

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Autovaccins chez les ruminants

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Mai 2016

Édition scientifique



Autovaccins chez les ruminants

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Mai 2016

Édition scientifique

Direction générale

Maisons-Alfort, le 4 mai 2016

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**relatif à l'«évaluation de risque, en particulier de transmission du prion, en cas
d'autorisation de l'usage des autovaccins chez les ruminants »**

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie le 16 décembre 2013 par la DGAL pour conduire une évaluation de risque, axée sur le risque prion, en cas d'autorisation des autovaccins chez les ruminants.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

L'Anses avait été saisie le 17 juin 2011 par le Syndicat de l'Industrie du médicament Vétérinaire et Réactif (SIMV) sur la problématique générale des autovaccins à usage vétérinaire (2011-SA-0156).

Dans son avis du 21 octobre 2013, l'Anses indiquait que le groupe de travail (GT) n'avait pas traité l'usage des autovaccins chez les ruminants du fait que cet usage n'était pas autorisé en France. En effet, l'arrêté du 2 décembre 2003 portant interdiction de la préparation, la mise sur le marché, la prescription, la délivrance, l'administration, l'importation et l'exportation des autovaccins à usage vétérinaire destinés aux bovins, ovins ou caprins à base de produits d'origine bovine, ovine ou caprine, et par application du principe de précaution relatif aux encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST), dispose à son article 1 que « la préparation, la mise sur le marché, la prescription, la délivrance, l'administration, l'importation et l'exportation des autovaccins à usage vétérinaire définis au 3° de l'article L. 5141-2 du code de la santé publique destinés aux bovins, ovins ou caprins, à base de produits d'origine bovine, ovine ou caprine, à l'exception de ceux qui répondent aux exigences de la pharmacopée sur les ESST, sont interdites ».

Pour autant et compte tenu de l'évolution très favorable de la situation épidémiologique en matière d'ESST depuis 2003, l'Anses recommandait dans son avis du 21 octobre 2013 d'étudier la révision de la réglementation concernant les autovaccins chez les ruminants.

La DGAL rappelle dans sa lettre de saisine que la mesure 15 du plan Ecoantibio 2017 porte sur la promotion de la recherche dans le domaine de l'immunité et de l'utilisation de vaccins ou d'autovaccins. Cette mesure indique que le recours à la vaccination, lorsqu'il est possible pour la prévention de certaines pathologies, doit être encouragé et que, sous réserve d'une validation scientifique de leur intérêt thérapeutique et en l'absence de vaccins autorisés, le recours aux autovaccins peut être envisagé.

La DGAL a sollicité l'Anses pour une évaluation de risque en cas d'autorisation de l'usage des autovaccins chez les ruminants, en précisant qu'en cas d'avis favorable, l'arrêté du 2 décembre 2003 sera abrogé.

La question principale de la saisine porte spécifiquement sur le risque de transmission du prion. Pour y répondre, l'évaluation de risque nécessitera d'identifier les sources des prélèvements sur ruminants à des fins de préparation d'autovaccins. Ainsi, les besoins en autovaccins dans la filière ruminants seront rappelés. Par ailleurs, les experts préciseront s'ils ont mis en évidence des risques potentiels hors ESST, liés aux auto-vaccins chez les ruminants, qui n'aient pas déjà été identifiés dans la saisine 2011-SA-0156.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

Le traitement de la saisine relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisés « Santé et bien-être des animaux » (CES SABA). L'Anses a confié au groupe de travail « Autovaccins ruminants », rattaché au CES « SABA » l'instruction de cette saisine. Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été soumis au CES (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) les 8 décembre 2015 et le 12 janvier 2016. Le rapport d'expertise produit par le GT Autovaccins ruminants tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par

les membres du CES. Ces analyses et conclusions sont issues d'un travail d'expertise collégiale au sein d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Les rapporteurs se sont réunis à 10 reprises entre avril 2015 et janvier 2016.

Le GT « Autovaccins ruminants » était constitué de sept experts issus de différents collectifs d'experts de l'Anses (CES SABA, CES Médicaments vétérinaires, GT EST¹ et GT Médicaments vétérinaires). La coordination de l'expertise était assurée par l'Unité d'évaluation des risques en santé en alimentation et en bien-être des animaux (UERSABA) qui était appuyée par des experts agents de l'Anses et provenant de l'Unité d'évaluation des risques liés aux aliments (UERALIM) et de l'Agence du médicament vétérinaire (ANMV).

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

L'évaluation a été conduite en s'appuyant sur les éléments suivants :

- Les consultations des parties prenantes :
 - Consultation téléphonique du Dr Sylvie Blain-Cartier, le 6 mai 2015, vétérinaire praticien, référent commission caprine de la SNGTV.
 - Consultation téléphonique du Dr Pierre Autef, le 13 mai 2015, vétérinaire praticien, référent commission ovine de la SNGTV.
 - Consultation téléphonique du Dr Christine Filliat, le 29 juillet 2015, vétérinaire praticien à Chateauneuf sur Isère.
 - Consultation téléphonique du Dr Jocelyn Amiot, le 21 août 2015, vétérinaire praticien, référent commission vaches allaitantes de la SNGTV.
 - Consultation téléphonique du Dr Aubadie-Ladrix, le 21 août 2015, praticien, référent commission vaches laitières de la SNGTV.
 - Consultation téléphonique du Dr Loïc Guiouiller, le 4 septembre 2015, vétérinaire praticien, référent médecines alternatives de la SNGTV.
 - Consultation écrite de l'Institut en Santé Agronomie Environnement (ISAE 35), le 7 septembre 2015.
 - Consultation écrite du laboratoire Filavie, le 7 septembre et 13 novembre 2015.
 - Consultation écrite du laboratoire Labocéa, le 14 septembre et 6 novembre 2015.
 - Consultation écrite du laboratoire Biovac, le 15 septembre et 18 novembre 2015.
 - Consultation téléphonique du Dr Bernard Poutrel (INRA) et Dr Pascal Rainard (Infectiologie et Santé Publique, INRA), le 8 octobre 2015.
 - Consultation écrite du Dr Pascal Rainard, le 14 octobre 2015, Directeur de recherche UMR 1282 Infectiologie et Santé publique (INRA, Nouzilly).
- Les publications scientifiques figurant dans la partie bibliographie en fin de rapport.

¹ GT EST = Groupe de Travail « Encéphalopathies spongiformes transmissibles »

3. PERIMETRE ET LIMITATIONS DU CHAMP D'EXPERTISE

3.1. Définitions

Autovaccin

Lors de la prescription d'un médicament, le vétérinaire est tenu de respecter un ordre de priorité (principe de la « cascade ») défini par l'article L. 5143-4 du code de la santé publique. Les 3 premiers alinéas de cet article imposent au vétérinaire de prescrire en priorité un médicament bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM). L'autovaccin étant un médicament ne possédant pas d'AMM, sa prescription est encadrée par le 4^{em} alinéa de cet article qui stipule qu'« ...à défaut des médicaments mentionnés aux 1°, 2° et 3°, [le vétérinaire peut prescrire] une préparation magistrale vétérinaire ».

L'autovaccin, considéré comme préparation magistrale, est plus précisément défini dans l'article L. 5141-2 du code de la santé publique comme « un médicament vétérinaire immunologique fabriqué en vue de provoquer une immunité active à partir d'organismes pathogènes provenant d'un animal ou d'animaux d'un même élevage, inactivés et utilisés pour le traitement de cet animal ou des animaux de cet élevage. » La préparation d'un autovaccin sous-entend donc l'isolement préalable d'une souche bactérienne ou virale, considérée comme responsable des symptômes observés².

Les auto-vaccins sont inactivés et le plus souvent adjuvés pour améliorer leur immunogénicité. Le protocole habituel d'utilisation des auto-vaccins consiste en 2 injections à 3-4 semaines d'intervalle. En fonction des espèces, ils peuvent être injectés par voie sous-cutanée ou par voie intra-musculaire. Leur durée d'utilisation est variable et dépend notamment de la persistance des signes cliniques dans l'élevage, de la sévérité des problèmes rencontrés, de la motivation de l'éleveur et de la demande du vétérinaire de l'élevage. L'autovaccin est strictement réservé à l'exploitation dans laquelle l'agent infectieux qu'il contient a été isolé ; il n'est pas destiné à être utilisé dans les élevages en lien épidémiologique avec cette exploitation, contrairement à ce qui est envisageable en filière avicole ou en filière porcine³.

Prion

Le prion est un agent transmissible de nature exclusivement protéique (acronyme de *PRO*teinaceous *IN*fectious *P*article). Le prion, en s'associant à la forme normale de la protéine PrP^c (forme cellulaire), est capable de « trans conformer » celle-ci sous une forme pathologique (PrP^{sc}) par une modification de sa structure secondaire et tertiaire. Dans cet avis, le terme prion sera employé pour désigner l'agent pathogène transmissible non conventionnel.

² Cette particularité différencie l'autovaccin de l'isothérapie, pratique empirique qui repose sur l'utilisation directe de matières virulentes (urine, lait, pus, sang, etc.) soumises à plusieurs étapes de dilution et de dynamisation avant administration le plus souvent par voie orale, dans les aliments ou dans l'eau de boisson.

³ Dans le cas des ruminants, on entend par élevage une unité épidémiologique constituée d'animaux de même espèce élevés dans une unité géographique donnée. Les élevages de veaux ou de jeunes bovins de boucherie sont constitués d'animaux de provenances géographiques souvent extrêmement variables. Ces élevages d'engraissement n'ont donc pas de lien épidémiologique aussi systématique avec les cheptels d'origine, comme c'est le cas en engraissement en filière porcine ou avicole.

3.2. Périmètre de la saisine

La question principale posée par la saisine porte sur le risque de transmission iatrogène de prions au sein d'un troupeau si l'animal, source de l'échantillon utilisé pour préparer l'autovaccin, est lui-même déjà contaminé par un prion pathologique.

Le risque lié à une inoculation accidentelle au manipulateur d'un autovaccin pouvant contenir du prion a été écarté compte tenu de la rareté de cet événement, des précautions prises, de la quantité minimale de dose infectieuse susceptible d'être injectée et de l'existence de la barrière à la transmission inter-espèces.

Par ailleurs, les rapporteurs n'ont traité que du risque encéphalopathie spongiforme transmissible (EST). Les risques liés aux adjuvants ou les risques pour le consommateur n'ont pas été abordés, dans la mesure où ils ont déjà fait l'objet d'une analyse dans le rapport consacré aux autovaccins destinés aux autres espèces animales que les ruminants et où les experts n'ont pas identifié de risque spécifique pour les ruminants qui n'auraient pas été évalués dans le précédent rapport (Anses 2013).

Sur le plan théorique, l'emploi d'autovaccins peut être envisagé aussi bien pour des maladies virales que bactériennes. En France, différentes dispositions réglementaires régissent l'autorisation de préparation des autovaccins. L'arrêté du 6 mars 2008⁴ définit les bonnes pratiques de préparation à usage vétérinaire auxquelles doivent se conformer les établissements autorisés. A la date de rédaction de ce rapport, aucun des 4 préparateurs d'autovaccins agréés en France ne dispose d'installations permettant la production d'autovaccins viraux en conformité avec les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). C'est pourquoi la saisine ne traitera que des autovaccins destinés à la lutte contre les maladies bactériennes des ruminants. Toutefois, si cette situation devait évoluer dans les années à venir, il conviendrait d'évaluer le risque de transmission d'EST par emploi d'autovaccins viraux. L'évaluation du bénéfice, pour la santé publique, de l'emploi d'autovaccins en alternative à des traitements antibiotiques ne sera pas non plus abordée dans ce rapport.

L'efficacité des autovaccins ne sera pas non plus développée dans ce rapport, le lecteur étant invité à se reporter au précédent rapport dans lequel ce sujet est développé (Anses 2013). Comme pour les autres espèces animales, ce point n'a pas fait l'objet de nombreuses publications pour les ruminants.

4. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT AUTOVACCINS RUMINANTS ET DU CES SABA

4.1. Contexte

Le rapport débute par un premier chapitre sur le contexte des décisions réglementaires de 2003, visant à interdire les autovaccins chez les bovins, ovins et caprins, pour ensuite dans le second chapitre, aborder la place potentielle des autovaccins en thérapeutique des ruminants. Un état des lieux des possibilités en matière de vaccins chez les ruminants est présenté, suivi d'un rappel sur la variabilité antigénique bactérienne et sur l'absence(s) de protection croisée(s) pour certaines bactéries. Les principales utilisations d'autovaccins chez les ruminants avant l'interdiction de 2003, sont ensuite rappelées. Les experts concluent que compte tenu des éléments présentés dans ce

⁴ <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000018392379>

chapitre, les principales matrices à partir desquelles sont isolés les agents pathogènes pouvant servir à la préparation d'autovaccins sont essentiellement et par ordre de fréquence : le lait, le poumon, les matières fécales, le pus et le placenta ou les lochies. Néanmoins, des autovaccins pouvant éventuellement être produits à partir d'autres matrices, l'évaluation ne se limitera pas aux principales.

4.1. Etat des connaissances en matière d'EST

La troisième partie du rapport dresse un état des connaissances en matière d'encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESB classique et atypique L ou H, tremblante classique et atypique des petits ruminants).

4.1.1. Situation épidémiologique actuelle en France

Considérant les données épidémiologiques actuelles sur les ESB en France, les experts concluent que les mesures actuellement en vigueur (notamment vis-à-vis de l'alimentation animale), si elles demeurent appliquées, devraient permettre de garantir l'absence de réémergence de l'ESB. Toutefois l'existence de cas spontanés d'ESB classique ne peut être exclue. En outre, compte tenu des incertitudes relatives (i) à l'origine des cas d'ESB atypique et (ii) à la capacité du système de surveillance à les détecter, il semble avisé de considérer qu'un nombre limité de cas d'ESB atypique persiste dans la population bovine française.

La situation en matière de tremblante classique et atypique des petits ruminants s'est beaucoup améliorée en France, au cours de la décennie écoulée. Chez les ovins, la prévalence globale des deux formes de tremblante est d'environ 0,11 cas pour 10 000 animaux abattus. Cette valeur ne doit toutefois pas occulter l'existence d'un nombre significatif de foyers de tremblante classique et atypique qui ne sont pas détectés, compte tenu (i) des outils de détection utilisés et (ii) du système de surveillance (échantillonnage de la population : 10 000 tests réalisés pour 550 000 ovins adultes abattus). Depuis 2005, aucun cas d'ESB n'a été détecté chez les petits ruminants en France.

Les modifications du système de surveillance chez les bovins et les petits ruminants survenues au cours des dernières années (diminution du nombre de tests et/ou modifications des populations cibles) sont susceptibles toutefois de diminuer la capacité de détection (sensibilité et précocité) d'une modification de la situation épidémiologique de ces maladies.

Ainsi, bien que la situation épidémiologique se soit significativement améliorée, les EST persistent probablement sous une forme sporadique, difficilement détectable dans les populations de ruminants de rente en France.

4.1.2. Mode de contamination et dose infectante (DI)

Les experts rappellent que, chez les ruminants, la voie orale semble être le mode de contamination naturelle le plus fréquent. Néanmoins, de nombreuses expériences menées dans différents modèles animaux d'EST ont permis de démontrer la transmissibilité expérimentale de ces agents par d'autres voies. L'efficacité des différentes voies d'inoculation est variable en fonction de l'espèce-hôte et de la souche considérée. Il est raisonnable de considérer d'une façon générale pour toutes les souches, que la voie intracérébrale est la voie de transmission la plus efficace ; les voies parentérales ont une efficacité intermédiaire entre la voie intracérébrale et la voie orale. L'ensemble des données disponibles indique que la voie parentérale est au minimum 10 fois moins efficace que la voie intracérébrale.

4.1.3. Facteurs de variation de la sensibilité aux EST

La sensibilité, notamment des petits ruminants, aux agents responsables d'EST, est fortement influencée par les polymorphismes du gène *PNRP* qui code la protéine Prion.

4.1.4. Distribution de l'infectiosité

La distribution de l'infectiosité (exprimée en DL_{50} ⁵ ou DI_{50} ⁶ par gramme ou par mL de tissu pour une espèce considérée et pour une voie de contamination donnée) laisse apparaître que la charge infectieuse des tissus et des fluides biologiques évolue avec le stade de la maladie et celui du couple souche-hôte considéré. Les distributions de l'infectiosité dans le cas de la tremblante classique du mouton (distribution dans de nombreux organes et fluides) et de l'ESB classique chez les bovins (présence essentiellement dans le système nerveux central et des portions de l'intestin) ont été largement étudiées. Peu de données sont actuellement disponibles pour les distributions dans les formes atypiques de tremblante (petits ruminants) et d'ESB (bovins).

En fonction des espèces et des prions concernés, les niveaux d'infectiosité varient de 1 DL_{50} (lait, sang) à 10^8 DL_{50} (cerveau) par gramme de tissu ou mL de fluide en transmission intra-spécifique par voie intracérébrale.

4.2. Appréciation du risque de transmission du prion par l'emploi d'autovaccins chez les ruminants en France.

L'appréciation du risque de transmission du prion par l'emploi d'autovaccins chez les ruminants a été évaluée dans une quatrième partie. Pour cela, les experts ont défini l'évènement indésirable à considérer comme étant le fait d'infecter, par l'utilisation d'un autovaccin, au moins un animal sensible dans l'élevage concerné. Sa probabilité de survenue dépend de la combinaison de plusieurs probabilités de survenue d'évènements (voir Figure 1) qui ont été successivement évaluées à partir des déterminants scientifiquement identifiés.

