Direction Générale
de l'Alimentation

Direction Générale
de la concurrence, de la
Consommation et de la
Répression des Fraudes

Direction Générale
de la Santé

PARIS, le 26 avril 1996.

Docteur,

En tant que responsables des services de l'Etat chargés de proposer au Gouvernement les mesures à prendre pour prévenir les risques liés à l'encéphalopathie spongiforme bovine, et d'effectuer les contrôles nécessaires, nous souhaiterions que le comité de veille que vous avez bien voulu accepter de présider, outre l'organisation des travaux de recherche, effectue une analyse du risque selon les méthodes intematlonalement reconnues, de manière à ce que le Gouvernement puisse prendre ses décisions en toute connaissance de causes.

Sans préjuger aucunement de la farine que le comité voudra bien donner à ses réponses, nous aimerions en particulier lui poser immédiatement les questions figurant sur la liste ci-jointe.

En vous remerciant vivement de votre aide, nous vous prions d'agréer, Docteur, l'expression de notre considération distinguée.

Le Directeur Général,

Philippe GUERIN

Le Directeur Général,

Christian BABUSIAUX

Le Directeur Général,

Jean-François GIRARD

Monsieur le Docteur Dominique DORMONT
Service de Santé des Armées CEA
Laboratoire de neuro-virologie
60-68 avenue du Général Leclerc
82265 Fontenay- aux-Roses

La documentation Française : \(Analyse du risque de transmission\) / Comité... sur les encéphalopathies subaigues spongiformes transmissibles

I. QUESTIONS GÉNÉRALES.

1) Mode de transmission du prion.

Quelles sont les certitudes ?

Les agents transmissibles non conventionnels (ATNC) ou prions sont transmissibles expérimentalement au sein de la même espèce et entre espèces différentes. Ces faits sont très bien établis et documentés par de nombreuses publications scientifiques (cf : tableau ci dessous).

	MCJ	TREMBLANTE	ESB
Espèce cible	**Homme**	**Ovins et caprins**	**Bovins**
Forme naturelle spontanée	Sporadique Familiale, Iatrogène	Enzootique (région, troupeaux) ou sporadique (troupeaux)	Anazootique
Origine dans l'espèce cible - Contamination directe (sujet à sujet)	non	**oui +++**	non ou extrêmement rare
- Contamination indirecte (par vecteur ou environnement)	non	Possible mais rare	non
- Origine alimentaire	non	non prouvée	**oui +++** (farines de viandes et d'os)
Transmission naturelle à d'autres espèces	non	ovins<-> caprins (rare ovins <-> visons (?USA) ovins <-> bovins (? USA)	**oui** Zoo du Royaume Uni: -4 espèces de bovinae - 3 espèces d'hippotraginae - 4 espèces de felidae et 70 chats domestiques (69 RU et 1 Norvège)
Transmission iatrogène au sein de la même espèce	oui Hormone de croissance extractive, neurochirurgie	oui (rare chez ovins)	non (en l'état actuel des connaissances)
Transmission expérimentale en dehors de l'espèce cible	Primates (90-95 %) : singe araignée, ouistiti, chimpanzé, capucin, vervet, rhésus, singe écureuil. hamster (11 %), chat (43%), chèvre (9%) souris (10%) cobaye, rat.	Souris , hamster, ovins<-> caprins visons (certaines souches seulement) Ouistiti (inoculation i.c., incubation 38-42 mois)	Vison (IC, per os) Souris (IC, per os) Porc (IC) Caprins (IC, per os) Ovins (IC, per os) Ouistiti (inoculation i.c., incubation 46-47 mois)

La documentation Française : \(Analyse du risque de transmission\) / Comité... sur les encéphalopathies subaigues spongiformes transmissibles

Cette possibilité de transmission au sein de la même espèce est confirmée par les accidents iatrogènes observés en médecine humaine et vétérinaire; il faut toutefois insister sur le fait, qu'à ce jour, ces accidents iatrogènes ont toujours impliqué le système nerveux central et la cornée comme organe contaminant.

Dans les modèles expérimentaux établis chez le rongeur à partir des agents ovins et humains, les voies d'infection parentérales sont plus efficaces que la voie orale, la voie intra-cérébrale étant, de loin, la plus contaminante. Cependant, au cours des transmissions primaires à partir des maladies naturelles, ces données peuvent ne pas se vérifier, et les voies périphériques devenir aussi voire plus efficaces que la voie intra-cérébrale.

Enfin, il faut souligner que la voie d'introduction dans l'organisme d'un agent transmissible, quel qu'il soit, sélectionne les variants les plus aptes à l'infection par la voie considérée; la conséquence théorique est que l'infection des bovins par l'agent de l'ESB au travers de la consommation de farines de viandes et d'os a sélectionné très probablement un ATNC particulièrement apte à l'infection par voie orale.

L'efficacité de transmission entre deux espèces différentes dépend de la force de la barrière d'espèce; les données de la biologie moléculaire et de la transgénèse démontrent qu'un des supports essentiels de la barrière d'espèce est le gène codant pour la protéine PrP. En conséquence, plus les PrP du donneur et du receveur seront génétiquement proches, plus la transmission interspécifique sera efficace. Néanmoins, la PrP ne pourrait, à elle seule, expliquer le phénomène de barrière d'espèce : d'une part, les travaux récents de S.B. Prusiner indiquent clairement la participation d'au moins une autre protéine, et d'autre part, les mécanismes de la barrière d'espèce lors de l'infection par voie périphérique sont encore loin d'être connus.

En conséquence, le rôle joué par la PrP dans la transmission des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) est central : la PrP de l'individu normal (PrP cellulaire ou PrP-c) règle la susceptibilité individuelle à l'infection par les ATNC, conditionne le phénomène de barrière d'espèce, et la PrP qui s'accumule chez l'individu infecté (PrP résistante à la protéinase K, PrP-res) est très probablement intimement associée à l'agent, voire l'un de ses composants essentiels ou son composant unique.

L'interdiction d'emploi de farine animale dans l'alimentation des bovins a fait chuter le nombre d'animaux malades en Grande Bretagne. Néanmoins, on observe au Royaume Uni des cas chez des bovins nés longtemps après l'utilisation des farines de viandes et d'os (FVO), quelle interprétation fait-on de ce cas déclarés ? Quel degré de certitude a-t-on que les farines de viandes et d'os constituent le seul facteur de transmission ?

