

Maisons-Alfort, le 12 novembre 2003

NOTE

A l'attention du Directeur général de l'alimentation

relative à la demande d'appui scientifique et technique sur l'utilisation des tests de dépistage rapide permettant de discriminer la tremblante et l'ESB dans le cadre des mesures de police sanitaire de la tremblante des petits ruminants

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 15 juillet 2003 par la Direction générale de l'alimentation (DGAI) d'une demande d'appui scientifique et technique concernant l'utilisation, sur le terrain, de tests rapides permettant de distinguer, chez les petits ruminants, la souche d'ESB d'une souche de tremblante naturelle.

L'Agence a soumis cette demande à l'analyse du Comité d'experts spécialisé sur les ESST.

Je vous prie de trouver ci-joint l'avis correspondant du Comité en date du 30 octobre 2003 qui permet d'apporter les éléments scientifiques de réponses aux interrogations soulevées par la DGAI au regard de l'utilisation de ces tests.

Le Directeur général de l'Agence française de
sécurité sanitaire des aliments

Martin HIRSCH

Avis du Comité d'experts spécialisé sur les ESST sur l'usage de tests de dépistage rapide dans la discrimination entre la tremblante et l'ESB et leur application à la police sanitaire des ESST chez les petits ruminants

La police sanitaire des ESST chez les petits ruminants est mise en place sur une fraction des élevages atteints, identifiée soit parce que des symptômes évocateurs ont effectivement fait l'objet d'une notification, soit parce qu'ils faisaient partie de l'échantillon des exploitations dont des animaux avaient fait l'objet d'un prélèvement dans le cadre du programme d'estimation de la prévalence de la tremblante par sondage (réalisé en 2002, et en cours en 2003).

Le Comité a été saisi par l'Afssa en date du 30 juillet 2003 afin de répondre à une saisine de la DGAI datée du 15 juillet 2003, posant les questions suivantes :

- *les résultats des travaux en cours, notamment dans le cadre du programme de typage des souches d'EST ovine et caprine en réseau, permettent-ils de considérer que les tests biochimiques rapides pour les espèces ovine et caprine sont discriminants pour certains isolats de tremblante ?*
- *dans l'affirmative, quelle en est la validité scientifique et quelles seraient les conditions matérielles de leur mise en œuvre, notamment en ce qui concerne le niveau de technicité requis ?*
- *dans l'hypothèse inverse, à quelle échéance pourrait-on espérer obtenir des réponses concluantes ?*

Le Comité s'est appuyé sur les données disponibles au travers du réseau de typage des isolats des ESST chez les petits ruminants, joint en annexe 1.

La notion de discrimination reflète à la fois les performances de sensibilité et de spécificité.

1) sensibilité des tests de discrimination

La sensibilité est exprimée par la proportion d'animaux atteints d'ESB repérés parmi la totalité des animaux atteints d'ESB : elle a des conséquences directes en matière de santé publique, tout défaut de sensibilité qui conduirait à un allègement de mesures de police sanitaire ayant un impact direct en matière d'exposition du consommateur.

La sensibilité d'un test est évaluée en soumettant au test un nombre élevé de prélèvements provenant d'animaux atteints de manière avérée par l'affection visée, l'ESB en l'occurrence, animaux provenant pour cette maladie d'inoculations expérimentales. Sa valeur et son intervalle de confiance sont directement dépendants du nombre d'animaux testés. Par exemple en matière d'ESB caprine, la sensibilité des tests actuels est inconnue faute de tout élément de référence. Pour l'ESB ovine, l'intervalle de confiance de la sensibilité des tests est actuellement très large pour les configurations pour lesquelles on dispose d'animaux expérimentalement infectés. En tout état de cause l'intervalle de confiance de la sensibilité restera probablement très large, compte tenu de la nécessité de générer expérimentalement de tailles importantes d'échantillons correspondants et de la variabilité des paramètres en jeu (espèce ovine ou caprine, génétique). Quels que soient le test et sa qualité intrinsèque, la connaissance de la marge d'erreur dans un usage éventuel pour classer un troupeau restera donc probablement très limitée.

Le Comité considère donc que la sensibilité des tests disponibles dans la discrimination ESB/tremblante est actuellement dans certaines configurations inconnue, dans d'autres très incertaine : la méconnaissance de cette variable limite la puissance des travaux de détection du

passage éventuel de l'ESB chez les petits ruminants¹ mais ne les invalide pas. A l'inverse, aucune option raisonnée de gestion de chaque troupeau atteint d'ESST ne peut être proposée sur cette base.