⁵ DL_{50} = Dose létale 50%, induisant la mortalité suite à une EST dans 50% des individus receveurs.

⁶ DI_{50} IC = Dose infectieuse 50%, induisant l'infection de 50% des receveurs par la souche de prion concernée, sans pour autant induire la mortalité de tous les animaux infectés dans la période d'espérance de vie de l'espèce considérée. La DI_{50} est par conséquent inférieure ou égale à la DL_{50} .

Séquence d'évènements

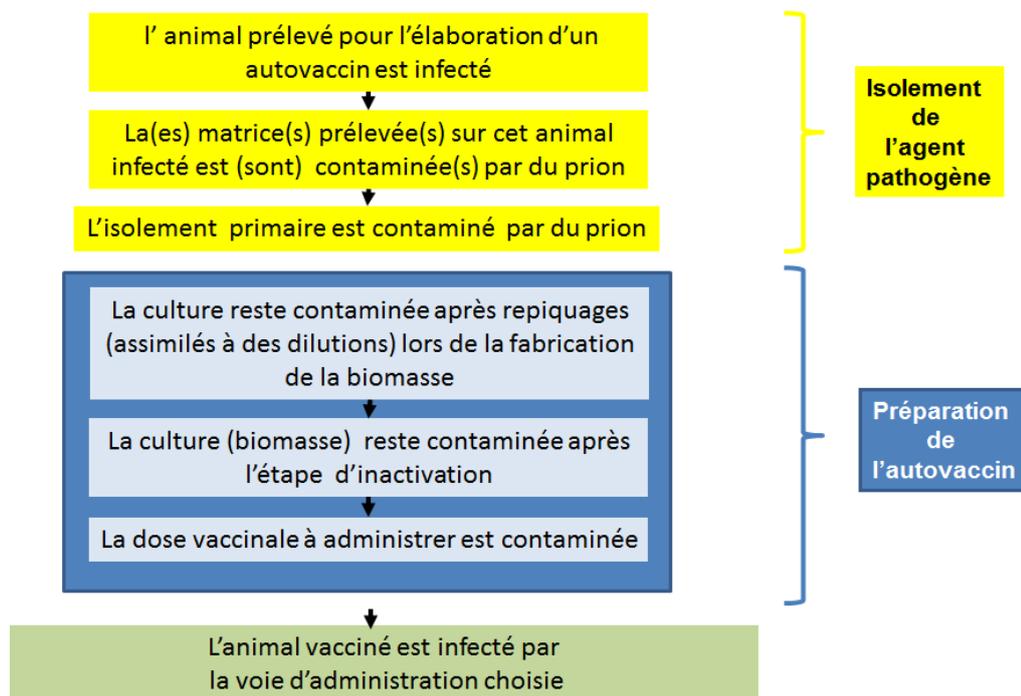


Figure 1 : Schématisation de la séquence d'évènements utilisée pour l'appréciation de la probabilité de transmission du prion par l'emploi d'autovaccins chez les ruminants en France (la biomasse correspond à une culture bactérienne réalisée en très grand volume visant à obtenir une quantité de bactéries suffisamment importante pour permettre la préparation des doses vaccinales).

4.2.1. Probabilité de réaliser un prélèvement dans un cheptel infecté et de prélever un individu infecté.

Cette probabilité découle d'une part de la prévalence nationale estimée à $3 \cdot 10^{-6}$ pour les ESB (les ESB atypiques ayant été assimilées à l'ESB classique) et $1 \cdot 10^{-4}$ pour les tremblantes des petits ruminants ; d'autre part, de la prévalence intracheptel qui apparaît très variable en fonction du type d'EST. Pour les calculs les experts ont utilisé deux valeurs : soit un seul cas présent dans le troupeau (cas des ESB et de la tremblante atypique), soit présence de cas multiples (cas de la tremblante classique) et la valeur de 5% a alors été choisie.

4.2.2. Probabilité d'infection des matrices utilisables pour la réalisation de l'isolement bactérien.

Les experts ont ensuite évalué la probabilité d'infection des matrices utilisables et les facteurs de variabilité de leur niveau d'infectiosité, en prenant en compte les matrices les plus couramment employées pour la recherche de l'agent bactérien responsable de maladie, mais aussi en incluant les matrices présentant les plus forts niveaux d'infectiosité, de manière à pouvoir évaluer le niveau de risque maximal. Cette probabilité dépend de facteurs tenant à l'animal, les plus influents étant son âge et le génotype (résistant ou non). Les facteurs extrinsèques sont la nature de la souche de prion, la nature des tissus prélevés, la possibilité de réaliser des tests de dépistage d'EST ainsi que leur modalité de réalisation.

Les experts se sont particulièrement intéressés à la variabilité de la charge infectieuse en fonction des matrices prélevées et du type d'EST. Différentes représentations ont été élaborées afin d'évaluer le risque de transmission du prion en se basant sur les données disponibles dans la littérature relatives au niveau d'infectiosité des différents tissus. La connaissance de cette infectiosité repose selon les cas, sur la réalisation de tests biochimiques ou de bioessais. La limite de détection de ces différentes méthodes dépend de la nature de la méthode mais également de la souche de prion (BSE, tremblante classique ou tremblante atypique). Quatre schémas d'évaluation de la DI résiduelle en fonction de la nature des matrices prélevées, ont été développés dans les contextes d'une infection par l'ESB classique (ou par l'ESB atypique), par la tremblante atypique et par la tremblante classique.

Pour résumer ces différentes représentations, et en l'absence de réalisation d'un test de dépistage, les DI les plus importantes susceptibles d'être administrées par l'intermédiaire d'un autovaccin sont constatées lorsque l'isolement bactérien a été effectué :

- sur le SNC pour toutes les EST des ruminants (cette valeur peut atteindre $10^{6,1}$ DI₅₀ IC pour l'ESB, $10^{6,8}$ DI₅₀ IC pour la tremblante classique et jusqu'à $10^{9,5}$ DI₅₀ IC dans le cas de la tremblante atypique) ;
- et sur le placenta, la rate, les nœuds lymphatiques (NL) (ou pus isolé d'abcès localisés sur un NL) ou à partir d'un écouvillon lacrymal pour la tremblante classique (valeur pouvant atteindre $10^{5,5}$ DI₅₀ IC).

4.2.3. Probabilité d'obtention d'un autovaccin contaminé par le prion au terme du processus de préparation.

Les différentes étapes de préparation d'un autovaccin ayant été rappelées, les experts ont évalué l'impact de ces modalités de préparation sur le risque de production d'un autovaccin contaminé par le prion.

Les experts ont cherché à estimer la probabilité de conserver tout au long des opérations de repiquages la dose de prion présente dans la prise d'essai initiale. La principale difficulté rencontrée pour évaluer cette probabilité tient à l'absence de données scientifiques publiées sur les relations pouvant exister entre le prion et les bactéries. De plus, le fait que le prion se présente essentiellement sous la forme d'agrégats, suggère qu'il ne sera pas dispersé de manière homogène dans le prélèvement et qu'il en sera de même tout au long des étapes conduisant à l'obtention de l'autovaccin. Ainsi, à chaque repiquage ou à chaque étape de dilution, il existe une forte incertitude quant au niveau de probabilité de prélever des colonies ou une prise d'essai « contaminées » par du prion.

Faute de pouvoir quantifier avec précision le niveau de réduction de l'infectiosité « prion », les experts ont donc développé quatre scénarios différents (voir page suivante) d'évaluation de l'impact des étapes de préparation de l'autovaccin sur la dose finale infectante contenue dans chaque dose vaccinale. Au final, ils ont estimé à 10^3 la réduction minimale du niveau d'infectiosité entre la matrice ayant servi à l'isolement de l'agent pathogène et la culture bactérienne préparée par le préparateur d'autovaccins (biomasse).

En ce qui concerne l'étape d'inactivation, sur la base des données disponibles, il a été considéré que, sans pouvoir l'établir avec précision, l'efficacité en matière de réduction de l'infectiosité « prion » des procédés d'inactivation utilisés, n'était pas nulle (> 1) mais au mieux faible ($< 1 \log_{10}$) (scénario le plus défavorable).

Le mode d'administration parentérale a été considéré comme entraînant une réduction du niveau d'infectiosité d'au moins un facteur de 10.

4.2.4. Appréciation globale de la probabilité de transmission du prion par usage d'autovaccins chez les ruminants.

Pour établir l'appréciation globale de la probabilité de survenue d'une transmission du prion par utilisation des autovaccins chez les ruminants, les experts ont tenu compte de plusieurs paramètres : la prévalence intercheptel et intracheptel, la taille du cheptel (nombre de doses vaccinales préparées et nombre d'animaux susceptibles de recevoir le vaccin), le nombre de doses vaccinales pouvant contenir du prion et la DI contenue dans chaque dose vaccinale injectée. Les deux derniers paramètres sont dépendants de la manière dont se répartissent, dans les doses vaccinales, les prions initialement présents dans la prise d'essai réalisée pour l'isolement et l'identification bactérienne et pouvant être conservés tout au long du processus de préparation de l'autovaccin. Afin de pallier les manques de connaissances liées à ces deux derniers points, les experts du GT ont construit quatre scénarios de répartition de la charge infectieuse :

- Scénario 1 : le prion reste tout au long du processus de préparation, sous la forme d'agrégats associés aux bactéries initialement prélevées qui se retrouvent toutes dans une seule dose vaccinale. Cette dose vaccinale contient donc au final l'intégralité de la charge infectieuse de départ.

- Scénario 2 : le ou les agrégats de prion se dissocient et la charge infectieuse se dilue progressivement au cours des différentes étapes de préparation de l'autovaccin, chaque dose vaccinale contenant à terme une charge infectieuse équivalente.

- Scénario 3 : lors des étapes de repiquage en milieu solide, le prion reste sous forme d'agrégats associés aux bactéries, mais en milieu de culture liquide, il se répartit de façon équivalente entre toutes les doses vaccinales.

- Scénario 4 : le prion reste tout au long du processus de préparation, sous la forme d'agrégats associés aux bactéries mais la charge infectieuse initiale se répartit de manière équivalente dans un nombre variable de doses vaccinales (1/3, 2/3 ou la totalité des doses vaccinales). Ce scénario, variante du scénario 1, peut être considéré comme le scénario le plus défavorable (conservation de l'intégralité de la charge infectieuse initiale et répartition de celle-ci dans un nombre plus ou moins important de doses vaccinales).

Ces scénarios permettent d'évaluer le niveau de charge infectieuse de la (des) dose(s) vaccinale(s) contaminée(s) et la probabilité de survenue de l'infection effective de l'animal. Les charges infectieuses retrouvées dans les doses vaccinales pour les scénarios 1 et 4, sont estimées réduites d'un facteur 10^{-3} par rapport à la dose initiale. Dans les scénarios 2 et 3, elles correspondent à une dilution de la DI initiale d'un facteur de 10^{-19} à 10^{-27} . Il n'existe pas de données précises sur la probabilité qu'un individu s'infecte ou non en recevant de telles charges infectieuses et, les données disponibles sur la relation dose/effet sont parcellaires, le plus souvent limitées à des doses infectantes supérieures ou égales à $0,1 DI_{50}$.

La combinaison des différentes probabilités, liées aux évènements successifs qui aboutissent à la survenue d'au moins un animal sensible infecté, par l'administration de l'autovaccin, permet d'évaluer la probabilité globale de cet évènement.

Compte tenu des divers éléments listés plus haut, les chiffres obtenus suite aux calculs sont entachés d'une certaine incertitude et il n'a pas été possible aux experts de hiérarchiser les différents scénarios développés par ordre de probabilité de survenue.

Les calculs montrent que, dans le cas des ESB, pour :

- une prévalence nationale de $3 \cdot 10^{-6}$ (prévalence cumulative des ESB classique et atypiques) ;
- une prévalence intratroupeau variant de 1 animal à 5% des animaux ;
- une taille de cheptel de 50 ou de 350 animaux ;
- et une DI dans la prise d'essai variant de 0,01 à 10 DI_{50} ;

la probabilité d'infecter au moins un animal sensible varie de $2 \cdot 10^{-20}$ à $1,2 \cdot 10^{-13}$ pour les 4 scénarios.

Dans le cas de la tremblante (classique ou atypique), pour les mêmes paramètres que pour l'ESB, à part la prévalence nationale qui est de $1 \cdot 10^{-4}$, la probabilité d'infecter au moins un animal sensible varie de $6,7 \cdot 10^{-19}$ à $4 \cdot 10^{-12}$ pour les 4 scénarios.

En conclusion, et malgré toutes les incertitudes évoquées ci-dessus, les experts estiment que la probabilité de transmission du prion par les autovaccins varie de nulle à quasi nulle (0 à 1 sur l'échelle Afssa 2008 et notamment la correspondance proposée entre les qualificatifs et leur valeurs ordinales) si les animaux sont exposés à des autovaccins préparés à partir de tissus qui conduisent à la présence d'une dose inférieure ou égale à 10 DI_{50} , dans la prise d'essai (soit une dose inférieure ou égale à $10^4 \text{ DI}_{50} \text{ IC}$ par g ou mL dans le prélèvement initial).

Il n'existe pas de données consensuelles sur la dynamique de contamination dans les conditions naturelles, en particulier dans les cheptels atteints de tremblante classique. Il est donc difficile de comparer cette probabilité de transmission de l'infection par un autovaccin, avec la progression naturelle de la maladie dans l'élevage. Toutefois, compte tenu des valeurs de probabilité d'infection d'au moins un animal sensible, obtenues dans les différents scénarios, le sur-risque représenté par l'usage d'un autovaccin dans de tels cheptels peut être considéré comme négligeable. Les souches de tremblante et d'ESB atypiques quant à elles, semblent avoir une transmissibilité en conditions d'élevage extrêmement limitée, voire nulle (elle reste toutefois possible en conditions expérimentales). L'emploi d'un autovaccin contaminé par du prion pourrait constituer un facteur potentiellement favorisant de la transmission de ce type de souches à l'intérieur de l'élevage sans toutefois majorer de manière significative le sur-risque par rapport aux souches classiques, compte tenu des valeurs de probabilité de survenue.

4.3. Recommandations

Les experts ont formulé un certain nombre de recommandations à suivre pour chacune des étapes qui conduisent à la préparation de l'autovaccin. Ces recommandations concernent les préleveurs (vétérinaires de terrain, techniciens de laboratoire), le laboratoire d'analyse en charge de l'isolement et de l'identification du germe responsable, le laboratoire préparant l'autovaccin et enfin l'utilisateur final de la préparation vaccinale.

Les recommandations les plus importantes sont les suivantes :

- étant donné les incertitudes évoquées, éviter l'emploi des tissus suivants pour l'isolement de l'agent bactérien responsable :
 - le SNC pour tous les ruminants (sauf les bovins de moins de 12 mois et les petits ruminants de moins de 3 mois) ;

- les tissus lymphoïdes (NL, rate, etc.), le pus isolé d'abcès localisés sur un NL, l'écouvillon lacrymal réalisé avec frottement de la face interne de la 3^{ème} paupière et le placenta chez les petits ruminants.

- effectuer chez le préparateur au moins trois repiquages en milieu solide avant ensemencement de milieux de fabrication de la biomasse, en minimisant autant que faire se peut la prise d'essai à chaque opération;
- privilégier des matériels à usage unique sur toute la chaîne de préparation des autovaccins ;
- et rappeler sur l'étiquetage des doses vaccinales l'espèce cible de ruminants ainsi que l'exploitation (n° de cheptel par exemple) concernée par l'emploi exclusif de cet autovaccin.

4.4. Conclusions

Le bilan des connaissances dressé par les experts confirme :

- l'intérêt de pouvoir à nouveau fabriquer des autovaccins pour un certain nombre de maladies bactériennes des ruminants, afin de répondre à des besoins liés à la paupérisation de l'arsenal thérapeutique, notamment en matière de vaccins pour les petits ruminants ainsi qu'aux recommandations du plan Ecoantibio 2017;
- la très grande diversité des matrices susceptibles d'être utilisées pour l'isolement bactérien, associée à une grande variabilité de l'infectiosité de ces matrices en fonction de l'espèce de ruminant et de la nature de la souche de prion ;
- une évolution favorable de la situation épidémiologique de la France vis-à-vis des EST (prévalence estimée à $1 \cdot 10^{-4}$ chez les petits ruminants et $1 \cdot 10^{-6}$ chez les bovins) tout en soulignant que les EST persistent sur notre territoire sous forme sporadique.

Ce bilan fait apparaître toutefois l'absence de données notamment sur l'affinité du prion vis-à-vis des bactéries et sur les limites de détection des tests sur certains tissus. Il met également en évidence la difficulté de quantifier le facteur de réduction de l'infectiosité au cours de la préparation de l'autovaccin du fait, en particulier, d'un prion se présentant sous la forme d'agrégats, de taille variable, de répartition hétérogène dans les tissus et de stabilité inconnue sous l'effet des différentes opérations de repiquage ou de culture en milieu liquide.