Le nombre de bovins cliniquement atteints d'encéphalopathie bovine spongiforme (ESB) au Royaume Uni nés après les deux interdictions successives d'emploi des farines animales est de 26 293 pour les bovins nés après juillet 1988, date de la première interdiction (au 29/03/96; source MAFF) :

- nombre total de bovins atteints nés après la première interdiction (juillet 1988) : 26293

- nombre total de bovins atteints nés après la seconde interdiction (septembre 1990) : 1159 pour les bovins nés après le 31/12/1990 dont 1098 nés en 1991, 60 nés en 1992, et 1 né en juin 1993; ces résultats sont à prendre en considération en fonction de la durée de la période d'incubation moyenne de l'ESB (5 ans).

La seconde interdiction apparaît donc comme la seule vraiment efficace.

La documentation Française : \(Analyse du risque de transmission\) / Comité... sur les encéphalopathies subaigues spongiformes transmissibles

Les résultats actuels ne permettent pas de conclure à l'absence totale de transmission périnatale, mais l'immense majorité des cas est due à la contamination de l'alimentation. L'interdiction effective des FVO est donc la mesure essentielle au tarissement de la source animale.

Les autorités du Royaume Uni indiquent qu'en réalité les mesures ne sont pas totalement efficaces avant la date du 25 avril 1996 (interdiction totale de toute farine). S'il existe une autre source, en particulier une contamination pseudo-verticale, son importance est probablement très faible, mais peut cependant poser question sur la persistance d'un petit nombre de cas au delà des années 2001/2002 sur le territoire britannique et la pérennisation de la maladie dans ce pays. S'il existe, ce phénomène est d'autant plus probable (par comparaison avec la tremblante) que le niveau de contamination des troupeaux est élevé; il faudrait donc prendre dès maintenant des mesures, en particulier dans les troupeaux où l'incidence est significativement supérieure à la moyenne du Royaume Uni, si l'on veut en prévenir les effets.

Pour les pays où l'incidence de la maladie est sporadique et où la source (FVO) est contrôlée, ce type de mécanisme ne peut être significatif dans le devenir de la maladie et dans la mise en oeuvre d'une plan de lutte sur une population de bovins.

Doit-on considérer l'hypothèse d'une transmission horizontale ou verticale comme un paramètre significatif dans la mise en oeuvre d'un plan de lutte sur une population de bovins.

Cas des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) en général.

- La tremblante. D'une façon plus générale que pour la question posée, on peut rappeler que le seul cas documenté d'ESST où il existe une transmission horizontale est la tremblante du mouton. On sait, en effet, que les placentas peuvent être contaminants. Ces faits n'ont cependant pas empêché des pays comme l'Australie et la Nouvelle Zélande d'annoncer son éradication. Inversement, la plupart des pays européens, dont l'Islande, et les États Unis ne sont pas parvenus à ce résultat.

On sait maintenant que le modèle de tremblante ne permet pas d'expliquer complètement la maladie bovine.

- Les autres ESST. D'une façon plus anecdotique, on connaît des cas de transmission horizontale des ESST du vison d'élevage, par cannibalisme direct. Comme il s'agit de carnivores, le schéma n'est pas exploitable dans l'analyse de l'ESB. Le Kuru, ESST néo-guinéenne, constitue, lui aussi, un exemple de transmission horizontale au travers de l'exposition à l'agent lors des rites cannibales. Enfin, un cas de transmission horizontale a été rapporté chez une antilope africaine du jardin zoologique de Londres; ce cas est pour l'instant unique et ressort plutôt du domaine de la curiosité épidémiologique. On sait que les mammifères sauvages élevés en captivité peuvent développer des maladies rarement observées dans la nature (cf Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties, num spécial, M.E. Fowler ed, 1996 : Wildlife Husnandry and Diseases).

-L'encéphalopathie bovine spongiforme.

Dans le cas des bovins, on ne peut répondre actuellement à cette question car un seul pays dispose actuellement de suffisamment de données pour que l'on puisse tenter de tester l'hypothèse de la transmission horizontale et celle de la transmission verticale : il s'agit du Royaurr.e Uni. Les données ne sont cependant connues qu'indirectement, par le canal des publications scientifiques et des annonces officielles. Toutes celles diffusées à ce jour ne rapportent pas de lien entre animaux atteints, alors qu'elles ne peuvent jamais exclure la

La documentation Française : \(Analyse du risque de transmission\) / Comité... sur les encéphalopathies subaigues spongiformes transmissibles

contamination par les farines de viande. On sait maintenant que l'arrêt effectif et généralisé de leur distribution est plutôt intervenu en 1996 qu'en 1988, année de la première interdiction réglementaire. L'usage réel des stocks de farines contaminées ne nous est pas encore connu (taux de renouvellement des stocks, quantités distribuées selon les performances des animaux, rations selon les classes d'age...).

L'article le plus complet a été publié dans "Veterinary record" (1995,136,312-318) et compare 447 cas à 1294 témoins (encore témoins au moment où l'article a été écrit, c'est à dire dans le courant du deuxième semestre 1994, pour des animaux nés de fin 1988 à mi 1989, bien sûr). On sait, par ailleurs, que le maximum d'incidence apparaît entre 4 et 6 ans pour des animaux contaminés l'année de leur naissance. Le délai d'observation est encore un peu court, et le risque alimentaire doit complètement masquer tout autre risque.

Les cas et les témoins proviennent tous des mêmes fermes, et donc devraient être soumis aux mêmes sources de contamination, dont les farines, à ces dates. Chez les cas, 25 de leurs mères ont présenté une ESB, contre 56 chez les témoins. Ces chiffres donnent un odds ratio de 1,30 et un X2 de Mantel-Haenszel égal à 1,198 non significatif au seuil de 5 % (valeur du X2 : 3,481). Si le risque de transmission autre qu'alimentaire existe chez les bovins, il est vraiment très faible et entièrement occulté par l'alimentation.

Si on applique le modèle de la tremblante, il est possible d'avancer que, même au Royaume Uni, il sera possible de contrôler la maladie bovine sans prendre en compte cette éventualité. Les premières prévisions chiffrées publiées dans Nature (9 mai 1996) vont dans ce sens. Cependant, cet article ne raisonne que sur les animaux alors que le risque d'exposition est fortement lié aux troupeaux, car les animaux ne sont pas nourris au hasard. Il n'est cependant pas possible de refaire la modélisation, car les données brutes ne figurent pas dans l'article.