2) spécificité des tests de discrimination

La spécificité d'un test est évaluée en soumettant au test des prélèvements provenant d'animaux certainement indemnes de l'affection visée, l'ESB en l'occurrence, et atteints de manière avérée par la tremblante. La spécificité correspond à la proportion d'animaux atteints de tremblante effectivement reconnus comme tels. Là encore la connaissance de la spécificité de ces tests apparaît dans l'état actuel des données limitée, et son intervalle de confiance très large, étant donné le peu de prélèvements provenant de cas de tremblante avérée (confirmé par typage sur souris) testés. De plus, plusieurs souches dont les autres caractéristiques s'éloignent de l'ESB présentent des marqueurs biochimiques identiques. Ces faux positifs n'ont néanmoins pas de conséquence en matière de santé publique. Leurs conséquences en matière de santé animale seraient sans doute moindre que l'application de la police sanitaire à tout troupeau atteint d'ESST, comme c'est le cas actuellement.

3) facilité d'utilisation des tests de discrimination

Dans leur état de développement actuel, l'utilisation de ces tests doit être réservée à quelques laboratoires spécialisés.

Avis

Dans son avis du 31 décembre 2001², le Comité précisait que « tant que l'existence d'une souche d'ESB chez les petits ruminants restera hypothétique, le Comité conditionnera dans le futur ses avis relatifs aux mesures de gestion sanitaire qui lui seront proposées par l'Etat chez les petits ruminants, à une précision par l'Afssa et/ou les ministères de tutelle des critères³ ... vis-à-vis desquels l'analyse scientifique devrait être conduite ». Dans ses avis du 24 juin 2002⁴, puis du 31 octobre 2002⁵, le Comité rappelait cette nécessité de définir explicitement une stratégie de gestion du risque, par exemple parmi celles décrites dans l'avis du 31 décembre 2001, préalablement à toute évaluation de la pertinence des mesures proposées. Cette stratégie de gestion n'a à ce jour pas été explicitement définie, et les mesures actuelles combinent des mesures rigoureuses dans les cheptels connus comme atteints, à une faiblesse des mesures de prévention dans les cheptels non repérés alors même que les moyens techniques de leur détection existent mais ne sont pas utilisés.

Dans ce contexte d'incertitude sur les objectifs attendus des mesures de police sanitaire chez les petits ruminants, le Comité considère que la sensibilité des tests de discrimination ESB/tremblante n'est pas suffisamment établie pour que, sur la base des modalités actuelles d'identification des troupeaux atteints d'ESST, ces tests puissent être utilisés pour alléger les mesures de police sanitaire sans augmentation du risque d'exposition humaine à l'ESB. Il est par ailleurs peu probable que des données sur la sensibilité des tests de la puissance statistique ou expérimentale nécessaires puissent être produites à moyen terme.

¹ Cette stratégie est actuellement utilisée par le réseau *Typage de souches*. Elle vise à se concentrer sur les cas pertinents, qui sont alors étudiés par l'inoculation à 4 lignées de souris. L'hypothèse de travail est qu'une souche d'ESB a plus de chances de se trouver parmi ces isolats pré-triés que parmi les autres : dans ce contexte, s'il existe des isolats de type ESB en France, certains devraient pouvoir être identifiés plus facilement par le réseau par cette méthodologie.

² Avis du Comité sur l'analyse des risques liés aux encéphalopathies spongiformes transmissibles dans les filières petits ruminants, les forces et faiblesses du dispositif actuel et les possibilités d'évolution, 31 décembre 2001

³ i) le niveau de risque qu'il est possible de retenir sur l'exposition globale des consommateurs ii) le niveau de garantie individuelle de salubrité des produits qu'il est souhaitable de privilégier iii) le niveau d'anticipation de mesures visant à préserver les filières animales en cas de situation d'urgence ultérieure, pour une même garantie de santé publique.

⁴ Avis du Comité sur une demande d'appui scientifique et technique concernant les modalités pratiques de mise en oeuvre de l'arrêté du 15 mars 2002 fixant les mesures de police sanitaire relatives à la tremblante ovine et caprine.

⁵ Avis du Comité d'experts spécialisé sur les ESST sur deux projets d'arrêté relatifs à la police sanitaire de la tremblante ovine et caprine, abrogeant l'arrêté du 15 mars 2002, et modifiant notamment les mesures prises dans les exploitations suspectes

Le Comité considère par ailleurs que les informations épidémiologiques et scientifiques sont désormais suffisantes pour qu'une réflexion puisse être engagée sur un équilibre différent entre étendue du dépistage initial et sévérité des mesures dans les troupeaux atteints, équilibre dans lequel les tests de discrimination pourraient jouer un rôle, en fonction de la stratégie de gestion du risque retenue.