Compte tenu de ces différents éléments, les experts ont estimé la probabilité de transmission du prion, suite à l'utilisation d'un autovaccin chez les ruminants. Au terme de cette démarche, en lien avec les très faibles valeurs obtenues en combinant les probabilités des événements successifs aboutissant à cette transmission, et en évitant comme prélèvements employés pour l'isolement bactérien, le SNC pour tous les ruminants (sauf les bovins de moins de 12 mois et les petits ruminants de moins de 3 mois), les tissus lymphoïdes (NL, rate, etc.), le pus isolé d'abcès localisés sur un NL, l'écouvillon lacrymal réalisé avec frottement de la face interne de la 3^{ème} paupière et le placenta chez les petits ruminants, cette probabilité est estimée nulle à quasi nulle (0 à 1 sur une échelle de 0 à 9).

Concernant la préparation de l'autovaccin destiné à des ruminants, en plus des obligations réglementaires relatives aux milieux de culture et aux adjuvants, les experts recommandent la réalisation d'au moins trois repiquages en milieu solide chez le préparateur de l'autovaccin avant ensemencement du fermenteur et de privilégier l'emploi de matériel de culture à usage unique.

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du CES SABA relatives à l'évaluation de risque, en particulier de transmission du prion, en cas d'autorisation de l'usage des autovaccins chez les ruminants.

La Directrice Générale Suppléante

Caroline Gardette

MOTS-CLES

Autovaccins, ruminants, bovins, chèvre, mouton, prion, ESB, EST, tremblante

BIBLIOGRAPHIE

Anses. 2013. Autovaccins à usage vétérinaire. Maisons-Alfort, France.

Demande d'évaluation de risque en cas d'autorisation de l'usage des autovaccins chez les ruminants

Saisine «2013-SA-0231 – Autovaccins ruminants»

Saisines liées : « 2011-SA-0156 » relative à l'efficacité et à l'innocuité des autovaccins

RAPPORT d'expertise collective

**« Comité d'experts spécialisé en santé et bien-être animal »
« GT Autovaccins Ruminants »**

Mars 2016

Mots clés

Autovaccins, ruminants, bovins, chèvre, mouton, prion, ESB, EST, tremblante.

Résumé de l'expertise collective

La DGAL a sollicité l'Anses pour une évaluation de risque en cas d'autorisation de l'usage des autovaccins chez les ruminants. La question principale posée par la saisine porte sur le risque de transmission iatrogène de prions au sein d'un troupeau si l'animal, source de l'échantillon utilisé pour préparer l'autovaccin, est lui-même déjà contaminé par un prion pathologique.

Le risque lié à une inoculation accidentelle au manipulateur d'un autovaccin pouvant contenir du prion a été écarté compte tenu de la rareté de cet événement, des précautions prises, de la quantité minimale de dose infectieuse susceptible d'être injectée et de l'existence de la barrière à la transmission inter-espèces.

CONTEXTE

Le rapport débute par un premier chapitre sur le contexte des décisions réglementaires de 2003, visant à interdire les autovaccins chez les bovins, ovins et caprins, pour ensuite dans le second chapitre, aborder la place potentielle des autovaccins en thérapeutique des ruminants. Un état des lieux des possibilités en matière de vaccins chez les ruminants est présenté, suivi d'un rappel sur la variabilité antigénique bactérienne et sur l'absence(s) de protection croisée(s) pour certaines bactéries. Les principales utilisations d'autovaccins chez les ruminants avant l'interdiction de 2003, sont ensuite rappelées. Les experts concluent que compte tenu des éléments présentés dans ce chapitre, les principales matrices à partir desquelles sont isolés les agents pathogènes pouvant servir à la préparation d'autovaccins sont essentiellement et par ordre de fréquence : le lait, le poumon, les matières fécales, le pus et le placenta ou les lochies. Néanmoins, des autovaccins pouvant éventuellement être produits à partir d'autres matrices, l'évaluation ne se limitera pas à celles-ci.

ÉTAT DES CONNAISSANCE EN MATIÈRE D'EST

La troisième partie du rapport dresse un état des connaissances en matière d'encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESB classique et atypique L ou H, tremblante classique et atypique des petits ruminants).

Situation épidémiologique actuelle en France

Considérant les données épidémiologiques actuelles sur les ESB en France, les experts concluent que les mesures actuellement en vigueur (notamment vis-à-vis de l'alimentation animale), si elles demeurent appliquées, devraient permettre de garantir l'absence de réémergence de l'ESB. Toutefois l'existence de cas spontanés d'ESB classique ne peut être exclue. En outre, compte tenu des incertitudes relatives (i) à l'origine des cas d'ESB atypique et (ii) à la capacité du système de surveillance à les détecter, il semble avisé de considérer qu'un nombre limité de cas d'ESB atypique persiste dans la population bovine française.

La situation en matière de tremblante classique et atypique des petits ruminants s'est beaucoup améliorée en France, au cours de la décennie écoulée. Chez les ovins, la prévalence globale des deux formes de tremblante est d'environ 0,11 cas pour 10 000 animaux abattus. Cette valeur ne doit toutefois pas occulter l'existence d'un nombre significatif de foyers de tremblante classique et atypiques qui ne sont pas détectés, compte tenu (i) des outils de détection utilisés et (ii) du

système de surveillance (échantillonnage de la population : 10 000 tests réalisés pour 550 000 ovins adultes abattus).

Depuis 2005, aucun cas d'ESB n'a été détecté chez les petits ruminants en France. Les modifications du système de surveillance chez les bovins et les petits ruminants survenues au cours des dernières années (diminution du nombre de tests et/ou modifications des populations cibles) sont susceptibles toutefois de diminuer la capacité de détection (sensibilité et précocité) d'une modification de la situation épidémiologique de ces maladies.

Ainsi, bien que la situation épidémiologique se soit significativement améliorée, les EST persistent probablement sous une forme sporadique, difficilement détectable dans les populations de ruminants de rente en France.

Mode de contamination et dose infectante (DI)

Les experts rappellent que, chez les ruminants, la voie orale semble être le mode de contamination naturelle le plus fréquent. Néanmoins, de nombreuses expériences menées dans différents modèles animaux d'EST ont permis de démontrer la transmissibilité expérimentale de ces agents par d'autres voies. L'efficacité des différentes voies d'inoculation est variable en fonction de l'espèce-hôte et de la souche considérée. Il est raisonnable de considérer d'une façon générale pour toutes les souches, que la voie intracérébrale est la voie de transmission la plus efficace ; les voies parentérales ont une efficacité intermédiaire entre la voie intracérébrale et la voie orale. L'ensemble des données disponibles indique que la voie parentérale est au minimum 10 fois moins efficace que la voie intracérébrale.

Facteurs de variation de la sensibilité aux EST

La sensibilité, notamment des petits ruminants, aux agents responsables d'EST, est fortement influencée par les polymorphismes du gène *PNRP* qui code la protéine Prion.

Distribution de l'infectiosité

La distribution de l'infectiosité (exprimée en DL_{50} ou DI_{50} par gramme ou par mL de tissu pour une espèce considérée et pour une voie de contamination donnée) laisse apparaître que la charge infectieuse des tissus et des fluides biologiques évolue avec le stade de la maladie et celui du couple souche-hôte considéré. Les distributions de l'infectiosité dans le cas de la tremblante classique du mouton (distribution dans de nombreux organes et fluides) et de l'ESB classique chez les bovins (présence essentiellement dans le système nerveux central et des portions de l'intestin) ont été largement étudiées. Peu de données sont actuellement disponibles pour les distributions dans les formes atypiques de tremblante (petits ruminants) et d'ESB (bovins).

En fonction des espèces et des prions concernés, les niveaux d'infectiosité varient de 1 DL_{50} (lait, sang) à 10^8 DL_{50} (cerveau) par gramme de tissu ou mL de fluide en transmission intra-spécifique par voie intracérébrale.

APPRECIATION DU RISQUE DE TRANSMISSION DU PRION PAR L'EMPLOI D'AUTOVACCINS CHEZ LES RUMINANTS EN FRANCE.

L'appréciation du risque de transmission du prion par l'emploi d'autovaccins chez les ruminants a été évaluée dans une quatrième partie. Pour cela, les experts ont défini l'évènement indésirable à considérer comme étant le fait d'infecter, par l'utilisation d'un autovaccin, au moins un animal sensible. Sa probabilité de survenue dépend de la combinaison de plusieurs probabilités de survenue d'évènements qui ont été successivement évaluées (voir Figure 2 page 37).

Probabilité de réaliser un prélèvement dans un cheptel infecté et de prélever un individu infecté.

Cette probabilité découle d'une part de la prévalence nationale estimée à $3 \cdot 10^{-6}$ pour les ESB (les ESB atypiques ayant été assimilées à l'ESB classique) et $1 \cdot 10^{-4}$ pour les tremblantes des petits ruminants ; d'autre part, de la prévalence intracheptel qui apparaît très variable en fonction du type d'EST. Pour les calculs les experts ont utilisé deux valeurs : soit un seul cas présent dans le troupeau (cas des ESB et de la tremblante atypique) soit présence de cas multiples (cas de la tremblante classique) et la valeur de 5% a été choisie.

Probabilité d'infection des matrices utilisables pour la réalisation de l'isolement bactérien.

Les experts ont ensuite évalué la probabilité d'infection des matrices utilisables et les facteurs de variabilité de leur niveau d'infectiosité, en prenant en compte les matrices les plus couramment employées pour la recherche de l'agent bactérien responsable de maladie, mais aussi en incluant les matrices présentant les plus forts niveaux d'infectiosité, de manière à pouvoir évaluer le niveau de risque maximal. Cette probabilité dépend de facteurs tenant à l'animal, les plus influents étant son âge et le génotype (résistant ou non). Les facteurs extrinsèques sont la nature de la souche de prion, la nature des tissus prélevés, la possibilité de réaliser des tests de dépistage d'EST ainsi que leur modalité de réalisation.

Les experts se sont particulièrement intéressés à la variabilité de la charge infectieuse en fonction des matrices prélevées et du type d'EST. Différentes représentations ont été élaborées afin d'évaluer le risque de transmission du prion en se basant sur les données disponibles dans la littérature relatives au niveau d'infectiosité des différents tissus. Cette infectiosité repose selon les cas, sur la réalisation de tests biochimiques ou de bioessais. La limite de détection de ces différentes méthodes est différente selon la nature de la méthode mais également selon la souche de prion (BSE, tremblante classique ou tremblante atypique). Quatre schémas d'évaluation de la DI résiduelle en fonction de la nature des matrices prélevées, ont été développés dans les contextes d'une infection par l'ESB classique (ou par l'ESB atypique), par la tremblante atypique et par la tremblante classique.

Pour résumer ces différentes représentations, et en l'absence de réalisation d'un test de dépistage, les DI les plus importantes susceptibles d'être administrées par l'intermédiaire d'un autovaccin sont constatées lorsque l'isolement bactérien a été effectué :

- sur le SNC pour toutes les EST des ruminants (cette valeur peut atteindre $10^{6,1}$ DI₅₀ IC pour l'ESB, $10^{6,8}$ DI₅₀ IC pour la tremblante classique et jusqu'à $10^{9,5}$ DI₅₀ IC dans le cas de la tremblante atypique) ;
- et sur le placenta, la rate, les nœuds lymphatiques (NL) (ou pus isolé d'abcès localisés sur un NL) ou à partir d'un écouvillon lacrymal pour la tremblante classique (valeur pouvant atteindre $10^{5,5}$ DI₅₀ IC).

Probabilité d'obtention d'un autovaccin contaminé par le prion au terme du processus de préparation.

Les différentes étapes de préparation d'un autovaccin ayant été rappelées, les experts ont évalué l'impact de ces modalités de préparation sur le risque de production d'un autovaccin contaminé par le prion.

Les experts ont cherché à estimer la probabilité de conserver tout au long des opérations de repiquages la dose de prion présente dans la prise d'essai initiale. La principale difficulté

rencontrée pour évaluer cette probabilité tient à l'absence de données scientifiques publiées sur les relations pouvant exister entre le prion et les bactéries. De plus, le fait que le prion se présente essentiellement sous la forme d'agrégats, suggère qu'il ne sera pas dispersé de manière homogène dans le prélèvement et qu'il en sera de même tout au long des étapes conduisant à l'obtention de l'autovaccin. Ainsi, à chaque repiquage ou à chaque étape de dilution, il existe une forte incertitude quant au niveau de probabilité de prélever des colonies ou une prise d'essai « contaminées » par du prion.

Faute de pouvoir quantifier avec précision le niveau de réduction de l'infectiosité « prion », les experts ont développé quatre scénarios différents d'évaluation de l'impact des étapes de préparation de l'autovaccin sur la dose finale infectante contenue dans chaque dose vaccinale. Au final, ils ont estimé à 10^3 la réduction minimale du niveau d'infectiosité entre la matrice ayant servi à l'isolement de l'agent pathogène et la culture bactérienne préparée par le préparateur d'autovaccins (biomasse).

En ce qui concerne l'étape d'inactivation, sur la base des données disponibles, il a été considéré que, sans pouvoir l'établir avec précision, l'efficacité en matière de réduction de l'infectiosité « prion » des procédés d'inactivation utilisés, n'était pas nulle (> 1) mais au mieux faible ($< 1 \log_{10}$) (scénario le plus défavorable).

Le mode d'administration parentérale a été considéré comme entraînant une réduction du niveau d'infectiosité d'au moins un facteur de 10.

Appréciation globale de la probabilité de transmission du prion par usage d'autovaccins chez les ruminants.

Pour établir l'appréciation globale de la probabilité de survenue d'une transmission du prion par utilisation des autovaccins chez les ruminants, les experts ont tenu compte de plusieurs paramètres : la prévalence intercheptel et intracheptel, la taille du cheptel (nombre de doses vaccinales préparées et nombre d'animaux susceptibles de recevoir le vaccin), le nombre de doses vaccinales pouvant contenir du prion et la DI contenue dans chaque dose vaccinale injectée. Les deux derniers paramètres sont dépendants de la manière dont se répartissent, dans les doses vaccinales, les prions initialement présents dans la prise d'essai réalisée pour l'isolement et l'identification bactérienne et pouvant être conservés tout au long du processus de préparation de l'autovaccin.

Afin de pallier les manques de connaissances liées à ces deux derniers points, les experts du GT ont construit quatre scénarios de répartition de la charge infectieuse :

- **Scénario 1** : le prion reste tout au long du processus de préparation, sous la forme d'agrégats associés aux bactéries qui se retrouvent toutes dans une seule dose vaccinale. Cette dose vaccinale contient donc au final l'intégralité de la charge infectieuse de départ.

- **Scénario 2** : le ou les agrégats de prion se dissocient et la charge infectieuse se dilue progressivement au cours des différentes étapes de préparation de l'autovaccin, chaque dose vaccinale contenant à terme une charge infectieuse équivalente.

- **Scénario 3** : lors des étapes de repiquage en milieu solide, le prion reste sous forme d'agrégats associés aux bactéries, mais en milieu de culture liquide, il se répartit de façon équivalente entre toutes les doses vaccinales.

- **Scénario 4** : le prion reste tout au long du processus de préparation, sous la forme d'agrégats associés aux bactéries mais la charge infectieuse initiale se répartit de manière équivalente dans un nombre variable de doses vaccinales (1/3, 2/3 ou la totalité des doses vaccinales). Ce scénario, variante du scénario 1, peut être considéré comme le scénario le plus défavorable (conservation

de l'intégralité de la charge infectieuse initiale et répartition de celle-ci dans un nombre plus ou moins important de doses vaccinales).

Ces scénarios permettent d'évaluer le niveau de charge infectieuse de ou des dose(s) vaccinale(s) contaminée(s) et la probabilité de survenue de l'infection effective de l'animal. Les charges infectieuses retrouvées dans les doses vaccinales pour les scénarios 1 et 4, sont estimées réduite d'un facteur 10^{-3} par rapport à la dose initiale. Dans les scénarios 2 et 3, elles correspondent à une dilution de la DI initiale d'un facteur de 10^{-19} à 10^{-27} . Il n'existe pas de données précises sur la probabilité qu'un individu s'infecte ou non en recevant de telles charges infectieuses et, les données disponibles sur la relation dose/effet sont parcellaires, le plus souvent limitées à des doses infectantes supérieures ou égales à $0,1 DI_{50}$.

La combinaison des différentes probabilités liées aux évènements successifs qui aboutissent à la survenue d'au moins un animal sensible infecté par l'administration de l'autovaccin permet d'évaluer la probabilité globale de cet évènement.

Compte tenu des divers éléments listés plus haut, les chiffres obtenus suite aux calculs sont entachés d'une certaine incertitude et il n'a pas été possible aux experts de hiérarchiser les différents scénarios développés par ordre de probabilité de survenue.

Les calculs montrent que, dans le cas des ESB, pour :

- une prévalence nationale de $3 \cdot 10^{-6}$ (prévalence cumulative des ESB classique et atypiques),
- une prévalence intratroupeau variant de 1 animal à 5% des animaux ;
- une taille de cheptel de 50 ou de 350 animaux,
- et une DI dans la prise d'essai variant de $0,01$ à $10 DI_{50}$

la probabilité d'infecter au moins un animal sensible varie de $2 \cdot 10^{-20}$ à $1,2 \cdot 10^{-13}$ pour les 4 scénarios.