Propositions : pour la situation française, très nettement différente de la situation britannique, on pourrait suggérer de rechercher et de conserver les descendants des quelques cas enregistrés, afin de pouvoir en assurer le suivi. Ceci permettrait de connaître leur devenir dans un contexte épidémiologique autre. Les chiffres sont faibles; la puissance statistique de l'expérience restera donc limitée, mais on pourrait suggérer une démarche comparable à d'autres pays proches épidémiologiquement afin d'augmenter la puissance de cette étude prospective.

Quelles sont les études menées pour confirmer ou infirmer l'hypothèse de transmission de l'ESB à l'homme. Dans quel délai peut - on espérer avoir une réponse à cette question ?

Le monomorphisme des lésions neuropathologiques des 12 patients atteints de la nouvelle forme clinique de MCJ suggère une origine commune, et donc une souche d'agent identique. Il est actuellement possible de typer les souches d'ATNC.

Une première méthodologie consiste à adapter la souche "sauvage" à un certain nombre de lignées de souris syngéniques (au moins 3) et à mesurer la durée de la période d'incubation, la durée de la phase clinique, la répartition des lésions neuropathologiques (il existe des méthodes de quantification de la spongiose), et à réaliser la cartographie de l'accumulation de la PrP-res dans le système nerveux central. Chez une lignée de souris donnée, pour une quantité d'agent identique et une voie d'introduction données, ces paramètres sont spécifiques de la souche initiale.

Les chercheurs britanniques ont typé les souches d'ESB et les souches de tremblante naturelle. Si plus de 14 souches différentes de tremblante naturelle ont été déterminées,

La documentation Française : \(Analyse du risque de transmission\) / Comité... sur les encéphalopathies subaigues spongiformes transmissibles

toutes les expérimentations menées à ce jour concluent à l'existence d'une souche unique d'ESB; cette souche a été retrouvée chez les bovins suisses atteints d'ESB, et les mêmes caractéristiques ont été mises en évidence chez les chats infectés par l'agent de l'ESF, ce qui suggère fortement l'origine bovine à l'ESF. En conséquence, et compte tenu du caractère unique de la souche d'ESB qui a entraîné l'épidémie actuelle chez les bovins britanniques, la caractérisation des souches d'agent ayant infecté les 13 patients est la seule voie permettant de conforter ou d'infirmer l'hypothèse de la transmission de la maladie bovine à l'homme. Toutefois, la transmission inter-spécifique "homme - souris" n'est pas toujours efficace en raison de la force de la barrière d'espèce entre ces deux espèces; seules 10 à 20 % des souches humaines sont transmissibles à la souris. Ces contraintes expérimentales limitent cette approche méthodologique. On peut supposer que ces expériences sont d'ores et déjà en cours en Grande Bretagne, les chercheurs britanniques étant leaders mondiaux dans le domaine du typage des souches.

Cette approche expérimentale demandera au moins deux ans de travail, compte tenu des passages chez l'animal qu'elle nécessite. Cette méthodologie peut être appliquée immédiatement en France à partir du cas français, dans la mesure où du matériel cérébral est disponible sous une forme compatible avec son utilisation chez l'animal (de préférence congélation sans fixation préalable).

La transmission au primate des souches peut aussi apporter des informations intéressantes, compte tenu de la proximité génétique de l'homme et des primates sensibles à l'agent de la MCJ. Cependant, la durée d'incubation est de l'ordre de plusieurs années, et les informations apportées par le modèle "rongeur" devraient permettre de conclure avant la fin de l'expérience de transmission au primate. Toutefois, il faut garder en mémoire le fait que la transmission homme souris n'est pas efficace à 100 %, et peut parfois être impossible; en conséquence, la menée en parallèle des expériences "singes" et "souris" apporterait une sécurité supplémentaire. Les laboratoires français ont une bonne expérience de l'infection expérimentale du primate par les ATNC, et ils ont déjà effectué la transmission expérimentale de l'ESB au macaque.

Une autre approche de l'évaluation du risque pour l'homme de l'ESB consiste en l'utilisation de souris transgéniques exprimant la PrP humaine; elle peut constituer un élément de réponse à la question posée. Au Royaume Uni, J. Collinge et coll ont réalisé des animaux exprimant la PrP normale humaine; ces animaux sont infectables par l'agent de la MCJ. Ils ont été inoculés par l'agent de l'ESB depuis plus de 300 jours, sans présenter à ce jour de signes cliniques ou biologiques évocateurs d'ESB. Le passage des souches de MCJ dans ces modèles transgéniques peut demander de 200 à 400 jours; cent jours au moins sont encore nécessaires avant de conclure à l'absence de transmission massive (on admet, en général, un résultat négatif lorsque les animaux survivent sans anomalies cliniques et biologiques un temps égal à 3 fois la période d'incubation des témoins positifs). Il faut toutefois noter que là PrP humaine utilisée chez ces animaux transgéniques porte un résidu valine en 129, alors que la PrP bovine présente une méthionine; or, on connaît l'importance de l'homologie entre PrP infectante et PrP du receveur au niveau du codon 129 dans la susceptibilité individuelle et la durée de la période d'incubation. Cette différence entre les 2 PrP peut minimiser l'efficacité de l'outil transgénique dans la détection d'un passage "bovin-homme". Enfin, à la connaissance du Comité, ces inoculations ont été faites par voie parentérale et intra-cérébrale et non par voie orale.

La combinaison des études menées chez les animaux transgéniques et celles effectuées avec les animaux syngéniques devrait permettre de disposer d'informations dans les deux années à venir. Il faut cependant rappeler que, dans ces deux approches expérimentales, seuls les résultats positifs permettront de conclure formellement.

La documentation Française : \(Analyse du risque de transmission\) / Comité... sur les encéphalopathies subaigues spongiformes transmissibles

Quel rôle jouent les variations observées sur le codon 129 du gène de la PrP ?