Fait à Maisons-Alfort le 30 octobre 2003

Le Président du Comité d'experts spécialisé sur les ESST

Pr. Marc ELOIT

Annexe 1

ETAT A LA DATE D'OCTOBRE 2003 DES DONNEES DISPONIBLES SUR LES TESTS BIOCHIMIQUES DE DISCRIMINATION ESB/TREMBLANTE EVALUES PAR LE RESEAU DE TYPAGE DE SOUCHES CHEZ LES PETITS RUMINANTS

Participants

- Coordonnateur : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
Responsable scientifique : M. Eloit
- Partenaire 1 : INRA
Responsables scientifiques : F. Lantier, H. Laude, J.M. Elsen, F. Schelcher
- Partenaire 2 : Afssa, laboratoire de Lyon
Responsable scientifique : T. Baron
- Partenaire 3 : CEA
Responsables scientifiques : J.P. Deslys ,J.Grassi,
- Partenaire 4 : CNRS, GEM , Orléans
Responsable scientifique : B. Ryffel

Cette synthèse a fait l'objet d'une validation par le réseau « typage de souches ». Ce réseau résulte d'une convention passée avec le GIS prions et la Direction Générale de l'Alimentation du Ministère de l'Agriculture.

1- Western blot classique

La technique de Western Blot permet, par analyse du profil électrophorétique de la PrP-res, d'identifier une souche d'ESST suspecte présentant des caractéristiques comparables à la souche d'ESB. Le profil de migration de la PrP-res associée à la souche d'ESB montre en effet que la bande correspondant à la forme non glycosylée de la protéine présente une taille plus basse que celle associée aux souches de tremblante classique (Baron et al., Neurocience Letters, 2000).

Ce test ne peut toutefois être considéré comme de spécificité parfaite, car la PrP-res associée à au moins deux isolats de tremblante présente un profil de migration proche de celle associée à la souche d'ESB : isolat expérimental CH1641 et isolat Ov100⁶. Cette remarque vaut néanmoins pour l'ensemble des tests ici mentionnés, dans les limites où ils ont pu accéder aux échantillons concernés. De même la sensibilité de ces tests est encore plus faiblement établie, avec seulement deux à cinq échantillons d'ESB ovine testés.

Enfin la situation est encore moins bien établie pour la chèvre puisque la variabilité moléculaire est encore moins bien connue dans la maladie naturelle, et pas du tout connue dans l'ESB expérimentale pour laquelle aucune donnée fiable n'a été publiée en la matière.

2- Le Test ELISA différentiel

Les laboratoires du CEA de Saclay et Fontenay-aux-Roses, dirigés respectivement par Jacques Grassi et Jean-Philippe Deslys, ont développé un test consistant en une détection de la PrP-res au sein de tissus nerveux centraux, impliquant une technique de purification et de dosage immunométrique. Le caractère potentiellement discriminant du test est basé sur les caractéristiques biochimiques de la PrP-res associée à la souche d'ESB, qui présente une sensibilité plus importante au traitement par la protéinase K que celles associées aux souches de tremblantes connues.

Ainsi, le traitement d'homogénats de tissu cérébral permet, en fonction des conditions dans lesquelles sont effectués les traitements à la protéinase K (composition des tampons, concentration de la PK), d'éliminer ou non l'épitope reconnu par l'anticorps de capture. Il devient dès lors possible de définir un rapport A/A', correspondant au rapport des densités optiques mesurées après traitement des échantillons dans le tampon A et dans le tampon A' (correspondant à deux conditions différentes pour le traitement à la PK). Dans la version initiale du test, la plupart des souches de tremblante classique conduisaient, après traitement différentiel dans les deux conditions de tampon, à un rapport A/A' proche de 1 ; alors que la souche d'ESB, quelle que soit l'espèce à laquelle elle ait été adaptée (bovins, ovins, souris conventionnelles), conduisait à un rapport significativement supérieur à 1. Ce test a été récemment modifié en réalisant notamment l'étape de purification (et donc de traitement à la PK) sur l'automate développé par Bio-Rad. Dans le format actuel, les souches de tremblante classiques sont caractérisées par un rapport A/A' inférieur à 2, certaines souches de tremblantes (dites intermédiaires) présentent un rapport compris entre 3 et 5, alors que la souche ESB chez le mouton est caractérisée par un rapport supérieur à 5. Les isolats "discordants" (ceux qui sont détectés par le test Bio-Rad et pas par les Western blots classiques) produisent des rapports généralement plus élevés que ceux obtenus avec l'ESB expérimentale chez le mouton.