Dans le cas de la tremblante (classique ou atypique), pour les mêmes paramètres que pour l'ESB, à part la prévalence nationale qui est de $1 \cdot 10^{-4}$, la probabilité d'infecter au moins un animal sensible varie de $6,7 \cdot 10^{-19}$ à $4 \cdot 10^{-12}$ pour les 4 scénarios.

En conclusion, et malgré toutes les incertitudes évoquées ci-dessus, les experts estiment que la probabilité de transmission du prion par les autovaccins varie de nulle à quasi nulle (0 à 1 sur l'échelle Afssa 2008 et notamment la correspondance proposée entre les qualificatifs et leur valeurs ordinales) si les animaux sont exposés à des autovaccins préparés à partir de tissus qui conduisent à la présence d'une dose inférieure ou égale à $10 DI_{50}$, dans la prise d'essai (soit une dose inférieure ou égale à $10^4 DI_{50}$ IC par g ou mL dans le prélèvement initial). Il n'existe pas de données consensuelles sur la dynamique de contamination dans les conditions naturelles, en particulier dans les cheptels atteints de tremblante classique. Il est donc difficile de comparer cette probabilité de transmission de l'infection par un autovaccin, avec la progression naturelle de la maladie dans l'élevage. Toutefois, compte tenu des valeurs de probabilité d'infection d'au moins un animal sensible, obtenues dans les différents scénarios, le sur-risque représenté par l'usage d'un autovaccin dans de tels cheptels peut être considéré comme négligeable. Les souches de tremblante et d'ESB atypiques quant à elles, semblent avoir une transmissibilité en conditions d'élevage extrêmement limitée, voire nulle (elle reste toutefois possible en conditions expérimentales). L'emploi d'un autovaccin contaminé par du prion pourrait constituer un facteur potentiellement favorisant de la transmission de ce type de souches à l'intérieur de l'élevage sans toutefois majorer de manière significative le sur-risque par rapport aux souches classiques, compte tenu des valeurs de probabilité de survenue.

RECOMMANDATIONS

Les experts ont formulé un certain nombre de recommandations à suivre pour chacune des étapes qui conduisent à la préparation de l'autovaccin. Ces recommandations concernent les préleveurs (vétérinaires de terrain, techniciens de laboratoire), le laboratoire d'analyse en charge de l'isolement et de l'identification du germe responsable, le laboratoire préparant l'autovaccin et enfin l'utilisateur final de la préparation vaccinale.

Les recommandations les plus importantes sont de

- étant donné les incertitudes évoquées, éviter l'emploi des tissus suivants pour l'isolement de l'agent bactérien responsable :
 - le SNC pour tous les ruminants (sauf les bovins de moins de 12 mois et les petits ruminants de moins de 3 mois) ;
 - les tissus lymphoïdes (NL, rate, etc.), le pus isolé d'abcès localisés sur un NL, l'écouvillon lacrymal réalisé avec frottement de la face interne de la 3^{ème} paupière et le placenta chez les petits ruminants.
- effectuer chez le préparateur au moins trois repiquages en milieu solide avant ensemencement de milieux de fabrication de la biomasse, en minimisant autant que faire se peut la prise d'essai à chaque opération;
- privilégier des matériels à usage unique sur toute la chaîne de préparation des autovaccins ;
- et rappeler sur l'étiquetage des doses vaccinales l'espèce de ruminants ainsi que l'exploitation (n° de cheptel par exemple) concernée par l'emploi exclusif de cet autovaccin.

CONCLUSIONS

Le bilan des connaissances dressé par les experts confirme :

- l'intérêt de pouvoir à nouveau fabriquer des autovaccins pour un certain nombre de maladies bactériennes des ruminants, afin de répondre à des besoins liés à la paupérisation de l'arsenal thérapeutique, et aux recommandations du plan Ecoantibio 2017, notamment en matière de vaccins pour les petits ruminants ;
- la très grande diversité des matrices susceptibles d'être utilisées pour l'isolement bactérien, associée à une grande variabilité de l'infectiosité de ces matrices en fonction de l'espèce de ruminant et de la nature de la souche de prion ;
- une évolution favorable de la situation épidémiologique de la France vis-à-vis des EST (prévalence estimée à $1 \cdot 10^{-4}$ chez les petits ruminants et $1 \cdot 10^{-6}$ chez les bovins) tout en soulignant que les EST persistent sur notre territoire sous forme sporadique.

Ce bilan fait apparaître toutefois l'absence de données notamment sur l'affinité du prion vis-à-vis des bactéries et sur les limites de détection des tests sur certains tissus. Il met également en évidence la difficulté de quantifier le facteur de réduction de l'infectiosité au cours de la préparation de l'autovaccin du fait, en particulier, d'un prion se présentant sous la forme d'agrégats, de taille variable, de répartition hétérogène dans les tissus et de stabilité inconnue sous l'effet des différentes opérations de repiquage ou de culture en milieu liquide.

Compte tenu de ces différents éléments, les experts ont estimé la probabilité de transmission du prion suite à l'utilisation d'un autovaccin chez les ruminants. Au terme de cette démarche, en lien avec les très faibles valeurs obtenues en combinant les probabilités des événements successifs aboutissant à cette transmission, et en évitant comme prélèvements employés pour l'isolement bactérien, le SNC pour tous les ruminants (sauf les bovins de moins de 12 mois et les petits

ruminants de moins de 3 mois), les tissus lymphoïdes (NL, rate, etc.), le pus isolé d'abcès localisés sur un NL, l'écouvillon lacrymal réalisé avec frottement de la face interne de la 3^{ème} paupière et le placenta chez les petits ruminants, cette probabilité est estimée nulle à quasi nulle (0 à 1 sur une échelle de 0 à 9).

Concernant la préparation de l'autovaccin destiné à des ruminants, en plus des obligations réglementaires relatives aux milieux de culture et aux adjuvants, les experts recommandent la réalisation d'au moins trois repiquages en milieu solide chez le préparateur de l'autovaccin avant ensemencement du fermenteur et de privilégier l'emploi de matériel de culture à usage unique.

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, en fonction de leur domaine de compétence, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GROUPE DE TRAVAIL

Présidente

Mme Jaqueline VIALARD – Anses – Compétences en maladies animales (dont EST), diagnostic, microbiologie, épidémiologie.

Membres

M. Olivier ANDRÉOLETTI – ENVN – Compétences en encéphalopathies spongiformes transmissibles, prion. M. Andréoletti n'a plus participé aux réunions du GT à partir du 20 novembre 2015 et n'est pas intervenu dans la validation du rapport.

Mme Séverine BOULLIER – ENVN – Compétences en Immunologie, infectiologie, médicament vétérinaire.

M. Eric COLLIN – Vétérinaire libéral – Vétérinaire praticien, compétences pathologie des ruminants, épidémiologie descriptive.

M. Emmanuel COMOY – CEA – Compétences en encéphalopathies spongiformes transmissibles, prion.

M. Bertrand FAROULT – Vétérinaire libéral – Vétérinaire praticien, compétences en médecine des ruminants.

M. Yves MILLEMANN – ENVA – Compétences en pathologie du bétail, microbiologie.

PERSONNALITE SCIENTIFIQUE RAPPORTEUR

M. Guillaume FOURNIÉ - Royal Veterinary College (UK) – Compétences en évaluation des risques quantitative et qualitative, modélisation, épidémiologie.

COMITE D'EXPERTS SPECIALISE

Les travaux, objets du présent rapport, ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

- CES SANT du 8 mars 2016

Président

M. Etienne THIRY – Faculté de médecine vétérinaire de Liège (BE) – Compétences en virologie, immunologie.

Membres

Mme Suzanne BASTIAN – ONIRIS Nantes – Compétences en épidémiologie, bactériologie, parasitologie.

Mme Catherine BELLOC - ONIRIS Nantes – Compétences en Médecine des animaux d'élevage, monogastriques.

M. Alain BOISSY – INRA – Compétences en éthologie, bien-être animal, ruminants, zootechnie.

- M. Jordi CASAL - Universitat Autònoma de Barcelona (ES) – Compétences en zoonose, épidémiologie quantitative, maladies animales exotiques, analyse quantitative des risques.
- M. Christophe CHARTIER – ONIRIS Nantes – Compétences en parasitologie, pathologie des petits ruminants, technique d'élevage, épidémiologie.
- M. Eric COLLIN – Vétérinaire praticien – Compétences en pathologie des ruminants.
- M. Frédéric DELBAC – CNRS – Compétences en abeilles, épidémiologie, parasitologie, microbiologie.
- M. Christian DUCROT – INRA – Compétences en épidémiologie quantitative, prion, antibiorésistance, éco-pathologie.
- Mme Barbara DUFOUR – ENV Alfort – Compétences en épidémiologie, maladies infectieuses, pathologie des ruminants.
- M. Guillaume FOURNIÉ - Royal Veterinary College (UK) – Compétences en évaluation des risques quantitative et qualitative, modélisation, épidémiologie.
- M. Jean-Pierre GANIÈRE – ONIRIS Nantes – Compétences en maladies contagieuses, réglementation, zoonoses.
- M. Dominique GAUTHIER - Laboratoire départemental 05 – Compétences en faune sauvage, lagomorphes, méthodes de diagnostic.
- M. Etienne GIRAUD – INRA – Compétences en antibiorésistance, environnement, approche globale de la santé animale.
- M. Jacques GODFROID - Université Arctique de Norvège (NO) – Compétences en évaluation des risques, zoonose, épidémiologie, tuberculose, bactériologie, faune sauvage marine.
- M. Jean-Luc GUÉRIN – ENVT – Compétences en pathologie des volailles et lagomorphes, immunologie, virologie, zoonose et santé publique.
- M. Jean GUILLOTIN – Laboratoire départemental 59 – Généraliste, compétences en méthodes de diagnostic, porcs, faune sauvage.
- Mme Nadia HADDAD – Anses UMR BIPAR, ENV Alfort – Compétences en microbiologie, épidémiologie, maladies contagieuses.
- M. Jean HARS – Office national de la chasse et de la faune sauvage – Compétences en pathologie de la faune sauvage libre, épidémiologie.
- Mme Véronique JESTIN – Compétences en virologie aviaire, parasitologie aviaire, franchissement de la barrière d'espèce.
- Mme Elsa JOURDAIN – INRA – Compétences en zoonoses, épidémiologie quantitative, faune sauvage.
- Mme Claire LAUGIER – Anses Dozulé – Compétences en pathologie équine, diagnostic de laboratoire.
- Mme Monique L'HOSTIS – Oniris – Généraliste, compétences en parasitologie, abeilles, faune sauvage.
- Mme Coralie LUPO – IFREMER – Compétences en épidémiologie, pathologies aviaire et aquacole.
- M. Gilles MEYER – ENV Toulouse – Compétences en pathologie des ruminants, virologie.
- M. Pierre MORMÈDE – INRA Toulouse – Compétences en génétique du stress, endocrinologie, bien-être animal.

Mme Carine PARAUD – Anses – Compétences en statistiques, pathologie des petits ruminants, parasitologie de terrain.

Mme Claire PONSART – Anses – Compétences en épidémiologie, bactériologie, statistiques, virologie, pathologie de la reproduction.

Mme Nathalie RUVOEN – ONIRIS Nantes – Compétences en maladies contagieuses, zoonoses, réglementation

M. Claude SAEGERMAN – Faculté de médecine vétérinaire de Liège – Compétences en épidémiologie, maladies contagieuses, maladies émergentes.

M. Stéphan ZIENTARA – Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort – Compétences en virologie.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme Charlotte DUNOYER - Chef d'unité UERSABA - Anses

Mme Florence ÉTORÉ - Adjointe Chef d'unité UERSABA - Anses

Equipe projet

Thomas MAIGNIEN - Coordinateur Scientifique UERALIM - Anses

Jean-Claude ROUBY - Agence nationale du médicament vétérinaire - Anses

Secrétariat administratif

M. Régis MOLINET - Anses

AUDITION DE PERSONNALITES EXTERIEURES

Mme., Dr Sylvie BLAIN-CARTIER, le 6 mai 2015, vétérinaire praticien, référent commission caprine de la SNGTV.

Mr., Dr Pierre AUTEF, le 13 mai 2015, vétérinaire praticien, référent commission ovine de la SNGTV.

Mme., Dr Christine FILLIAT, le 29 juillet 2015, vétérinaire praticien à Chateauneuf sur Isère.

Mr., Dr Jocelyn AMIOT le 21 aout 2015, vétérinaire praticien, référent commission vaches allaitantes de la SNGTV.

Mr., Dr AUBADIE-LADRIX le 21 aout 2015, praticien, référent commission vaches laitières de la SNGTV.

Mr., Dr Loïc GUIOUIILLER le 4 septembre 2015, vétérinaire praticien, référent médecines alternatives de la SNGTV.

L'institut en Santé Agronomie Environnement (ISAE 35) le 7 septembre 2015.

Le laboratoire Filavie le 7 septembre et 13 novembre 2015.

Le laboratoire Labocéa le 14 septembre et 6 novembre 2015.

Le laboratoire Biovac le 15 septembre et 18 novembre 2015.

Mr., Dr Bernard POUTREL le 8 octobre 2015 (INRA).

Mr., Dr Pascal RAINARD les 8 et 14 octobre 2015, Directeur de recherche UMR 1282 Infectiologie et Santé publique (INRA, Nouzilly).

SOMMAIRE

Résumé de l'expertise collective	3
Présentation des intervenants.....	10
Liste des tableaux.....	15
Liste des figures.....	16
Sigles et abréviations.....	17
1. Contexte et objet de la saisine	19
2. Organisation de l'expertise	19
3. Périmètre et limitations du champ d'expertise.....	21
3.1. Définitions.....	21
3.2. Périmètre de la saisine	22
4. Analyse et conclusions du GT Autovaccins ruminants et du CES SABA.....	23
4.1. Contexte des décisions réglementaires de 2003 d'interdiction d'emploi d'autovaccins chez les ruminants	23
4.2. Place potentielle des autovaccins en thérapeutique vétérinaire	24
4.2.1. Etat des lieux des potentialités en matière de vaccins chez les ruminants	24
4.2.2. Rappels sur la variabilité antigénique bactérienne et sur l'absence(s) de protection croisée(s) pour certaines bactéries	25
4.2.3. Principales utilisations d'autovaccins chez les ruminants avant l'interdiction de 2003.....	26
4.3. Etat des connaissances en matière d'EST	28
4.3.1. Situation épidémiologique actuelle en France.....	28
4.3.1.1. Souches de prion.....	28
4.3.1.2. Evolution des EST en France – surveillance en France.....	28
4.3.2. Mode de contamination et dose infectante.....	31
4.3.3. Facteurs de variation de la sensibilité aux EST.....	33

4.3.4.	Distribution de l'infectiosité.....	33
4.4.	Appréciation de la probabilité de transmission du prion par l'emploi d'autovaccins chez les ruminants en France	36
4.4.1.	Evaluation de la probabilité de réalisation d'un prélèvement sur un animal infecté	37
4.4.2.	Evaluation de la probabilité d'infection des matrices utilisables pour la réalisation de l'isolement bactérien et étude des facteurs de variabilité du niveau d'infectiosité de ces matrices	38
4.4.2.1.	Facteurs intrinsèques (tenant à l'animal) de variabilité de l'infectiosité tissulaire.....	39
4.4.2.2.	Les facteurs extrinsèques de variabilité de l'infectiosité tissulaire	39
4.4.2.3.	Estimation de la variabilité de la charge infectieuse en fonction des matrices et du type d'EST	40
4.4.3.	Evaluation de la probabilité d'obtention d'un autovaccin contaminé par le prion au terme du processus de préparation.....	48
4.4.3.1.	Rappels des différentes étapes de préparation d'un autovaccin	48
4.4.3.2.	Impact des modalités de préparation sur la probabilité de production d'un autovaccin contaminé par le prion	50
4.4.4.	Influence des modalités d'administration de l'autovaccin sur la probabilité d'infecter l'animal vacciné par du prion contenu dans la dose vaccinale	51
4.4.5.	Appréciation globale de la probabilité de transmission du prion par usage d'autovaccins chez les ruminants.....	52
4.4.6.	Incertitudes.....	56
4.5.	Recommandations.....	57
4.5.1.	Recommandations concernant le prélèvement	57
4.5.2.	Recommandations concernant la préparation de l'autovaccin.....	59
4.5.2.1.	Recommandations.....	59
4.5.2.2.	Cas des autovaccins fabriqués hors du territoire français	60
4.5.3.	Recommandations concernant les modalités de vaccination	60
4.6.	Conclusion.....	61

Annexe 1 : Lettre de saisine.....	73
Annexe 2 : Principales maladies des ruminants pour lesquelles existent des vaccins commercialisés en France	74
Annexe 3 : Tests de dépistage des EST	78
Annexe 4 : Valeurs d'infectiosité des tissus prises en compte dans l'appréciation de risque.....	80
Annexe 5 : Calcul de l'impact de la préparation de l'autovaccin sur le niveau d'infectiosité des doses vaccinales.....	87
Annexe 6 : Calculs pour l'appréciation globale du risque de transmission du prion par utilisation des autovaccins chez les ruminants.....	96
Annexe 7 : Qualificatifs des probabilités pour l'estimation qualitative du risque.....	106