Le gène humain de la PrP *(PRNP)* est polymorphe et peut encoder une méthionine (M) ou une valine (V). les fréquences des allèles M et V sont respectivement de 0,63 et 0,37 chez les caucasiens. La distribution des génotypes au codon 129 est la suivante : MM 40 %, MV 50 %, et VV 10 %. L'importance du polymorphisme au codon 129 a été soulignée :

- dans les formes familiales (maladies de Creutzfeldt-Jakob familiales, syndrome de Gertsmann-Sträussler-Scheinker, insomnie fatale familiale). Le codon 129 de l'allèle muté détermine l'expression phénotypique de la forme associée à la mutation D178N, Maladie de Creutzfeldt-Jakob (129V-178N) ou insomnie fatale familiale (129M-178N). Dans un certain nombre de formes liées à des mutations (insertions, P102L, D178N), la nature du codon 129 porté par l'allèle non muté influence également l'âge d'apparition et/ou la durée de la maladie (l'âge de survenue plus tardif et une durée d'évolution plus longue s'observent chez les hétérozygotes 129 MV).

- dans la forme sporadique de la MCJ. La distribution des génotypes au codon 129 est différente de celle observée dans la population générale : MM 76 %, MV 14 % et VV 10 % (n = 124 cas français étudiés entre 1992 et 1995). Ces études conduites sur un échantillon important de patients font apparaître un excès significatif de l'allèle 129met (p = 0,0001 au lieu de p = 0,10 dans l'étude princeps de J. Collinge, dont les effectifs étaient moins importants). Le facteur de risque relatif attaché au génotype 129 met/met par rapport aux autres génotypes est de 4,66 (IC 95 % : 2,59-8,38). Des conclusions similaires sont rapportées en Italie par Salvatore et al (1994, Hum. Genet, 94, 375-379). L'homozygotie MM est un facteur de risque de la MCJ sporadique alors que l'hétérozygotie MV apparaît être un facteur partiellement protecteur.

- dans les formes iatrogènes de la MCJ. Que la contamination soit d'origine périphérique ou centrale, la distribution génotypique est également différente et présente un large excès d'homozygotes MM et VV (> 90 %) parmi les malades. L'hétérozygotie MV paraît associée à une sensibilité réduite à la contamination.

Les données disponibles concernant le rôle du codon 129 dans la transmission des ATNC/prions sont seulement descriptives et résultent d'études statistiques d'association. Les bases moléculaires rendant compte du rôle du codon 129 ne sont pas connues. Les hypothèses suivantes peuvent être envisagées :

- PrP 129M aurait une probabilité de changement conformationnel spontané en forme pathologique plus élevée que PrP129V.

- l'homozygotie au codon 129 favoriserait l'interaction entre PrP normales et pathologiques préludant au changement conformationnel.

- l'effet partiellement protecteur de l'hétérozygotie au codon 129 traduirait l'existence d'un seuil de concentration neurotoxique de la PrP pathologique nécessaire à atteindre avant que la maladie ne s'exprime.

2) Risque de transmission à l'homme : En ce qui concerne le risque de transmission d'encéphalopathie spongiforme à d'autres espèces animales, voire à l'homme, le problème se pose-t-il de la même façon pour l'ESB et la tremblante ?

Le risque de transmission à d'autres espèces (animaux et homme) diffère entre ESB et tremblante : l'ESB a été décrite récemment alors que la tremblante est connue depuis plus de 200 ans.

L'ensemble des études effectuées à ce jour n'a jamais permis de montrer un lien même hypothétique entre maladie ovine et maladies humaines neurodégénératives. Par exemple, entre 1973 et 1989, 24 enquêtes sur la répartition de la MCJ et des facteurs de risque associés ont été recensées, et aucune d'entre elle n'a permis de suggérer un lien entre tremblante et MCJ.

De plus, les professions exposées (vétérinaires, bergers, fromagers, etc..) ne développement pas plus de maladies neurodégénératives que les autres classes de la population. Enfin, l'Australie et la Nouvelle Zélande sont des pays indemnes de tremblante du mouton : l'incidence de la MCJ y est la même que dans les pays où la tremblante sévit à l'état endémique.

On peut donc estimer que les risques de transmission de la tremblante à l'homme ne sont que théoriques. Dans l'état actuel des connaissances, il n'y a donc aucun argument qui puise soutenir l'hypothèse de la transmission de la tremblante à l'homme, et le risque, s'il existe, est probablement très faible.

Contrairement à la tremblante connue depuis plus de 2 siècles, la maladie bovine est de description très récente; son caractère pseudo-épidémique au Royaume Uni et le rôle des farines de viandes et d'os dans la propagation de l'agent indiquent que l'agent est particulièrement adapté à la contamination par voie orale.

Quelle que soit l'origine de l'ESB, les souches responsables présentent des caractéristiques différentes de celles de la tremblante. Compte tenu de l'absence de recul, elles doivent donc être considérées comme potentiellement transmissibles pour l'homme, dans l'attente de données scientifiques pertinentes pour l'appréciation de l'aptitude de l'agent causal à franchir la barrière d'espèce bovin-homme.

Le problème posé par l'ESB est donc nouveau et doit être examiné tout particulièrement car son spectre de transmissibilité naturelle et expérimentale est plus important que celui de la tremblante (cf tableau ci-après).

	MCJ	TREMBLANTE	ESB
Espèce cible	**Homme**	**Ovins et caprins**	**Bovins**
Forme naturelle spontanée	Sporadique Familiale, Iatrogène	Enzootique (région, troupeaux) ou sporadique (troupeaux)	Anazootique
Origine dans l'espèce cible - Contamination directe (sujet à sujet) - Contamination indirecte (par vecteur ou environnement) - Origine alimentaire	non non non	**oui +++** Possible mais rare non prouvée	non ou extrêmement rare non **oui +++** (farines de viandes et d'os)
Transmission naturelle à d'autres espèces	non	ovins<-> caprins (rare ovins <-> visons (?USA) ovins <-> bovins (? USA)	**oui** Zoo du Royaume Uni: -4 espèces de bovinae - 3 espèces d'hippotraginae - 4 espèces de felidae et 70 chats domestiques (69 RU et 1 Norvège)
Transmission iatrogène au sein de la même espèce	oui Hormone de croissance extractive, neurochirurgie	oui (rare chez ovins)	non (en l'état actuel des connaissances)
Transmission expérimentale en dehors de l'espèce cible	Primates (90-95 %) : singe araignée, ouistiti, chimpanzé, capucin, vervet, rhésus, singe écureuil, hamster (11 %), chat (43%), chèvre (9%) souris (10%) cobaye, rat.	Souris , hamster, ovins<-> caprins visons (certaines souches seulement) Ouistiti (inoculation i.c., incubation 38-42 mois)	Vison (IC, per os) Souris (IC, per os) Porc (IC) Caprins (IC, per os) Ovins (IC, per os) Ouistiti (inoculation i.c., incubation 46-47 mois)

Une autre hypothèse est à considérer : il s'agit de celle où une "ESB" du mouton se rajouterait à la tremblante naturelle. Ceci est envisageable car des farines de viande et d'os contenant l'agent de l'ESB ont pu aussi servir à nourrir des ovins. Il apparait donc hautement souhaitable 1) de surveiller les cas de tremblante du mouton au Royaume Uni et dans les pays où ces farines ont pu être distribuées, en prévoyant le typage systématique des éventuelles souches nouvelles qui seraient détectées, 2) d'anticiper la gestion du risque correspondant.