A ce jour, plus de 440 isolats ont été analysés par la technique d'ELISA différentielle. Les résultats ont montré que si la majorité des échantillons analysés se comportait comme des isolats de tremblante classique, une proportion importante présentait un comportement intermédiaire et un très petit nombre un rapport A/A' compatible avec l'ESB. Ces isolats font ou devraient faire l'objet d'études complémentaires dans le cadre du réseau. La grande majorité

⁶ Avis du Comité d'experts spécialisé sur les ESST sur certains résultats préliminaires de typage moléculaire chez les petits ruminants, les résultats spécifiques de l'isolat O100, leur interprétation et les propositions d'actions complémentaires, 25 avril 2002

des isolats "discordants" produit un rapport significativement plus élevé que l'ESB ovine même si une minorité présente un rapport compatible.

A ce stade, le test ELISA peut être considéré comme techniquement finalisé, mais non validé, par manque d'échantillon d'ESB ovine ainsi que du fait de l'absence de détermination des caractéristiques de souches des isolats de petits ruminants étudiés. A ce jour, la sensibilité du test apparaît satisfaisante puisque les 9 isolats d'ESB expérimentale ovine différents testés (tous ARQ/ARQ) sont tous identifiés sans problème. Toutefois, il est vraisemblable que sa spécificité soit perfectible, car la PrP-res associée à l'isolat expérimental de tremblante CH1641 ainsi que certains isolats "discordants" présentent des caractéristiques biochimiques proches de celles associées à la souche d'ESB.

3- Western blot différentiel (CEA)

Les données concernant la mise au point de ce test Western blot différentiel ne peuvent être rendues publiques car elles sont actuellement soumises à publication.

4- Western Blot différentiel (Afssa Lyon)

La technique utilisée par le laboratoire de l'Afssa de Lyon est fondée sur des principes comparable au protocole publié par l'équipe de M. Stack, du VLA au Royaume-Uni (Stack et al., Acta Neuropathologica, 2002), c'est-à-dire reposant sur le marquage différentiel de la protéine prion par deux anticorps différents. L'un de ces anticorps reconnaît une région de la protéine inapparente dans l'ESB contrairement à la plupart des isolats de tremblante. Cette technique permet de distinguer une souche de tremblante classique d'une souche présentant les caractéristiques similaires à la souche d'ESB selon deux critères :

- la masse moléculaire apparente de la bande correspondante à la forme non glycosylée de la PrP-res ;
- le niveau de reconnaissance relatif de la PrP-res par deux anticorps : le BAR 233, qui reconnaît la PrP-res associée à toute les souches d'ESST ovines, et le P4, qui donne un signal de faible intensité avec les souches de type ESB.

A ce jour (octobre 2003), 134 ovins ou caprins ont été analysés. 115 prélèvements présentent un profil de type tremblante (poids moléculaire supérieur à celui de l'isolat ESB bovine et marquage positif en P4) et 1 isolat de chèvre dont la signature biochimique est comparable à celle de l'ESB expérimentale chez l'ovine (poids moléculaire bas et réactivité faible avec l'anticorps P4). Une autre chèvre a présenté un poids moléculaire comparable ou très légèrement inférieur à l'isolat ESB bovine, néanmoins, l'absence de diminution du signal à l'aide de l'anticorps P4 n'est pas comparable à la signature de l'ESB chez les ovins expérimentalement infectés par l'ESB jusqu'à présent étudiés. En moyenne, la masse moléculaire mesurée pour cette bande en comparaison à un témoin bovin était de + 0,451 kDa pour les ovins (entre + 0,245 et + 0,658) et 0,332 kDa pour les caprins (entre + 0,011 et 0,653). 18 prélèvements sont encore en cours d'analyse. L'équipe de l'Afssa de Lyon a également mesuré l'intensité relative des bandes correspondant aux formes bi (b), mono (m) et non (n) glycosylées de la PrP-res de ces échantillons analysables, en comparaison avec les souches d'ESB ovine et SSBP1. Dans ces conditions, la souche d'ESB présente une forte majorité de forme bi-glycosylée par rapport aux formes mono- et non glycosylées (b = 61 %, m = 25 %, n = 14 %), ce qui n'est pas observé pour la souche SSBP1 (b = 40 %, m = 39 %, n = 21 %). Les valeurs observées pour les 119 échantillons de tremblante analysés sont toutefois intermédiaires (b = 55 %, m = 27 %, n = 18 % pour les ovins ; et b = 45 %, m = 31 %, n = 24 % pour les caprins). Il n'est, par conséquent, pas possible de tirer de conclusion à la lumière de ces données.