Liste des tableaux

Tableau 1 : Prévalence des encéphalopathies spongiformes transmissibles en France.....	38
Tableau 2 : Résumé des résultats obtenus pour les valeurs des probabilités d'infecter au moins un animal sensible avec l'utilisation d'un autovaccin.	54
Tableau 3 : Sources et types d'incertitudes.....	56
Tableau 4 : Principales maladies des petits ruminants pour lesquelles existent des vaccins commercialisés en France	74
Tableau 5 : Principales maladies des bovins pour lesquelles existent des vaccins commercialisés en France.....	76
Tableau 6 : Valeurs d'infectiosité des tissus prises en compte dans l'appréciation de risque pour l'ESB classique des bovins	80
Tableau 7 : Valeurs d'infectiosité des tissus prises en compte dans l'appréciation de risque pour la tremblante atypique des petits ruminants	83
Tableau 8 : Valeurs d'infectiosité des tissus prises en compte dans l'appréciation de risque pour la tremblante classique des petits ruminants.....	85
Tableau 9: Calcul de la probabilité d'infecter un animal sensible dans le cas du scénario 1.....	97
Tableau 10: Calcul de la probabilité d'infecter au moins un animal sensible dans le cas du scénario 2.	99
Tableau 11 : Calcul de la probabilité d'infecter au moins un animal sensible dans le cas du scénario 3.	100
Tableau 12: Calcul de la probabilité d'infecter au moins un animal sensible dans le cas du scénario 4.	103
Tableau 13 : Valeurs chiffrées proposées pour chaque qualificatif de probabilité et correspondance avec les valeurs ordinales	106

Liste des figures

Figure 1 : Quantités de cerveau de bovin au stade terminal de la maladie correspondant à une DL50 dans différents modèles (pour l'ESB classique).....	34
Figure 2 : Schématisation de la séquence d'évènements utilisée pour l'appréciation de la probabilité de transmission du prion par l'emploi d'autovaccins chez les ruminants en France	37
Figure 3 : Evaluation de la DI résiduelle en fonction de la nature des matrices prélevées pour la préparation d'un autovaccin, dans le cas de l'ESB classique des bovins et par extension d'ESB H ou L	44
Figure 4 : Evaluation de la DI résiduelle en fonction de la nature des matrices prélevées pour la préparation d'un autovaccin, dans le cas de la tremblante atypique des petits ruminants.	45
Figure 5 : Evaluation de la DI résiduelle en fonction de la nature des matrices prélevées pour la préparation d'un autovaccin, dans le cas de la tremblante classique des petits ruminants, pour un prélèvement pratiqué sur un animal vivant	46
Figure 6 : Evaluation de la DI résiduelle en fonction de la nature des matrices prélevées pour la préparation d'un autovaccin, dans le cas de la tremblante classique des petits ruminants, pour un prélèvement pratiqué sur un animal mort	47
Figure 7 : Scénario n°1 : Un ou des agrégats restant associés aux bactéries tout au long du processus de préparation (de l'isolement jusqu'à préparation de la suspension vaccinale), une seule dose vaccinale étant contaminée à la fin du processus.....	89
Figure 8 : Scénario n°2 : Les prions sont répartis de façon homogène dans la préparation et se diluent à chaque étape.....	91
Figure 9 : Scénario n°3 : Le prion reste sous forme d'agrégat(s) associé(s) aux bactéries lors des phases de repiquage en milieu solide puis se répartit de manière homogène dans le milieu lors des phases de culture en milieu liquide.	93
Figure 10 : Scénario n°4 : Le prion reste sous forme d'agrégat(s) associé(s) aux bactéries lors des phases de repiquage en milieu solide puis se répartit de manière homogène dans 1/3, 2/3 ou la totalité des doses vaccinales.	95
Figure 11 : Schéma illustrant le scénario 1.....	96
Figure 12 : Schéma illustrant les scénarios 2 et 3.	98
Figure 13 : Schéma illustrant le scénario 4.....	102

Sigles et abréviations

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANMV : Agence nationale du médicament vétérinaire

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

BALT : Abréviations de « *Bronchus Associated Lymphoid Tissue* » - tissu lymphoïde associé aux bronches

BPL : Bonnes pratiques de laboratoire

BPF : Bonnes pratiques de fabrication

BPP : Bonnes pratiques de préparation

CES : Comité d'experts spécialisés

DGAL : Direction générale de l'alimentation

DL₅₀ : Dose létale 50%

DI : Dose infectante

DI₅₀ : Dose infectante 50%

EFSA : *European Food Safety Authority* - Autorité européenne de sécurité des aliments

EL : Ecouvillon lacrymal

ESB : Encéphalopathie spongiforme bovine

ESST : Encéphalopathie spongiforme subaiguë transmissible

EST : Encéphalopathie spongiforme transmissible

GALT : Abréviations de « *Gut Associated Lymphoid Tissue* » - tissu lymphoïde associé au tube digestif

GT : Groupe de travail

IC : Intracérébrale

IHC : Immunohistochimie

IM : Intramusculaire

IP : Intrapéritonéale

ISAE : Institut en Santé Agro-Environnement

IV : Intraveineuse

LBA : Lavage bronchoalvéolaire

LMR : Limite maximale de résidus

LPS : Lipopolysaccharide

NL : nœud lymphatique

OIE : Organisation mondiale de la santé animale, ex Office international des épizooties

PMCA : *Protein Misfolding Cyclic Amplification*, technique d'amplification du prion dans un tube à essai.

PrP^c : forme normale (ou cellulaire) de la protéine du prion

PrP^{sc} : forme pathologique de la protéine du prion

SC : Sous-cutanée

SIMV : Syndicat du médicament vétérinaire

SNC : Système nerveux central

SNGTV : Société nationale des groupements techniques vétérinaires

Souris Tg Bov : souris transgénique exprimant la PrP^c bovine

Souris Tg Ov : souris transgénique exprimant la PrP^c ovine

v-MCJ : Variante de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob

WB : Western Blot

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

L'Anses a été saisie le 17 juin 2011 par le Syndicat de l'Industrie du médicament Vétérinaire et Réactif (SIMV) sur la problématique générale des autovaccins à usage vétérinaire (2011-SA-0156).

Dans son avis du 21 octobre 2013, l'Anses indiquait que le groupe de travail (GT) n'avait pas traité l'usage des autovaccins chez les ruminants du fait que cet usage n'était pas autorisé en France. En effet, l'arrêté du 2 décembre 2003 portant interdiction de la préparation, la mise sur le marché, la prescription, la délivrance, l'administration, l'importation et l'exportation des autovaccins à usage vétérinaire destinés aux bovins, ovins ou caprins à base de produits d'origine bovine, ovine ou caprine, et par application du principe de précaution relatif aux encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) dispose à son article 1 que « la préparation, la mise sur le marché, la prescription, la délivrance, l'administration, l'importation et l'exportation des autovaccins à usage vétérinaire définis au 3° de l'article L. 5141-2 du code de la santé publique destinés aux bovins, ovins ou caprins, à base de produits d'origine bovine, ovine ou caprine, à l'exception de ceux qui répondent aux exigences de la pharmacopée sur les ESST, sont interdites ».

Pour autant et compte tenu de l'évolution très favorable de la situation épidémiologique en matière d'ESST depuis 2003, l'Anses recommandait dans son avis du 21 octobre 2013 d'étudier la révision de la réglementation concernant les autovaccins chez les ruminants.

La DGAL rappelle dans sa lettre de saisine (Annexe 1) que la mesure 15 du plan Ecoantibio 2017 porte sur la promotion de la recherche dans le domaine de l'immunité et de l'utilisation de vaccins ou d'autovaccins. Cette mesure indique que le recours à la vaccination, lorsqu'il est possible pour la prévention de certaines pathologies, doit être encouragé et que, sous réserve d'une validation scientifique de leur intérêt thérapeutique et en l'absence de vaccins autorisés, le recours aux autovaccins peut être envisagé.

La DGAL a sollicité l'Anses pour une évaluation de risque en cas d'autorisation de l'usage des autovaccins chez les ruminants, en précisant qu'en cas d'avis favorable, l'arrêté du 2 décembre 2003 sera abrogé.

La question principale de la saisine porte spécifiquement sur le risque de transmission du prion. Pour y répondre, l'évaluation de risque nécessitera d'identifier les sources des prélèvements sur ruminants à des fins de préparation d'autovaccins. Ainsi, les besoins en autovaccins dans la filière ruminants seront rappelés. Par ailleurs, les experts préciseront s'ils ont mis en évidence des risques potentiels hors ESST, liés aux auto-vaccins chez les ruminants, qui n'aient pas déjà été identifiés dans la saisine 2011-SA-0156.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

Le traitement de la saisine relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisés « Santé et bien-être des animaux » (CES SABA). L'Anses a confié au groupe de travail « Autovaccins ruminants », rattaché au CES « SABA » l'instruction de cette saisine. Les travaux

d'expertise du groupe de travail ont été soumis au CES (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) les 8 décembre 2015 et le 12 janvier 2016. Le rapport d'expertise produit par le GT Autovaccins ruminants tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES. Ces analyses et conclusions sont issues d'un travail d'expertise collégiale au sein d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Les rapporteurs se sont réunis à 10 reprises entre avril 2015 et janvier 2016.

Le GT « Autovaccins ruminants » était constitué de sept experts issus de différents collectifs d'experts de l'Anses (CES SABA, CES Médicaments vétérinaires, GT EST¹ et GT Médicaments vétérinaires). La coordination de l'expertise était assurée par l'Unité d'évaluation des risques en santé, en alimentation et en bien-être des animaux (UERSABA) qui était appuyée par des experts agents de l'Anses et provenant de l'Unité d'évaluation des risques liés aux aliments (UERALIM) et de l'Agence du médicament vétérinaire (ANMV).

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

L'évaluation a été conduite en prenant en compte les éléments suivants :

➤ Les consultations des parties prenantes :

- Consultation téléphonique du Dr Sylvie Blain-Cartier, le 6 mai 2015, vétérinaire praticien, référent commission caprine de la SNGTV.
- Consultation téléphonique du Dr Pierre Autef, le 13 mai 2015, vétérinaire praticien, référent commission ovine de la SNGTV.
- Consultation téléphonique le 29 juillet 2015 du Dr Christine Filliat, vétérinaire praticien à Chateauneuf sur Isère.
- Consultation téléphonique du Dr Jocelyn Amiot le 21 août 2015, vétérinaire praticien, référent commission vaches allaitantes de la SNGTV.
- Consultation téléphonique du Dr Aubadie-Ladrix le 21 août 2015, praticien, référent commission vaches laitières de la SNGTV.
- Consultation téléphonique du Dr Loïc Guiouiller le 4 septembre 2015, vétérinaire praticien, référent médecines alternatives de la SNGTV.
- Consultation écrite de l'Institut en Santé Agronomie Environnement (ISAE 35) le 7 septembre 2015.
- Consultation écrite du laboratoire Filavie le 7 septembre et 13 novembre 2015.
- Consultation écrite du laboratoire Labocéa le 14 septembre et 6 novembre 2015.
- Consultation écrite du laboratoire Biovac le 15 septembre et 18 novembre 2015.
- Consultation téléphonique du Dr Bernard Poutrel, INRA et Dr Pascal Rainard (Infectiologie et Santé Publique, INRA) le 8 octobre 2015

¹ GT EST = Groupe de Travail « Encéphalopathies spongiformes transmissibles »

- Consultation écrite du Dr Pascal Rainard le 14 octobre 2015, Directeur de recherche UMR 1282 Infectiologie et Santé publique, à l'INRA de Nouzilly.
- Les publications scientifiques figurant dans la partie bibliographie en fin de rapport.

3. PERIMETRE ET LIMITATIONS DU CHAMP D'EXPERTISE

3.1. Définitions

Autovaccin

Lors de la prescription d'un médicament, le vétérinaire est tenu de respecter un ordre de priorité (principe de la « cascade ») défini par l'article L. 5143-4 du code de la santé publique. Les 3 premiers alinéas de cet article imposent au vétérinaire de prescrire en priorité un médicament bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM). L'autovaccin étant un médicament ne possédant pas d'AMM, sa prescription est encadrée par le 4^{ème} alinéa de cet article qui stipule qu'« ...à défaut des médicaments mentionnés aux 1°, 2° et 3°, [le vétérinaire peut prescrire] une préparation magistrale vétérinaire ».

L'autovaccin, considéré comme préparation magistrale, est plus précisément défini dans l'article L. 5141-2 du code de la santé publique comme « un médicament vétérinaire immunologique fabriqué en vue de provoquer une immunité active à partir d'organismes pathogènes provenant d'un animal ou d'animaux d'un même élevage, inactivés et utilisés pour le traitement de cet animal ou des animaux de cet élevage. » La préparation d'un autovaccin sous-entend donc l'isolement préalable d'une souche bactérienne ou virale, considérée comme responsable des symptômes observés².

Les auto-vaccins sont inactivés et le plus souvent adjuvés pour améliorer leur immunogénicité. Le protocole habituel d'utilisation des auto-vaccins consiste en 2 injections à 3-4 semaines d'intervalle. En fonction des espèces, ils peuvent être injectés par voie sous-cutanée ou par voie intra-musculaire. Leur durée d'utilisation est variable et dépend notamment de la persistance des signes cliniques dans l'élevage, de la sévérité des problèmes rencontrés, de la motivation de l'éleveur et de la demande du vétérinaire de l'élevage. L'autovaccin est strictement réservé à l'exploitation dans laquelle l'agent infectieux qu'il contient a été isolé ; il n'est pas destiné à être utilisé dans les élevages en lien épidémiologique avec cette exploitation, contrairement à ce qui est envisageable en filière avicole ou en filière porcine³.

² Cette particularité différencie l'autovaccin de l'isothérapie, pratique empirique qui repose sur l'utilisation directe de matières virulentes (urine, lait, pus, sang, etc.) soumises à plusieurs étapes de dilution et de dynamisation avant administration le plus souvent par voie orale, dans les aliments ou dans l'eau de boisson.

³ Dans le cas des ruminants, on entend par élevage une unité épidémiologique constituée d'animaux de même espèce élevés dans une unité géographique donnée. Les élevages de veaux ou de jeunes bovins de boucherie sont constitués d'animaux de provenances géographiques souvent extrêmement variables. Ces élevages d'engraissement n'ont donc pas de lien épidémiologique aussi systématique avec les cheptels d'origine, comme c'est le cas en engraissement en filière porcine ou avicole.

Prion

Le prion est un agent transmissible de nature exclusivement protéique (acronyme de *PROteinaceous Infectious particle*). Le prion, en s'associant à la forme normale de la protéine PrP^C (forme cellulaire), est capable de « trans conformer » celle-ci sous une forme pathologique (PrP^{Sc}) par une modification de sa structure secondaire et tertiaire. Dans cet avis, le terme prion sera employé pour désigner l'agent pathogène transmissible non conventionnel.

3.2. Périmètre de la saisine

La question posée dans la saisine concerne l'évaluation du risque en cas d'autorisation de l'usage des autovaccins chez les ruminants. L'analyse du GT s'est portée essentiellement sur le risque de transmission iatrogène de prions au sein d'un troupeau si l'animal, source de l'échantillon utilisé pour préparer l'autovaccin, est lui-même déjà contaminé par un prion pathologique, les autres risques (inoculation accidentelle au manipulateur, contaminations croisées au laboratoire préparateur de l'autovaccin, etc.) ne seront qu'évoqués.

Sur le plan théorique, l'emploi d'autovaccins peut être envisagé aussi bien pour des maladies virales que bactériennes. En France, différentes dispositions réglementaires régissent l'autorisation de préparation des autovaccins. L'arrêté du 6 mars 2008⁴ définit les bonnes pratiques de préparation à usage vétérinaire auxquelles doivent se conformer les établissements autorisés. A la date de rédaction de ce rapport, aucun des 4 préparateurs d'autovaccins agréés en France ne dispose d'installations permettant la production d'autovaccins viraux en conformité avec les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). C'est pourquoi la saisine ne traitera que des autovaccins destinés à la lutte contre les maladies bactériennes des ruminants. Toutefois, si cette situation devait évoluer dans les années à venir, il conviendrait d'évaluer le risque de transmission d'EST par emploi d'autovaccins viraux. L'évaluation du bénéfice, pour la santé publique, de l'emploi d'autovaccins en alternative à des traitements antibiotiques ne sera pas non plus abordée dans ce rapport.

Par ailleurs, les rapporteurs n'ont traité que du risque EST. Les risques liés aux adjuvants ou les risques pour le consommateur n'ont pas été abordés, dans la mesure où ils ont déjà fait l'objet d'une analyse dans le rapport consacré aux autovaccins destinés aux autres espèces animales que les ruminants et où les experts n'ont pas identifié de risque spécifique pour les ruminants qui n'auraient pas été évalués dans le précédent rapport (Anses 2013a).

L'efficacité des autovaccins ne sera pas non plus développée dans ce rapport, le lecteur étant invité à se reporter au précédent rapport dans lequel ce sujet est développé (Anses 2013a). Comme pour les autres espèces animales, ce point n'a pas fait l'objet de nombreuses publications pour les ruminants.