La documentation Française : \(Analyse du risque de transmission\) / Comité... sur les encéphalopathies subaigues spongiformes transmissibles

3) Méthodes de détection.

Un test pre-mortem sur le liquide céphalo-rachidien aurait été mis en point aux États Unis. Qu'en penser ? Existe-t-il en France ou ailleurs, des équipes qui travaillent sur la mise au point de tests sur l'animal vivant ? si oui, que sait-on de l'avancement de leurs travaux ? dans quels délais peuvent-ils aboutir ?

Un test diagnostique de la MCJ est en cours de diffusion aux États Unis. Il est basé sur la présence de deux protéines dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients infectés. En effet, l'électrophorèse en double dimension permet de mettre en évidence deux protéines 1.30 et 1.31 (NEJM, 1986, 315,279-283) qui ne réagissent pas avec les sérums anti-PrP. Un institut américain (The California Institute of Technology), en collaboration avec le NIH, a séquencé ces protéines et développé un test de détection immunologique dont la spécificité et la sensibilité peut être estimée, selon des informations obtenues directement auprès des promoteurs, à plus de 90 % (brevet en cours de dépôt). Ce test n'est évalué que pour des LCR prélevés post-mortem ou juste avant le décès chez l'homme atteint de MCJ. Une évaluation des performances du test en situation clinique diagnostique chez l'individu présentant des signes cliniques est en cours. Quelques essais ont été faits chez l'animal, mais les résultats sont trop préliminaires pour être permettre de conclure. Il faut noter que la qualité du prélèvement est critique : toute contamination sanguine fausse les résultats. Les chercheurs français ont un programme de collaboration avec le CIT pour l'évaluation de ce test en médecine humaine (Hôpital Saint Lazare, CEA).

Au total, il s'agit d'une test applicable uniquement chez le patient présentant des signes cliniques faisant suspecter une MCJ. Son extension au dépistage n'est pas envisageable, compte tenu 1) de la nécessité de disposer d'un échantillon de LCR, et 2) de l'absence de données sur les performances de la méthode chez le sujet asymptomatique.

Pour ce qui est de l'application à l'ESB, les informations sont contradictoires : les promoteurs évoquent des résultats intéressants sur un petit nombre d'animaux atteints cliniquement d'ESB; les britanniques contestent ces données.

D'une manière générale, l'intérêt des tests devra être évalué en tenant compte non seulement de leur sensibilité, spécificité et valeur prédictive, mais aussi du contexte d'utilisation : dépistage ou diagnostic, pathologie humaine ou animale.

En France, plusieurs équipes travaillent depuis plusieurs années sur la mise au point de tests diagnostiques. Plusieurs voies sont envisagées; elles concernent :

a) des méthodes spécifiques :

1) l'amélioration des méthodes permettant de détecter la forme pathologique de la PrP (PrP-res); en effet, la présence d'infectiosité associée aux leucocytes permet de penser que la PrP-res puisse y être détectée dès lors que les méthodes immunochimiques actuelles auront été améliorées; Cette voie apparaît actuellement la plus susceptible de recevoir une application à moyen terme (de 1 à 5 ans). Elle sera d'autant plus applicable que la synthèse et la production d'anticorps spécifiques de la forme pathologique de la PrP aura pu être réalisée; à ce jour, aucune équipe dans le monde n'a réussi à obtenir des anticorps spécifiques de la PrP-res; tous les anticorps reconnaissent les deux formes, normale et pathologique, de la PrP. Toutefois, toutes les ressources de l'ingénierie des anticorps monoclonaux et de la recombinaison génétique n'ont pas encore été explorées, ce qui justifie le travail entrepris en France (INRA, CEA) et dans d'autres pays.

2) la mise au point de systèmes cellulaires génétiquement transformés exprimant la PrP humaine à un niveau élevé; en effet, on sait que, dans les modèles de souris

La documentation Française : \(Analyse du risque de transmission\) / Comité... sur les encéphalopathies subaigues spongiformes transmissibles

transgéniques, la durée de la période d'incubation est inversement proportionnelle au niveau d'expression du transgène PrP. *In vitro,* on peut penser que l'hyperexpression du gène de la PrP dans des cellules d'origine neuronale en lignée pourrait permettre de les rendre susceptibles à l'infection. Il s'agit là de projets de recherche dont l'application à court terme n'est pas envisageable (CNEVA, CEA, Hôpital Saint Lazare).

3) l'utilisation des techniques de transgénèse a permis aux auteurs anglo-saxons et suisses d'insérer dans le patrimoine génétique de la souris le gène de la P.P d'autres espèces; les animaux ainsi réalisés deviennent susceptibles aux ATNC de l'espèce dont provient le transgène PrP. De plus, le niveau d'expression de ce transgène conditionne la durée de la période d'incubation. Des souris transgéniques exprimant la PrP bovine ont été réalisées en France (Institut Pasteur de Lille) et pourraient permettre, à moyen terme (3 à 5 ans), de détecter rapidement et efficacement l'infectiosité potentiellement présente dans les tissus bovins.

b) des méthodes non spécifiques :

L'étude voltampérométrique des urines de sujets présentant une démence sénile, une maladie d'Alzheimer ou une maladie de Creutzfeldt-Jakob a pu montrer la présence d'un composé chimique absent dans les urines des sujets normaux et des malades présentant une démence vasculaire (École Vétérinaire d'Alfort, Université du Val de Marne). Cette substance a aussi été identifiée chez les moutons atteints de tremblante et chez les bovins atteints d'ESB ou en phase prodromique de la maladie. Une application diagnostique est en cours d'évaluation, par la caractérisation de la substance en cause, par la mise au point d'une méthode de repérage immunologique ou chimique, et par l'appréciation de la fiabilité du test au cours de la phase d'incubation asymptomatique dans les modèles animaux). L'aboutissement du développement d'un tel test nécessitera, si les résultats obtenus en phase préclinique sont intéressants et si la spécificité est bonne, au moins deux à trois ans.

