay P, et al. (1999) Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 15137-15142.
53. Comoy EE, Casalone C, Lescoutra-Etchegaray N, Zanusso G, Freire S, et al. (2008) Atypical BSE (BASE) transmitted from asymptomatic aging cattle to a primate. *PLoS One* 3: e3017.
54. Biacabe AG, Mornignat E, Vulin J, Calavas D, Baron TG (2008) Atypical bovine spongiform encephalopathies, France, 2001-2007. *Emerg Infect Dis* 14: 298-300.
55. Gambetti P, Dong Z, Yuan J, Xiao X, Zheng M, et al. (2008) A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol* 63: 697-708.
56. Head MW, Knight R, Zeidler M, Yull H, Barlow A, et al. (2009) A case of protease sensitive prionopathy in a patient in the UK. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35: 628-632.