⁴ <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000018392379>

4. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT AUTOVACCINS RUMINANTS ET DU CES SABA

La place potentielle des autovaccins en thérapeutique des ruminants est abordée après un chapitre sur le contexte des décisions réglementaires de 2003. La troisième partie du rapport dresse un état des connaissances épidémiologiques en matière d'encéphalopathies spongiformes transmissibles, en focalisant sur la situation épidémiologique actuelle et sur les données relatives à l'infectiosité des différents tissus. L'appréciation du risque de transmission du prion par l'emploi d'autovaccins chez les ruminants est évaluée dans une quatrième partie au regard des informations disponibles et des recommandations sont formulées afin de maîtriser le risque éventuel.

4.1. Contexte des décisions réglementaires de 2003 d'interdiction d'emploi d'autovaccins chez les ruminants

Les modalités naturelles de transmission des EST demeurent encore aujourd'hui incomplètement connues. Toutefois les nombreux travaux menés sur la tremblante des petits ruminants (tremblante classique) et chez les cervidés (maladie du dépérissement chronique) indiquent que la transmission horizontale post natale (environnement, annexes placentaires et lait/colostrum) est la modalité la plus commune d'infection (Hoinville 1996, Miller et Williams 2003).

Une exposition à des aliments contaminés par l'agent de l'ESB est à l'origine de l'épizootie de cette maladie observée dans le cheptel bovin en Europe dans les années 80-90 (Wilesmith, Ryan, et Atkinson 1991) ainsi que de l'émergence de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) chez l'homme (Ghani 2002).

Parallèlement, plusieurs cas de transmission iatrogène⁵ des EST ont été rapportés notamment chez l'Homme (hormone de croissance, greffe de dure-mère...) mais également moins récemment chez l'animal, avec deux épisodes notables de transmission de la tremblante classique constatés chez les petits ruminants.

Le premier cas a été rapporté en 1937, en Grande Bretagne. De nombreux cas de tremblante ont été observés sur des moutons de race Blackface, race jusqu'alors non touchée par la tremblante. Après enquête épidémiologique, les animaux atteints se sont révélés avoir tous reçu un même lot de vaccin contre le louping ill⁶. Les vaccins utilisés à l'époque contre cette maladie étaient des vaccins formolés, fabriqués à partir de broyats de système nerveux central, de moelle épinière et de rate provenant de moutons inoculés expérimentalement. Huit animaux ayant servi à la préparation de ce lot se sont avérés issus de cheptels infectés de tremblante et certains d'entre eux étaient nés de mères ayant développé la maladie. Les symptômes de tremblante ont été constatés 2 ans à 2,5 ans après l'administration du lot de vaccin incriminé. Les animaux ayant reçu à la même période un autre lot de vaccin n'avaient pas développé la maladie.

Le deuxième cas de transmission iatrogène chez les petits ruminants a été signalé en Italie, à la fin des années 90. Entre août 1996 et octobre 1997, 20 foyers d'EST ont été décrits dans des

⁵ Se dit d'un trouble, d'une maladie, provoqués par un acte médical ou par les médicaments.

⁶ Le louping ill ou encéphalomyélite infectieuse ovine est une affection virale des ovins, transmise principalement par les tiques et se traduisant par une forte fièvre, des symptômes nerveux (tremblements et incoordination motrice) et un taux de mortalité de 50 %.

cheptels ovins et caprins répartis dans 4 régions : la Sicile, la Toscane, la Sardaigne et l'Apulie. Ces foyers présentaient une forte incidence intra cheptel, en moyenne 10 % chez les ovins et 26 % chez les caprins. Après enquête épidémiologique, cette flambée d'EST a pu être mise en relation avec l'administration parentérale (SC) à des chèvres et à des moutons d'un broyat de système nerveux central, glandes mammaires et de ganglion rétromammaire de moutons infectés expérimentalement par *Mycoplasma agalactiae* (Capucchio et al. 1998). La majorité des cas sont apparus 23 à 35 mois post vaccination. Des foyers secondaires ont pu se développer après arrêt de la vaccination, par l'intermédiaire d'échanges d'animaux provenant de cheptels ayant reçu ce vaccin. Cette contamination iatrogène pourrait expliquer en partie les différences régionales constatées en matière de distribution de l'incidence de la tremblante en Italie (Bertolini et al. 2012). Ces deux exemples illustrent la possibilité de transmission du prion par injection sous cutanée, comme l'avaient déjà mis en évidence les travaux de Cuillé et Chelle sur la Tremblante en 1938 (Cuillé et Chelle 1938). Ils confirment également, dans le cas d'utilisation de broyats d'organes infectés par le prion, la résistance de ce dernier à l'action du formol aux concentrations employées pour l'inactivation lors de la préparation de la suspension vaccinale. Ces deux exemples soulignent également le risque représenté par l'emploi de certains tissus particulièrement riches en prion (système nerveux central, nœuds lymphatiques ou rate). Toutefois, il convient de souligner que, dans les deux cas rapportés, le vaccin utilisé n'était pas un autovaccin, la base de la préparation vaccinale employée étant un broyat d'organes et non l'agent isolé.

Au début des années 2000, la maîtrise de l'épizootie d'ESB (Encéphalopathie spongiforme bovine) chez les bovins et des risques d'une émergence de cette maladie chez les petits ruminants ont été considérés comme des priorités par les autorités sanitaires.

L'existence de ces cas de transmission iatrogène combinés (i) au contexte sanitaire de l'époque et (ii) aux nombreuses incertitudes relatives aux risques de transmission des agents responsables des EST, ont conduit les autorités sanitaires à interdire en 2003 (Arrêté du 2 décembre 2003⁷, JORF n°10 du 13 janvier 2004, version consolidée au 15 octobre 2015) l'utilisation des autovaccins à usage vétérinaire dans la composition desquels entrait du matériel biologique issu de ruminants et pour lesquels une potentielle contamination par l'agent des EST ne pouvait pas être exclue (à l'exception des matériaux issus de zones reconnues comme indemnes d'EST).

4.2. Place potentielle des autovaccins en thérapeutique vétérinaire

4.2.1. Etat des lieux des potentialités en matière de vaccins chez les ruminants

D'une manière générale, on constate depuis plusieurs années une raréfaction des spécialités vétérinaires disposant d'une AMM, qu'il s'agisse d'antibiotiques ou de vaccins (Afssa 2004, Dehaumont et Moulin 2005). Ainsi, la base de données de l'ANMV enregistrait en 1993, 650 médicaments immunologiques (toutes espèces et maladies confondues), alors qu'en 2015, il n'en restait que 382. Cette diminution du nombre de spécialités vétérinaires est notamment observée pour les filières d'élevage dites mineures (petits ruminants), dont l'effectif limité ne représente pas un marché d'intérêt pour les industries pharmaceutiques. L'évolution de la législation européenne qui a nécessité une réévaluation des dossiers d'enregistrements a également contribué à cette tendance, un certain nombre de produits ne répondant plus aux exigences du niveau d'études

⁷ <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=LEGITEXT000005764961>

requis pour apporter les preuves d'innocuité et d'efficacité. En outre, les données de plus en plus nombreuses sur les limites maximales de résidus (LMR) sont à l'origine d'augmentations des délais d'attente souvent incompatibles avec l'emploi de nombreuses molécules sur des animaux de production.

A l'heure actuelle, la très grande majorité des vaccins utilisés chez les bovins cible des maladies virales, principalement respiratoires et digestives. Cependant, un certain nombre de vaccins disposant d'une AMM sont également proposés pour la maîtrise de maladies bactériennes affectant les bovins. Ces vaccins concernent les clostridioses (entérotoxémies, tétanos), les colibacilloses néonatales, les pasteurelloses pulmonaires, les mammites colibacillaires ou staphylococciques ainsi que certains agents abortifs. Pour certaines de ces maladies toutefois, le praticien dispose de vaccins avec un nombre de valences limité et/ou avec une absence de protection croisée (exemple des salmonelloses ou des colibacilloses) (Millemann, Heskia, et Belbis 2013).

Chez les petits ruminants, la situation est différente, avec une majorité de vaccins contre des maladies bactériennes mais le nombre de spécialités disponibles est limité et des restrictions d'emploi aux seuls ovins sont fréquentes. Toutefois, pour certaines affections courantes chez les ovins et caprins (i.e. mycoplasmoses, staphylococcies, pasteurelloses, avortements salmonelliques, maladies digestives néonatales), il n'existe pas ou plus de vaccins commercialisés. Dans ce contexte, le recours aux antibiotiques est donc classique, pour soigner les malades ou pour de la métaphylaxie (administration aux malades et aux exposés). En l'absence fréquente de réalisation d'analyses complémentaires pour des raisons économiques (Cazeau et al. 2009a, b), l'emploi d'antibiotiques à large spectre est de plus en plus systématique, sans compter la place croissante prise par les thérapeutiques alternatives. Compte tenu de la raréfaction de l'arsenal thérapeutique disponible pour les ovins et caprins, les antibiotiques sont fréquemment employés selon le principe de la cascade, sans toujours la connaissance de particularités physiologiques susceptibles de justifier d'une adaptation de la posologie. Cette situation compromet la réussite de l'objectif de réduction de l'usage des antibiotiques préconisé dans le plan Ecoantibio2017⁸. Les listes des maladies bactériennes des petits et grands ruminants pour lesquelles des vaccins sont commercialisés en France figurent dans les Tableau 4 et Tableau 5 en Annexe 2.

Si pour certaines maladies évoquées ci-dessus, des vaccins commercialisés sont disponibles en France, ces préparations ne sont pas sans présenter parfois certaines limites quant à leur efficacité, limites qui peuvent s'expliquer par la variabilité antigénique bactérienne ou par la diversité des facteurs de pathogénicité de certaines espèces bactériennes.

4.2.2. Rappels sur la variabilité antigénique bactérienne et sur l'absence(s) de protection croisée(s) pour certaines bactéries

De nombreux vaccins sont disponibles pour prévenir les principales affections des ruminants. Néanmoins, quelques lacunes persistent, évoquées ci-dessus, justifiant le besoin ponctuel d'autovaccins. A ceci s'ajoute le fait que les vaccins proposés peuvent contenir une bactérie de même genre et espèce que celle circulant sur l'élevage et responsable des symptômes, mais trop

⁸ <http://agriculture.gouv.fr/le-plan-daction-ecoantibio-2012-2017>

éloignée antigéniquement de la souche, soit en raison d'une diversité génétique importante (cas des bactéries généralement), soit en raison de mutations (mais c'est le cas des virus essentiellement, avec une dérive génétique progressive).

Pour ce dernier cas, quelques exemples peuvent être développés, notamment au sein des entérobactéries pour lesquelles la littérature est assez fournie (Millemann, Heskia, et Belbis 2013). En effet, il n'existe pour ainsi dire pas de protection croisée conférée par les vaccins dirigés contre les entérobactéries. Elle n'est conférée que :

- contre les souches du même sérotype que celui contenu dans le vaccin, voire du même séro groupe (parce qu'exprimant à leur surface des antigènes de groupe communs) : cas général pour les salmonelles ;
- contre les souches exprimant les mêmes facteurs de virulence : cas général des colibacilles.

Quelques exceptions existent comme le vaccin contre la mammites contenant la souche de colibacille J5 (souche mutante rugueuse produisant un LPS incomplet) conférant une protection contre une gamme assez large de bactéries à Gram négatif (Poutrel et Le Page 2012). D'autres exceptions ont été décrites avec une protection croisée par exemple entre souches de salmonelles de séro groupe B (comme *S. Typhimurium*) et D (comme *S. Dublin* ou *S. Newport*), mais plutôt avec des vaccins vivants (Beal et al. 2006, Mohler et al. 2008).

Au bilan, pour obtenir une efficacité vaccinale contre les entérobactéries, il convient de s'assurer que le vaccin contient, en ce qui concerne les salmonelles, une souche de même sérotype ou séro groupe que la souche de l'élevage et en ce qui concerne les colibacilles, une souche exprimant les mêmes facteurs de virulence (par exemple F5, CS31A, etc.).

Face à certaines affections comme celles décrites ci-dessus ou en l'absence de vaccins commercialisés, le praticien peut donc être amené à envisager le recours à un autovaccin. Avant leur interdiction en 2003, ces préparations étaient utilisées dans le cadre d'un certain nombre d'affections et sans prétendre être exhaustif, il est apparu intéressant d'établir une liste des maladies classiquement ciblées. Ces données permettent en effet d'identifier la nature des matrices les plus utilisées pour isoler les bactéries responsables, informations indispensables pour répondre à la question du risque de transmission du prion par usage d'autovaccins.

4.2.3. Principales utilisations d'autovaccins chez les ruminants avant l'interdiction de 2003

Avant 2003 (informations résultant des auditions de producteurs d'autovaccins), les principaux autovaccins préparés pour les ruminants concernaient essentiellement les bactéries responsables d'affections :

- mammaires (*Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. acidominimus* ou streptocoques du groupe G, colibacilles, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus*, *Trueperella pyogenes* (autrefois appelée *Arcanobacterium pyogenes*), *Pseudomonas aeruginosa*, mycoplasmes) ;
- respiratoires (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, mycoplasmes) ;
- digestives (colibacilles non typables et colibacilles porteurs de facteurs d'attachement K99 (F5), F41, CS31A et FY, et salmonelles – sérotypes Montevideo, Anatum) ;
- génitales – avortements ou métrites - (Salmonelles, *Trueperella pyogenes*) ;
- et cutanées (*Staphylococcus sp.*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*).

Pour les petits ruminants, la production d'autovaccins contre les mycoplasmoses (mammaires, respiratoires ou articulaires) est une pratique courante dans certains pays (Espagne, Europe de l'Est) (Buonavoglia et al. 2008).

La littérature scientifique est pauvre en publications relatant des essais réalisés avec des autovaccins. Les informations collectées rejoignent les constats exposés ci-dessus en matière de bactéries et de matrices d'isolement. On peut toutefois signaler une publication de 2009 portant sur l'évaluation de l'efficacité de deux autovaccins, préparés, l'un avec une souche de *Moraxella bovoculi* et l'autre avec une souche de *Moraxella ovis*. Ces deux bactéries avaient été isolées d'écouvillons lacrymaux réalisés sur des animaux atteints de kératoconjonctivite infectieuse bovine (Funk et al. 2009).

Compte tenu de ces éléments, les principales matrices à partir desquelles sont isolés les agents pathogènes pouvant servir à la préparation d'autovaccins sont principalement et par ordre de fréquence : le lait, le poumon, les matières fécales, le pus et le placenta ou les lochies⁹ (voir Tableau 4 et Tableau 5, Annexe 2). Néanmoins, des autovaccins pouvant être produits à partir d'autres matrices, l'évaluation ne se limitera pas aux matrices listées ci-dessus.

⁹ Lochies : mélange de liquide placentaire et de sang qui s'écoule après la mise bas.

4.3. Etat des connaissances en matière d'EST

4.3.1. Situation épidémiologique actuelle en France

4.3.1.1. Souches de prion

Chez les bovins, trois souches distinctes de prion ont été identifiées à ce jour :

- la souche **d'ESB classique** est responsable de l'épizootie dite de « la vache folle » survenue en Europe durant les 30 dernières années et liée à l'utilisation de farines de viande et d'os contaminées, en alimentation animale. Cette souche de prion bovine, transmissible également aux petits ruminants, est responsable chez l'Homme de la variante de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (v-MCJ). La possibilité que cette maladie persiste à un niveau sporadique est actuellement envisagée.
- les souches **d'ESB atypique** de type L et de type H, découvertes à la faveur des programmes d'épidémiosurveillance systématisés, déployés à partir de 2001 chez des bovins âgés et dont l'origine spontanée, versus acquise, reste discutée.

Chez les petits ruminants on distingue la **tremblante classique** (qui est causée par une variété de souches phénotypiquement distinctes les unes des autres) et la **tremblante atypique** décrite depuis 1998.

4.3.1.2. Evolution des EST en France – surveillance en France

➤ Formes classique et atypique d'ESB chez les bovins

Dans l'avis de l'Anses du 11 mars 2013 (Anses 2013c), le GT EST indiquait que « L'analyse épidémiologique de la situation de l'ESB à l'échelle européenne montre une décroissance générale et continue dans tous les pays de l'Union européenne pour les animaux nés après l'interdiction totale des farines animales dans l'alimentation des animaux de rente [...] Une mise à jour récente de la situation épidémiologique de l'ESB dans un rapport scientifique de l'EFSA paru le 15 octobre 2012 confirme cette tendance d'une diminution continue du nombre de cas d'ESB dans tous les pays de l'Union Européenne (EFSA 2012a).

Si les mesures de contrôle du risque de propagation de l'ESB sont maintenues, il semble raisonnable de faire l'hypothèse d'un maintien de cette situation épidémiologique favorable ».

Depuis la publication de ce rapport scientifique de l'EFSA, trois cas d'ESB classique chez des bovins nés en 2006, 2007 et 2009 ont été détectés au Royaume-Uni, respectivement en 2012 (European Commission Health and Consumer Protection 2013), 2013 (European Commission Health and Consumer Protection 2015) et 2015 (News and report 2015b). Ces animaux ont donc été infectés plus de 10 ans après l'interdiction totale d'utilisation des farines animales dans ce pays. Deux autres cas similaires ont été recensés en Europe ; un en Irlande né en 2010, détecté en 2015 (News and report 2015a) et un en France né en 2011 détecté en 2016 (News and report 2016). L'origine de ces cas reste inconnue et fait l'objet d'hypothèses. La survenue de cas spontanés d'ESB classique en est une.