II QUESTIONS PARTICULIERES POUR DÉCIDER DE MESURES QU'IL CONVIENDRAIT DE PRENDRE.

1) Quelles sont les conditions minimales d'inactivation du ou des prions de l'ESB.

Compte tenu du caractère récent de l'apparition de l'ESB et de la longueur des périodes d'incubation chez le bovin et chez le rongeur, il est difficile de donner une réponse exhaustive et précise à cette question. Il faut rappeler tout d'abord que l'inactivation de tout agent transmissible, et c'est particulièrement vrai pour ce qui concerne les ATNC, dépend de son environnement physico-chimique et de la nature des éventuels traitements physico-chimiques subits auparavant. On sait, par exemple, que le traitement à l'éthanol fragilise certains virus et les rend plus sensibles à l'inactivation physico-chimique. Par ailleurs, les données publiées dans la littérature et l'expérience des laboratoires travaillant sur le sujet démontrent la variabilité considérable de la sensibilité des ATNC aux procédés d'inactivation en fonction de la souche. Il n'existe donc pas de réponse unique à la question posée. Un raisonnement au cas par cas est la seule approche scientifique possible; c'est cette méthodologie qui a été appliquée en France, depuis 1991, dans l'évaluation des risques liés aux médicaments d'origine bovine.

La documentation Française : \(Analyse du risque de transmission\) / Comité... sur les encéphalopathies subaigues spongiformes transmissibles

On peut considérer comme base de travail acceptable les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé édictées en 1992 (WHO/CDS/VPH/92.104) : 1) autoclavage à 132-134 ˚C pendant 18 mn, 2) traitement par la soude 1 N pendant 1 heure à 20 ˚C, 3) traitement par l'eau de Javel (solution concentrée à 12 % diluée fraîchement aux 3/5) pendant 1 heure à 20˚C

Toutefois, les publications de D. Taylor (1994 et 1996) suggèrent que l'agent de l'ESB aurait un comportement différent de celui de la tremblante dans sa susceptibilité aux procédés d'inactivation chimique (la soude 1N et 2 N et l'autoclavage à 134/138˚C pendant 18 minutes n'entraînent qu'une inactivation partielle). Cette observation renforce la nécessité de l'approche "cas par cas" proposée comme attitude générale face au problème de d'inactivation des ATNC.

Par ailleurs, les associations de plusieurs méthodes partiellement inactivatrices peuvent avoir des effets synergiques ou additifs, dont la résultante est compatible avec les normes de sécurité microbiologique; il y a toutefois danger important à l'application simultanée du traitement à l'eau de Javel et de la décontamination à la soude. Ces stratégies combinatoires nécessitent aussi une évaluation au cas par cas, en particulier dans leurs applications dans le domaine hospitalier.

2) Le prion peut-il passer la barrière placentaire ? Le Royaume Uni a pris des mesures d'interdiction de commercialisation d'abats de veaux sur quelles bases ? qu'en est-il des embryons de bovins dont certains tissus sont utilisés dans **les aliments dits "non traditionnels" ?**

La transmission transplacentaire de l'agent de l'ESB ne semble pas être la règle à ce jour. Aucune des études effectuées à ce jour n'a mis en évidence un passage de la barrière placentaire par l'ATNC de l'ESB (expériences de transfert de foetus, sperme). Toutefois, il n'est pas possible de conclure avec certitude; en particulier, l'étude menée en grandeur nature par les britanniques sur plusieurs centaines de bovins semble biaisée, et un résultat négatif de cette expérience ne permettra pas de conclure.

Les mesures d'interdiction d'abat de veau du Royaume Uni (intestin et thymus de veaux de 2 à 6 mois) reposent sur une seule expérimentation (Wells et col, Vet. Rec. 1994, 135, 40-41) dont la méthodologie était très éloignée des conditions naturelles de contamination (les doses infectieuses étaient de 100 grammes de tissu cérébral).

Les données relatives à la tremblante sont plus difficiles à interpréter. Elles concluent à l'absence de probabilité élevée de passage de l'agent. En effet, le placenta contient, dans 50 % des cas, de l'infectiosité détectable, suggérant la possibilité d'infection *in utero* des agneaux. Toutefois, dans la grande majorité des résultats publiés rappelle qu'aucune infectiosité n'a jamais pu être détectée chez le mouton avant l'âge de 6 mois.

3) Le lait, les dérivés du lait, la gélatine sont considérés comme sains (rapport de l'O.M.S. du 14/04/96). Quelle analyse peut on effectuer vis-à-vis de ces produits ?

Le Lait et les dérivés du lait.

Aucune infectiosité n'a jamais pu être mise en évidence dans le lait (rapport O.M.S. WHO/CDS/VPH/92.104; WHO/CDS/VPH/95.145; Guidelines CEE document CPMP du 11 décembre 1991; R. Bradley, communication personnelle). Cette observation concerne aussi bien la tremblante que l'ESB. La question du colostrum reste posée pour ce qui est de l'ESB, et les données concernant la tremblante devraient être réexaminées.

Par ailleurs, il existe des observations où l'enfant ou le petit animal a été nourri par une mère en phase préclinique : dans aucun des cas, cette exposition au lait d'un mère infectée n'a eu pour conséquence le développement d'une maladie (ou d'une infection quand il a été possible de le tester) chez l'enfant ou le jeune animal.

A ce jour, les données acquises concernent un lait normal issu d'un animal sans autre problème intercurrent qu'une ESST; on ne sait rien du statut de laits à taux cellulaire très élevé provenant, par exemple, d'un animal présentant une mammite.

La gélatine.

La gélatine est fabriquée à partir de peau et d'os; ces deux organes appartiennent à la classe IV de l'O.M.S. pour laquelle aucune infectiosité n'est détectable chez les bovins en phase clinique de la maladie, ni durant la phase asymptomatique dans l'état actuel d'avancement des expérimentations.