Concernant l'ESB atypique, l'avis de l'Anses du 11 mars 2013 (Anses 2013c) indique que « l'analyse des données épidémiologiques ne montre aucune tendance épidémiologique (ni augmentation, ni diminution), mais que la capacité des dispositifs actuels de surveillance à identifier les cas d'ESB atypiques est inconnue (sensibilité analytique et précocité de détection) ».

Dans son avis du 29 juin 2015 (Anses 2015) l'Anses ajoute : « En France, une étude rétrospective sur la période 2001-2007 montre une prévalence de 0,41 cas positif pour le type H et 0,37 cas positif pour le type L par million d'animaux testés. Cette prévalence augmente à 1,9 et 1,7 cas positifs par million d'animaux testés pour les animaux âgés de plus de huit ans. Cette faible prévalence apparente et l'apparition de ces formes chez des animaux âgés (entre 8 et 20 ans par rapport à une moyenne d'âge de 5 à 6 ans pour l'ESB classique) ont conduit la communauté scientifique à proposer une origine spontanée pour ces cas d'EST (avis de l'Anses du 22 Juillet 2011, (Anses 2011)).

L'analyse des données épidémiologiques collectées en France (Sala et al. 2013) confirme l'évolution favorable de la prévalence des différentes formes d'EST pour les bovins abattus en France »

Par ailleurs, aucun cas d'ESB classique n'a été détecté de 2012 à 2015, alors que pendant cette même période la surveillance a conduit à la détection de :

- 1 cas atypique en 2012 à l'équarrissage ;
- 1 cas à l'abattoir et 1 cas à l'équarrissage en 2013, tous deux atypiques ;
- 2 cas à l'abattoir et 1 cas à l'équarrissage en 2014, tous atypiques.

Dans son avis du 29 juin 2015 (Anses 2015) l'Anses poursuit « Une évolution importante du dispositif de surveillance des EST bovines est survenue le 1^{er} janvier 2015. Depuis, seuls les bovins nés avant janvier 2002 (âgés de plus de 13 ans en 2015, plus âgés ensuite) sont testés (hormis les abattus d'urgence) en abattoir. Comme indiqué dans les précédents avis de l'Afssa (Afssa 2007c) et de l'Anses (Anses 2013b), le cas d'ESB atypique le plus jeune détecté, en France, était âgé de 8,3 ans. Pour rappel, un cas atypique âgé de 6,5 ans a été décrit (né en Allemagne, importé en Suisse (Guldemann et al. 2012)). La répartition des âges des cas atypiques observés est rappelée dans la publication de Sala et al.; la médiane d'âge de ces cas (ESB H ou ESB L) est de 12,5 et 12,4 ans respectivement (Sala et al. 2012).

Aussi, le fait de limiter le dépistage des animaux sains à ceux nés avant le 1^{er} Janvier 2002 conduit à tester des animaux plus âgés que la médiane des cas atypiques observés jusqu'à présent en France. Ce système revient à ne détecter qu'une fraction des cas d'ESB atypique détectables avec les outils actuels chez les animaux sains abattus (environ la moitié pour 2015, cette proportion diminuant au fil des ans) (EFSA 2012a). »

➤ **Tremblante classique et atypique des petits ruminants**

L'EFSA a rendu en 2014 un avis (EFSA Panel on Biological Hazard 2014) sur l'analyse de l'évolution de la situation épidémiologique de la tremblante dans les pays européens depuis 10 ans.

Une diminution significative du taux de la prévalence des formes classique et atypique de tremblante a été observée en France chez les ovins.

Pour les caprins, une baisse significative de la prévalence de la tremblante classique a été observée alors qu'aucune tendance claire n'a pu être mise en évidence pour la situation de la tremblante atypique.

Le dernier rapport de la Commission européenne sur la surveillance des EST inclut les données 2013 (European Commission Health and Consumer Protection 2015). Il indique pour la France que le taux de prévalence apparent :

- de tremblante classique sur les ovins et les caprins envoyés à l'abattoir et testés a été nul cette année-là (aucun cas sur 10 470 ovins testés et 8 518 caprins testés) ;
- de la tremblante atypique a été de 1,8 cas pour 10 000 animaux testés chez les ovins (10 cas), et de 0,46 cas pour 10 000 animaux testés chez les caprins (3 cas).

Dans son avis du 30 septembre 2014 (Anses 2014), l'Anses a estimé le nombre de foyers de tremblante non détectés par an en tenant compte du fait que l'échantillonnage réalisé pour la surveillance n'est pas exhaustif. Cet avis relève que : « Sur la période (2009-2012), les résultats obtenus indiquent que :

- chez les caprins, le nombre de cas de tremblante classique potentiellement non détectés par le système d'échantillonnage des tests est très faible (inférieur à 1) ;
- chez les ovins, en moyenne 56 [53,1 ; 58,9] cas supplémentaires de tremblante classique par an, correspondant chacun à un foyer, n'auraient pas été détectés. Toutefois, comme la prévalence a continué à diminuer entre 2009 et 2012, pour atteindre 0,34 cas pour 10 000 tests à l'équarrissage et 0,11 à l'abattoir en 2012, il semble légitime de considérer que le nombre effectif de cas manqués est actuellement inférieur à cette valeur. Ainsi sur la base de ces niveaux de prévalence et de la seule année 2012, le nombre de cas index non détectés serait de 12 (6 à l'équarrissage et 6 à l'abattoir). ».

Sur la base des années passées, cet avis relève qu'en moyenne 0,75 cas de tremblante a été détecté par an - chez les ovins, pour 10 086 tests réalisés à l'abattoir, et 0 cas - chez les caprins, pour 11 384 tests réalisés à l'abattoir. Dans le même temps, 555 000 ovins et 138 000 caprins sont abattus et non testés. Ainsi les résultats de la surveillance en 2013 restent proches de ceux des années passées, sur lesquels s'appuie l'avis de l'Anses de 2014. Sur la base de l'estimation réalisée en 2014, on peut considérer que le nombre de cas index non détectés en 2013 pourrait atteindre celui estimé pour 2012 soit 12 ovins.

➤ ESB des petits ruminants

Depuis le déploiement d'un dispositif spécifique (typage de souche¹⁰) deux cas d'ESB ont été définitivement confirmés. Ces deux cas concernent des caprins, un en France (Eloit et al. 2005) et l'autre en Ecosse (Spiropoulos et al. 2011). En revanche, aucun cas d'ESB ovine naturel n'a été à ce jour rapporté bien que la transmission expérimentale par voie orale de l'ESB au mouton s'avère efficace avec des doses infectieuses relativement faibles (du même ordre de grandeur que les doses efficaces pour contaminer les bovins par voie orale (Hunter et al. 2012)).

Le dispositif de surveillance des EST chez les petits ruminants (par sondage) n'est pas adapté à l'estimation des très faibles prévalences comme celle de l'ESB des petits ruminants (Anses 2014). Néanmoins, un dispositif de surveillance (visant l'exhaustivité) en France sur la période 2005/2007

¹⁰ A partir de 2005, au niveau européen [Règlement \(CE\) N° 36/2005](#). Avant cela, en France, un réseau national de typage de souche regroupant 7 Laboratoires a investigué plus de 400 isolats positifs d'EST chez les petits ruminants (analyses rétrospectives des cas cliniques identifiés depuis 1992 mais également des cas identifiés par la surveillance active en 2002 et 2003). C'est ce réseau qui a permis d'identifier le cas Français d'ESB chez la chèvre (Eloit et al. 2005).

chez les petits ruminants de plus de 18 mois à l'équarrissage et à l'abattoir n'a pas permis d'identifier d'autres cas d'ESB chez les petits ruminants. Ces résultats plaident pour une très faible prévalence (ou une prévalence proche de zéro) de cette forme d'EST chez les petits ruminants.

En conclusion

Les mesures actuellement en vigueur (notamment vis-à-vis de l'alimentation animale¹¹), si elles demeurent appliquées, devraient permettre de garantir l'absence de réémergence de l'ESB. Toutefois l'existence de cas spontanés d'ESB classique ne peut être exclue.

Compte tenu des incertitudes relatives (i) à l'origine des cas d'ESB atypique et (ii) à la capacité du système de surveillance à les détecter, il semble avisé de considérer qu'un nombre limité de cas d'ESB atypique persiste dans la population bovine française.

La situation en matière de tremblante classique et atypique des petits ruminants en France s'est beaucoup améliorée au cours de la décennie écoulée. Chez les ovins, la prévalence globale des deux formes de tremblante est d'environ 0,11 cas pour 10 000 animaux abattus. Cette valeur ne doit toutefois pas occulter l'existence d'un nombre significatif de foyers de tremblante classique et atypique qui ne sont pas détectés, compte tenu (i) des outils de détection utilisés (Afssa 2007b) et (ii) du système de surveillance (échantillonnage de la population : 10 000 tests réalisés pour 550 000 ovins adultes abattus).

Depuis 2005, aucun cas d'ESB n'a été détecté chez les petits ruminants en France.

Les modifications du système de surveillance chez les bovins et les petits ruminants survenues au cours des dernières années (diminution du nombre de tests et/ou modifications des populations cibles) sont susceptibles toutefois de diminuer la capacité de détection (sensibilité et précocité) d'une modification de la situation épidémiologique de ces maladies. Ainsi, bien que la situation épidémiologique se soit significativement améliorée, les EST persistent probablement sous une forme sporadique, difficilement détectable dans les populations de ruminants de rente en France.

4.3.2. Mode de contamination et dose infectante

Chez les ruminants, la voie orale semble être le mode de contamination naturelle le plus fréquent. Néanmoins, de nombreuses expériences menées dans différents modèles animaux d'EST ont permis de démontrer la transmissibilité expérimentale de ces agents par d'autres voies (liste non exhaustive) :

- Intracérébrale (IC) (Renwick et Zlotnik 1965) ;
- Intrapéritonéale (IP) (Kimberlin, Millson, et Hunter 1971) ;
- Sous-cutanée (SC) (Kimberlin et Walker 1979) et pour mémoire les deux cas de contamination iatrogène par administration de vaccins contaminés par le prion décrits précédemment (cf. § 4.1) ;

¹¹ Mesures d'interdictions/ restrictions d'utilisation des protéines animales transformées pour l'alimentation des espèces de rente, ainsi que certaines graisses d'origine animale (Anses 2015).

- Intramammaire (Chandler 1971) ;
- Intramusculaire (IM) (Field 1967) ;
- Oculaire (Cuillé et Chelle 1936) ;
- Intraveineuse (IV) (Kimberlin et Walker 1979) (Lacroux, Bougard, et al. 2012) ;
- Intranasale (gouttelettes liquides (Bessen et al. 2009) ; inhalation d'aérosols (Haybaeck et al. 2011)).

Des travaux conduits principalement sur modèles murins d'EST ont permis d'établir l'efficacité relative de ces différentes voies d'infection. Ainsi pour la souche 139A chez la souris Compton White (CW) la voie intracérébrale apparait environ (Kimberlin et Walker 1979, 1978) :

- 5 à 10 fois plus efficace que la voie IV ;
- 100 fois plus efficace que la voie IP ;
- 10 000 fois plus efficace que la voie SC.

Ces valeurs, qui nous fournissent un panorama global de l'efficacité des voies d'exposition aux agents des EST ne doivent, toutefois, en aucun cas être considérées comme des paramètres universellement transposables. En effet, l'efficacité de transmission des agents des EST est éminemment dépendante de la souche et de l'hôte considérés.

A titre d'exemples :

- Kimberlin et Walker, ont établi que pour la souche 263K chez le hamster, 1 DL₅₀¹² par voie IP étaient équivalentes à 40 000 DL₅₀ (mesuré par titrage point final) par voie IC (Kimberlin et Walker 1977). Les mêmes auteurs ont ensuite publié que pour la souche 139A chez la souris CW, 1 DL₅₀ IP était en moyenne équivalente à 430 DL₅₀ IC (Kimberlin, Field, et Walker 1983) ;
- alors que 10⁹ DL₅₀ IC sont nécessaires à la transmission de la maladie par voie orale chez le Hamster (souche 263K) (Prusiner, Cochran, et Alpers 1985), l'ingestion chez l'ovin de 10^{3.2} DI₅₀ IC¹³ permet de transmettre la maladie à 100% des receveurs (Souche PG127S) (Douet et al. 2014).

En l'absence de données expérimentales spécifiquement collectées, une telle variabilité interdit, pour une souche et un hôte donnés, d'évaluer quantitativement (i) le risque relatif de transmission d'une maladie à prion ou (ii) d'estimer une dose minimale infectante, associée aux différentes voies d'exposition. En tout état de cause, il est raisonnable de considérer d'une façon générale pour toutes les souches que :

- la voie intracérébrale est la voie de transmission la plus efficace ;

¹² DL₅₀ = Dose létale 50%, induisant la mortalité suite à une EST dans 50% des individus receveurs.

¹³ DI₅₀ IC = Dose infectieuse 50%, induisant l'infection de 50% des receveurs par la souche de prion concernée, sans pour autant induire la mortalité de tous les animaux infectés dans la période d'espérance de vie de l'espèce considérée. La DI₅₀ est par conséquent inférieure ou égale à la DL₅₀.

- les voies parentérales ont une efficacité intermédiaire entre la voie intracérébrale et la voie orale. L'ensemble des données disponibles indique que la voie parentérale est au minimum 10 fois moins efficace que la voie intracérébrale.

4.3.3. Facteurs de variation de la sensibilité aux EST

La sensibilité des petits ruminants aux agents responsables des formes classique et atypique de tremblante ainsi qu'à l'ESB est fortement influencée par les polymorphismes du gène *PNRP* qui code la protéine Prion.

Chez les ovins les polymorphismes aux codons 136 (A/V), 154 (R/H) and 171 (R, Q/H) ont un effet majeur (Cloucard et al. 1995, Hunter et al. 1996). En conditions naturelles d'exposition, les animaux de génotype VRQ/VRQ, ARQ/VRQ and ARQ/ARQ ont une forte sensibilité à la maladie alors que les animaux hétérozygotes ARR ne sont affectés que de manière marginale. Les animaux ARR/ARR apparaissent eux comme extrêmement résistants (mais pas absolument) à la tremblante classique (Groschup et al. 2007, Elsen et al. 1999). En conditions expérimentales, les animaux ARR/ARR présentent une très forte résistance à l'infection par voie orale par l'agent de l'ESB (McGovern et al. 2015).

Chez la chèvre, les connaissances produites ces dernières années indiquent que des polymorphismes aux codons 211 (Q/R) et 222 (K/Q) sont associés à une très forte résistance à la tremblante classique et à l'ESB (Acutis et al. 2006, Acutis et al. 2012, Aguilar-Calvo et al. 2014, Barillet et al. 2009, Corbière, Chauvineau-Perrin, Lacroux, Costes, et al. 2013, Lacroux et al. 2014, Vaccari et al. 2006). Des études cas-témoins conduites à Chypre suggèrent que les polymorphismes S et D au codon 146 du gène *PNRP* (polymorphismes apparemment absents des populations de chèvres Alpine et Saanen élevées en France) pourraient également être associés à un niveau significatif de résistance à la tremblante classique. Des données publiées récemment (inoculations expérimentales) semblent confirmer la plus grande résistance des porteurs de l'allèle S146 à la tremblante classique (White et al. 2012).

Le déterminisme de la sensibilité génétique des ovins à la tremblante atypique est lui totalement différent de celui observé en tremblante classique. Alors qu'un sur-risque de survenue des cas de tremblante atypique est associé aux codons F141 (allèle AF141RQ) et H154 (allèle AHQ) du gène *PNRP*, l'allèle ARR (y compris à l'état homozygote) ne procure aucune protection contre cette maladie (Arsac et al. 2007, Moum et al. 2005, Moreno et al. 2007). Chez la chèvre, les connaissances ne sont que très parcellaires. Toutefois les porteurs de l'allèle AHQ présentent un sur-risque élevé de portage de l'agent de la tremblante atypique (Colussi et al. 2008).

Chez les bovins, aucun impact des polymorphismes du gène *PNRP* sur la sensibilité à l'infection par l'ESB classique ou les formes atypiques d'ESB n'a été rapporté.

4.3.4. Distribution de l'infectiosité

L'infectiosité est exprimée en DL₅₀ ou DI₅₀ par gramme ou par mL de tissu pour une espèce considérée et pour une voie de contamination donnée. Il est à noter que des doses largement inférieures transmettent encore efficacement la maladie, mais avec des taux de réussite plus faibles. Ainsi, un cerveau de bovin infecté par l'agent de l'ESB et prélevé au stade terminal de la maladie (niveau d'infectiosité maximal) présente une DL₅₀ par voie orale de 150 mg chez le bovin, mais des transmissions sont observées avec 1 mg du même échantillon (Konold et al.

2012). Ce type d'observation est très probablement à mettre en relation avec le caractère hétérogène de la répartition des agrégats de prions au sein d'un tissu.