Dans le modèle de la tremblante, qui peut être retenu à titre de précaution, l'agent a pu être isolé à de très faibles titres à partir de la moelle osseuse. Dans la mesure où les animaux seraient tous issus de régions à prévalence d'ESB faible ou nulle, ces conditions assurent un niveau de risque initial faible. Néanmoins, ceci s'entend sous réserve d'une collecte stricte des tissus correspondants chez l'animal, à l'exclusion de tout autre, ce qui peut être difficile à garantir.

Le procédé de fabrication de la gélatine comprend habituellement des phases d'inactivation incluant souvent une étape à pH très alcalin (> 12) ou très acide (< 2) pendant plusieurs jours. Ces conditions de pH peuvent être atteintes par des concentrations en soude ou en acide très différentes (de 2 N à 0,2 N) qui ont des efficacités très variées sur les titres résiduels en agents infectieux. A ce jour, il n'est pas possible au Comité de connaître, et donc d'évaluer, le procédé de fabrication exact de toutes les gélatines commercialisées. Une garantie satisfaisante serait apportée par une validation par surcharge du procédé de fabrication.

En conséquence, la fabrication de gélatine utilisée pour une administration par voie orale à l'homme ne devrait pas dériver de bovins qui auraient pu être contaminés par l'agent de l'ESB. Dans l'état actuel des connaissances, ceci inclut les bovins élevés en Grande Bretagne, ainsi que, pour les autres pays, les bovins appartenant aux cheptels qui ont été confrontés au risque de contamination par des farines infectées. Par extension, et à titre de précaution, ceci inclut aussi les dérivés des petits ruminants issus de cheptels dont le caractère indemne de tremblante n'aura pu être démontré. A notre connaissance, ces impératifs sont actuellement respectés pour les gélatines utilisées dans les médicaments

possédant une Autorisation de Mise sur le Marché en France. Le respect de ces conditions devrait également être vérifié pour toutes les préparations injectables n'ayant pas statut de médicament. Le Groupe de Sécurité virale de l'Agence du Médicament et/ou le Groupe de Sécurité microbiologique de la Direction Générale de la Santé ont eu à expertiser les dossiers correspondants à ces deux catégories de produits administrables à l'homme au travers d'actes médicaux.

Pour ce qui concerne les gélatines utilisées par voie orale, en particulier dans l'alimentation, le respect d'une origine de pays ou de région à prévalence considérée comme nulle ou sporadique devrait suffire à assurer une sécurité satisfaisante. Ceci s'entend sous la condition d'une vérification du procédé de fabrication utilisé et des conditions effectives de prélèvement à l'abattoir. Il est donc hautement souhaitable que les autorités compétentes s'assurent de l'absence de système nerveux central (y compris la moelle épinière) ou d'abats dans le matériel de départ servant à la fabrication de la gélatine et que les industriels documentent leur procédé de fabrication afin que la Direction Générale de l'Alimentation puisse apprécier son aptitude à inactiver les ATNC potentiellement contaminants. En l'absence de données spécifiques sur les conditions de fabrication précises des gélatines, il est impossible au Comité de garantir l'absence de risque par voie orale des gélatines issues de bovins infectés.

4) La classification de l'O.M.S. (14 novembre 1991) des tissus en fonction de leur degré d'infectiosité repose sur des travaux anciens relatifs à la tremblante du mouton. Ce classement est-il pertinent pour l'ESB ? Un classement des abats a été réalisé sur la base d'études anglaises pour l'ESB (SBO). Ces résultats ont-ils été confirmés par d'autres équipes ? ce classement doit-il remplacer celui de l'O.M.S. pour l'ESB ?

Le 13 novembre 1989, une liste d'abats bovins "spécifiés" '(Specified Bovine Offals, SBO) a été établi au Royaume Uni à la lumière de la distribution tissulaire de l'infectiosité connue dans la tremblante ovine. Ces SBO étaient le cerveau, la moelle épinière, le thymus. les amygdales, l'intestin et la rate des bovins âgés de moins de 6 mois. Jusqu'en juillet 1994, les spécialistes du MAFF ont considéré que les mesures prises étaient suffisantes pour protéger le consommateurs, car l'agent de l'ESB n'est retrouvé que dans le système nerveux central lorsque l'animal est au stade clinique de la maladie. En 1994, Wells et coll ont démontré que l'agent bovin pouvait être retrouvé dans l'iléon de veaux exposés expérimentalement par voie orale à l'agent de l'ESB. Ces faits ont conduit les autorités britanniques à interdire la consommation humaine du thymus et de l'intestin des veaux de moins de 6 mois. Par la suite, les inspections vétérinaires effectuées au Royaume Uni ont rapporté que les consignes sanitaires destinées à éviter de laisser en contact les tissus potentiellement infectants avec les parties comestibles de la carcasse n'étaient pas toujours respectées dans les abattoirs. De nouvelles mesures ont été prises concernant les SBO : depuis le 1er avril 1995, la coloration avec un produit bleu indélébile est obligatoire, et depuis le 15 août 1995, des recommandations pour le prélèvement des yeux et des encéphales ont été édictées ainsi que l'interdiction d'utilisation des vertèbres pour la préparation des viandes (pour les animaux de tout âge) séparées mécaniquement.

La classification de l'O.M.S. du 14 novembre 1991, et plus encore celle établie lors de la réunion des 17-19 mai 1995, reposent sur les données accumulées sur la tremblante naturelle du mouton. L'étude de l'infectiosité des organes chez les bovins cliniquement atteints d'ESB et chez les animaux exposés oralement en phase asymptomatique n'a permis de retrouver l'infectiosité que dans le système nerveux central (y compris la rétine) et dans l'iléon. En conséquence, l'application au bovin de la classification de l'O.M.S. maximalise le risque et constitue donc une précaution vis-à-vis du danger lié à l'agent de l'ESB. Cependant,

les données expérimentales sur lesquelles s'appuient ces documents nécessitent d'être répétées de multiplies fois à partir de souches rencontrées dans d'autres pays de façon à valider l'universalité des conclusions. Cette remarque prend toute sa valeur compte tenu des développement récents du V- MCJ . Enfin, le Comité rappelle 1) la distinction qui doit être faite entre organe et tissu, 2) la possibilité de contamination d'un tissu de la catégorie IV de l'O.M.S. (pas d'infectiosité détectable) par du tissu nerveux (catégorie I, haute infectiosité) lors de la préparation industrielle des aliments.

Au total : la classification de l'O.M.S. surévalue le risque lié à l'ESB tel qu'on peut l'évaluer à ce jour; Elle constitue une précaution de santé publique, et doit donc être maintenue.

5) Les volailles, les poissons, les porcs consomment encore des farines d'origine animale. Étant donné les connaissances acquises, faut-il envisager de supprimer les farines et les produits élaborés à partir des tissus et lesquels, dans l'alimentati on de l'ensemble des animaux ?

Le Comité souhaite différer sa réponse, compte tenu de la complexité de la question posée et des hypothèses scientifiques qu'elle amène à envisager.

6) On connait l'existence de champs à tremblante en Islande. Quel est le devenir de l'agent de l'ESB dans les sols ?

La transmission horizontale des encéphalopathies spongiformes n'a été étudiée expérimentalement que dans le cas de la tremblante ovine. Cette transmission horizontale a été rapportée dès les premiers travaux s'intéressant à cette maladie, et confirmée depuis sans que les mécanismes précis de la transmission aient été définitivement établis. L'apparition de cas de tremblante dans un troupeau pâturant une prairie précédemment utilisée par des animaux malades a conduit Greig (1940) à suspecter que la contamination du pâturage puisse être à l'origine de la transmission de la maladie.

Toutefois ces travaux anciens ont été souvent contredits : l'essentiel de la transmission de l'infection se ferait au moment des mises bas à la suite de l'ingestion de placentas infectés par les animaux (Patisson, 1972). Si, dans le cas de la tremblante, le caractère infectieux des placentas a été rapporté maintes fois et ne fait plus guère de doute, le rôle du pâturage continue cependant à être évoqué étant donné la résistance de l'agent dans le milieu extérieur. Une expérience de contamination de la terre (P. Brown, 1991) a permis de montrer que l'agent de la tremblante expérimentale du hamster pouvait persister au moins trois ans dans le milieu avec maintien d'un titre infectieux important (la même expérience n'a pas retrouvé de contamination des couches de terre sous-jacentes par un mécanisme de lessivage des sols). Aucune autre donnée expérimentale n'est disponible dans ce domaine.

La recherche du caractère infectieux de divers parasites du sol et des animaux (helminthes) a été effectuée jusqu'à très récemment sans succès. Une publication récente de The Lancet concernant le caractère infectieux de certains acariens des fourrages demande à être confirmée dans d'autres pays et dans d'autres conditions expérimentales. On ne trouve pas non plus d'éléments dans la littérature permettant de quantifier le risque que représente le pâturage de prairies infectées. En revanche, une étude du coût que représenterait la transformation des terres labourées en terres pâturées, et vice-versa, a récemment été publiée dans Nature. Ce coût est prohibitif et ne prends en compte ni les problèmes de qualité des sols, ni les problèmes écologiques que cela ne manquerait pas de soulever.

La documentation Française : \(Analyse du risque de transmission\) / Comité... sur les encéphalopathies subaigues spongiformes transmissibles

Au regard des améliorations que pourraient apporter les autres moyens de lutte envisagés dans le cas des encéphalopathies spongiformes des bovins et des ovins (prophylaxie sanitaire, sélection génétique. hygiène des bâtiments d'élevage), le traitement des sols ne semble pas devoir retenir partculièrement l'attention. L'épandage de lisiers notoirement infectés (bâtiments expérimentaux par exemple) doit cependant être précédé d'un traitement par la chaleur (134˚C) et/ou la soude dans les conditions définies par l'O.M.S..

7) Quel risque peut être lié à la voie percutanée ?

A ce jour, il n'existe pas de preuve du passage transcutané des ATNC/prions. : aucune expérience visant à le démontrer n'a été rapportée dans la littérature. De plus, les analyses épidémiologiques ne permettent pas de penser que ce passage soit impliqué dans l'émergence des maladies naturelles.

Toutefois, il faut prendre en compte les deux points suivants :

1) certaines préparations cosmétiques contiennent des excipients qui sont censés favoriser la pénétration transcutanée (liposomes par exemple)

2) la peau ne peut être considérée comme saine a *priori;* toute excoriation locale peut en théorie favoriser une pénétration directe.

En conséquence, le bon sens suggère d'éliminer les extraits de bovins à risque des préparations cosmétologiques.

8) Quelle interprétation peut on avoir du point 3 des recommandations de l'O.M.S. pour les pays à faible incidence de BSE ?

Les données rapportées dans le document de l'O.M.S. sont toujours d'actualité : il n'y a pas d'excès de MCJ chez les professions exposées au risque. Les 4 cas britanniques chez les fermiers ces dernières années ne semblent pas significatifs.

Les recommandations prennent en compte la possibilité théorique de zoonose et proposent des mesures de protection pour les travailleurs exposés, en raison de la possibilité d'une modification dès propriétés biologiques de l'agent de la tremblante lors de son passage et de son adaptation chez les bovins (dans l'hypothèse d'une origine ovine de l'ESB). Ces recommandations sont "de bon sens" et rien ne permet aujourd'hui de proposer leur renforcement ou leur suppression.

9) Force est de constater qu'aujourd'hui les études menées en Grande Bretagne constituent la contribution majeure aux réponses apportées sur les risques liés à l'ESB. Afin de valider tout ou partie de ces travaux et de définir les axes de recherches à explorer en France sur ce sujet, il parait donc indispensable de conduire, au préalable, une analyse critique détaillée des résultats disponibles des travaux britanniques.

Il s'agit d'un commentaire plutôt que d'une question *stricto sensu.* le Comité adhère totalement à cette remarque qui est l'expression du bon sens. Les programmes britanniques sont en effet très complets. Cependant, en raison de l'absence de publication exhaustive de ces programmes dans des revues référencées pouvant être expertisées par la communauté scientifique, toute appréciation globale est impossible; compte tenu de la mobilisation importante des équipes de recherche à laquelle on assiste actuellement, il serait, entre autres, hautement souhaitable de disposer de la liste détaillée des expériences (et des protocoles) qui ont été effectivement mises en place.

La documentation Française : \(Analyse du risque de transmission\) / Comité... sur les encéphalopathies subaigues spongiformes transmissibles