Les travaux de caractérisation du schéma pathogénique des EST se sont déroulés sur plusieurs décennies, durant lesquelles les outils et les approches utilisées pour mesurer les titres infectieux ont évolué, avec chacun des seuils de sensibilité différents. Pour exemple, les bio-essais réalisés pour mesurer l'infectiosité de l'ESB ont tout d'abord été réalisés chez la souris conventionnelle RIII (l'inconvénient majeur de ce modèle est la barrière d'espèce bovin-souris à franchir, ce qui implique que des résultats négatifs n'excluent pas la présence de faibles niveaux d'infectiosité (Wells et al. 1994, Fraser et Foster 1993, Bradley 1996)), puis chez la souris transgénique surexprimant la PrP^{sc} bovine ($10^{4.4}$ fois plus sensible (Buschmann et Groschup 2005, Castilla et al. 2003, Scott et al. 1997)). En parallèle, l'inoculation directe à des bovins par voie intracérébrale est également beaucoup plus sensible ($10^{2.7}$) que le modèle de souris RIII (Hawkins et al. 2000). Une étude anglaise (Wells et al. 2007), a montré que la DI_{50} bovine par voie orale était équivalente à environ $10^{2.8}$ RIII mouse IC/IP DI_{50} , même si la transmission de l'ESB est encore possible avec une dose aussi faible que 1 mg de cerveau infecté ($\leq 10^{0.4}$ RIII mouse IC/IP DI_{50} unités). A titre de comparaison dans certains modèles de tremblante, une dose équivalente à 2 mg d'encéphale infecté suffit à infecter par voie orale 6 ovins sur les 9 exposés à cette dose (Douet et al. 2014).

L'infectiosité des différents tissus n'a pas été testée dans chaque modèle (Figure 1), les comparaisons des titres infectieux sont par conséquent difficiles.

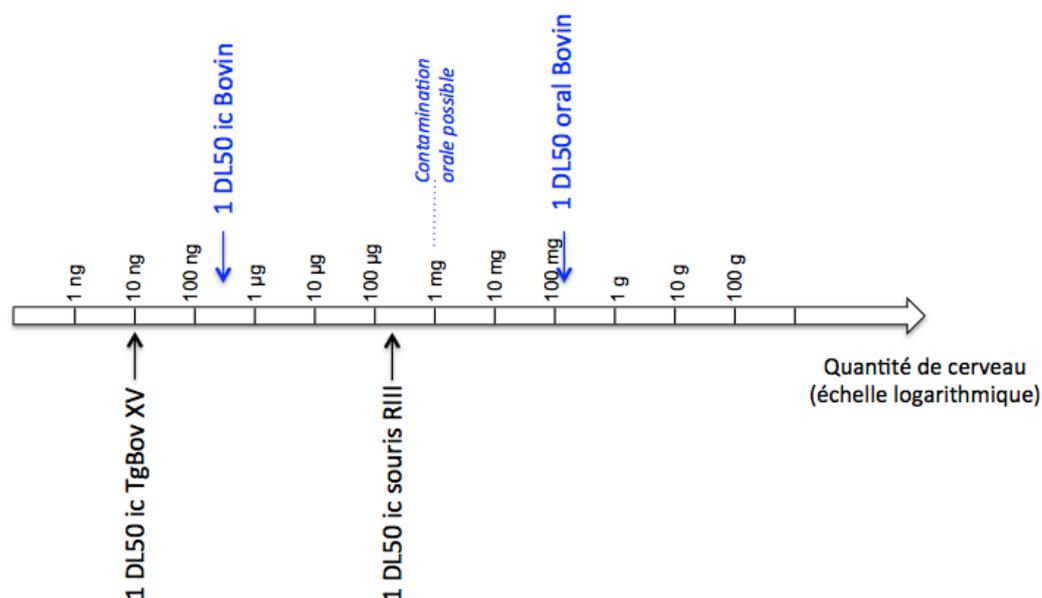


Figure 1 : Quantités de cerveau de bovin au stade terminal de la maladie correspondant à une DL50 dans différents modèles (pour l'ESB classique) ; Tg Bov = souris transgénique exprimant la PrP^c bovine.

La distribution quantitative et temporelle (au cours des phases d'incubation et clinique) de l'infectiosité dans l'organisme des individus atteints d'EST varie en fonction des souches de prion

et des espèces-hôtes considérées. La tremblante classique des petits ruminants et l'ESB classique ont été largement étudiées, mais les connaissances restent très parcellaires à ce jour quant aux formes atypiques de tremblante et d'ESB.

Néanmoins, il est possible de tracer les grandes lignes de distribution de l'infectiosité dans les EST :

- le système nerveux central (SNC : cerveau, moelle épinière, ganglions rachidiens) concentre la majeure partie de l'infectiosité (au stade terminal, les niveaux d'infectiosité sont de l'ordre de 10^6 à 10^8 DL₅₀ IC par gramme de tissu en transmission intraspécifique), mais celle-ci n'apparaît que dans les derniers stades de la phase d'incubation (Kimberlin et Walker 1986) ;
- les organes lymphoïdes (rate, ganglions lymphatiques, amygdales, structures associées dans l'intestin grêle et le gros intestin...) présentent une infectiosité plus faible (généralement plus de 100 fois inférieure à celle du SNC, dans le cas de la tremblante classique, vraisemblablement limitée à certaines portions de l'intestin pour l'ESB chez les bovins) mais qui survient dès les premiers temps de la phase d'incubation (phase de réplication périphérique) lors d'une exposition par voie périphérique. Les annexes fœtales (notamment le placenta) présentent également des niveaux d'infectiosité conséquents lors de tremblante classique du mouton. La consommation par les animaux de ces annexes fœtales après la mise-bas serait une des causes majeures de transmission horizontale de la maladie ;
- la présence d'infectiosité à des niveaux largement inférieurs a également été décrite dans d'autres organes (rein, muscles...), principalement chez des animaux en incubation de tremblante classique (cf. Annexe 4);
- les liquides biologiques (sang, lait) ainsi que les excréta peuvent présenter des niveaux d'infectiosité très faibles, de l'ordre de 1 à 10 DL₅₀ IC par mL (tremblante classique).

Dans le contexte de la présente saisine, il est important de souligner que des phénomènes inflammatoires chroniques peuvent conduire à la présence de foyers ectopiques de réplication périphérique des prions, comme observé dans des modèles expérimentaux (Heikenwalder et al. 2005), mais également chez des moutons atteints de tremblante classique et de Maedi (Maestrone et al. 2013).

En conclusion

La charge infectieuse des tissus et de fluides biologiques évolue avec le stade de la maladie et du couple souche-hôte considéré. Les distributions de l'infectiosité dans le cas de la tremblante classique du mouton (distribution dans de nombreux organes et fluides) et de l'ESB classique chez les bovins (concerne principalement le SNC et des portions de l'intestin) ont été largement étudiés. Peu de données sont actuellement disponibles pour les distributions dans les formes atypiques de tremblante (petits ruminants) et d'ESB (bovins).

En fonction des espèces et des prions concernés, les niveaux d'infectiosité varient de 1 DL₅₀ (lait, sang) à 10^8 DL₅₀ (cerveau) par gramme de tissu ou mL de fluide en transmission intra-spécifique par voie intracérébrale.

L'efficacité des différentes voies d'inoculation est variable en fonction de l'espèce-hôte et de la souche considérée. Toutefois l'ensemble des données disponibles indique que la voie intracérébrale est au moins 10 fois plus efficace que la voie parentérale et la voie orale.

4.4. Appréciation de la probabilité de transmission du prion par l'emploi d'autovaccins chez les ruminants en France

Le prion se présentant sous forme d'agrégats, il n'est pas possible d'exprimer l'infectiosité sous forme de nombre de particules infectieuses. Par conséquent les experts ont choisi de se baser sur la DI_{50} IC, unité de mesure largement utilisée dans les publications portant sur les niveaux d'infectiosité des différents tissus.

Les experts ont défini l'évènement indésirable à considérer comme étant le fait d'infecter, par l'utilisation d'un autovaccin, au moins un animal sensible dans l'élevage concerné. Sa probabilité de survenue dépend de la combinaison de plusieurs probabilités de survenue d'évènements qui ont été successivement évaluées (voir Figure 2) :

- la probabilité d'intervenir dans un cheptel infecté et de prélever un individu infecté ;
- la probabilité de prélever, en vue de l'isolement bactérien, un tissu contenant du prion,
- la probabilité de conserver du prion tout au long des différentes étapes de préparation de l'autovaccin (production de la suspension bactérienne, inactivation) ;
- la probabilité de provoquer une intercontamination entre lots de vaccins par l'intermédiaire du matériel utilisé pour la préparation, notamment les cuves de fermentation utilisées pour la fabrication de la biomasse ;
- la probabilité d'administrer une dose vaccinale suffisamment contaminée pour provoquer une infection.

Le raisonnement doit être réalisé en tenant compte de l'espèce, de la souche de prion, de l'âge de l'animal ainsi que de la matrice prélevée sur l'animal malade.

Séquence d'évènements

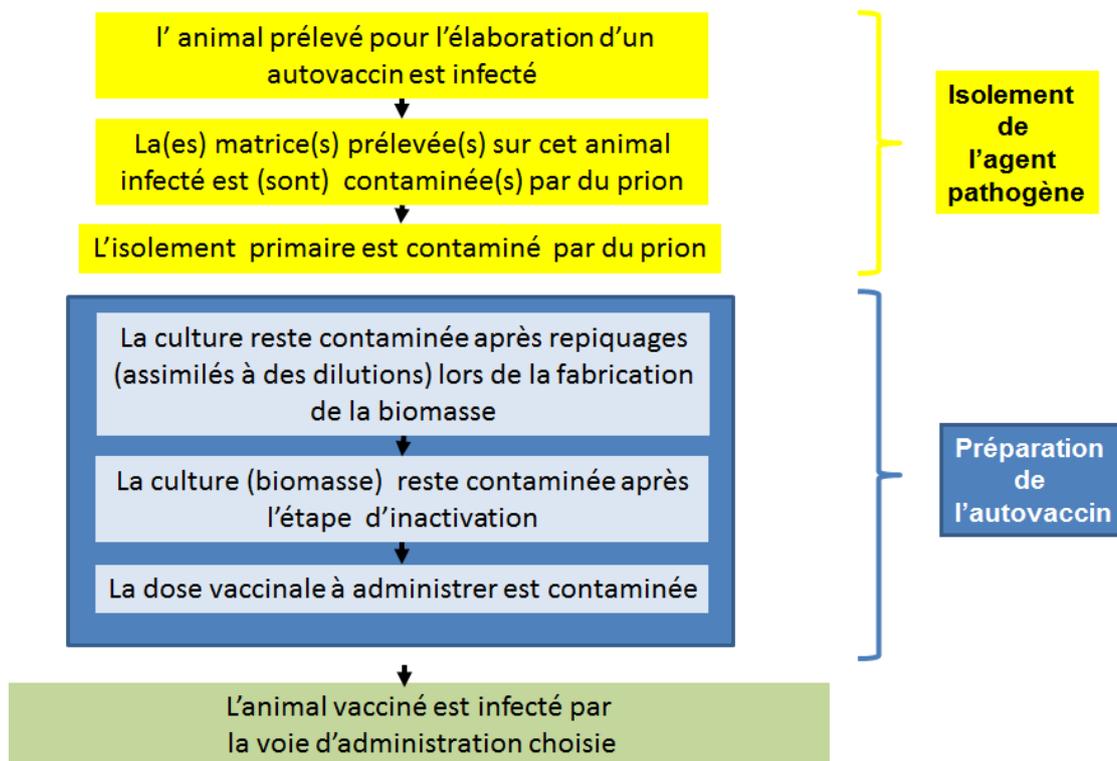


Figure 2 : Schématisation de la séquence d'évènements utilisée pour l'appréciation de la probabilité de transmission du prion par l'emploi d'autovaccins chez les ruminants en France (la biomasse correspond à une culture bactérienne réalisée en très grand volume visant à obtenir une quantité de bactéries suffisamment importante pour permettre la préparation des doses vaccinales).

4.4.1. Evaluation de la probabilité de réalisation d'un prélèvement sur un animal infecté

Cette probabilité découle directement de la situation épidémiologique de la France en matière d'EST chez les ruminants, tant sur le plan de la prévalence intercheptel qu'intracheptel. Elle a été décrite en détail dans le paragraphe 4.3.1. Nous n'en rappellerons que l'essentiel ici. Les prévalences des EST à l'échelle des populations françaises de ruminants sont résumées dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Prévalence des encéphalopathies spongiformes transmissibles en France

Type d'EST	Indicateurs de prévalence en France (données 2014, (Cazeau et al. 2015))
ESB classique	Aucun cas détecté (abattoir et équarrissage) en 2012, 2013 et 2014 sur 1 million de tests. Un cas a été détecté en mars 2016 (équarrissage). Prévalence apparente < 1/10 ⁶
ESB atypique	3 cas dépistés en 2014 (2 en abattoir, 1 à l'équarrissage) sur 1 million de tests Prévalence apparente < 3/10 ⁶
Tremblante atypique	Prévalence apparente : 1,2/10 000 pour les caprins 0,8/10 000 pour les ovins
Tremblante classique	Prévalence inférieure à 1/10 000

Comme le suggèrent les chiffres figurant dans le Tableau 1 et même si le nombre de tests réalisés pour la surveillance des EST a diminué depuis ces dernières années, la prévalence des EST chez les bovins, ovins et caprins en France est extrêmement faible. Cette situation épidémiologique très favorable constitue en soi un élément limitant fortement la probabilité de réaliser un prélèvement dans un cheptel infecté.

Le deuxième facteur épidémiologique de nature à influencer sur la probabilité d'effectuer un prélèvement sur un animal infecté est la prévalence intracheptel. Elle apparaît très variable selon le type d'EST. Pour l'ESB classique ou atypique ou bien pour la tremblante atypique, cette prévalence intracheptel est faible, puisqu'en général, on ne constate la présence que d'un seul cas dans le cheptel (plus aucun cas secondaires d'ESB observés à partir de 2002, (Anses 2011)). Pour la tremblante atypique (période 2002-2007), la probabilité de développer un cas de tremblante atypique ne semble pas plus élevée dans les troupeaux où il y a déjà eu un cas, par rapport à la population générale testée à l'abattoir ((Afssa 2009) sur la base de (Fediaevsky et al. 2010)). Néanmoins, des travaux récents réalisés au Portugal relèvent la présence de cas multiples (2 à 5 cas) dans 22% des troupeaux atteints de tremblante atypique (Orge et al. 2012). En revanche, pour la tremblante classique, la prévalence intracheptel peut être relativement variable, avec exceptionnellement des prévalences pouvant aller jusqu'à 30% de l'effectif dans les années à forte incidence (Corbière, Chauvineau-Perrin, Lacroux, Costes, et al. 2013, Corbière, Chauvineau-Perrin, Lacroux, Lugan, et al. 2013).

4.4.2. Evaluation de la probabilité d'infection des matrices utilisables pour la réalisation de l'isolement bactérien et étude des facteurs de variabilité du niveau d'infectiosité de ces matrices

De nombreux tissus (matrices) peuvent être utilisés pour identifier la bactérie responsable de la maladie. Les matières fécales, le lait ou certains tissus tels que les poumons, la rate, le pus, le placenta ou les lochies sont les plus utilisés (cf. paragraphe 4.2.3), mais l'isolement peut également être réalisé à partir du SNC, du foie, de nœuds lymphatiques, d'urine, d'écouvillons vaginal, nasal ou oculaire, de liquide céphalorachidien, de liquide de lavage bronchoalvéolaire

(LBA), de sang, etc. En cas d'infection par une maladie à prion, ces matrices présentent des niveaux d'infectiosité variables et influencés par un certain nombre de facteurs intrinsèques (tenant à l'animal) ou de facteurs extrinsèques. Il n'est pas envisageable de faire une liste exhaustive des connaissances sur le sujet. Seules les matrices couramment employées pour la recherche de l'agent bactérien responsable de maladie seront prises en compte, en incluant les matrices présentant les plus forts niveaux d'infectiosité de manière à pouvoir évaluer le risque maximal. De la même façon, les experts se sont limités à l'étude des facteurs de variabilité qui correspondent à un usage des autovaccins conforme à la réglementation. Ainsi ne seront pas abordées les variabilités qui résulteraient notamment d'infections hétérologues (bovins infectés par un prion de la tremblante ou petits ruminants infectés par l'agent de l'ESB, voir paragraphe 4.3.1.2).

4.4.2.1. Facteurs intrinsèques (tenant à l'animal) de variabilité de l'infectiosité tissulaire.

Les plus influents sont l'âge et le génotype de l'animal.

- **L'âge** est un facteur important de variabilité de l'infectiosité des différents tissus. Sur des animaux jeunes, l'infectiosité la plus élevée est constatée au niveau des organes lymphoïdes ou au niveau des tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT ou plaques de Peyer) ou à l'appareil respiratoire (BALT). En revanche, l'infectiosité du tissu nerveux est plutôt tardive, détectable après 48 mois chez les bovins infectés par des souches classique ou atypiques d'ESB et généralement après 18 mois chez les petits ruminants (à l'exception des génotypes très sensibles).
- **Le génotype** est également un facteur de variabilité très important de l'infectiosité des tissus ; chez les petits ruminants, la résistance génétique est connue depuis de nombreuses années chez les ovins (génotype R171 ou ARR). Sa mise en évidence chez les caprins est plus récente (génotype K222). Chez ces individus de génotype « résistant », le GT considère que l'infectiosité des organes lymphoïdes périphériques est inférieure à $10^{3,7}$ DI₅₀ IC pour la tremblante classique et $10^{2,7}$ DI₅₀ IC pour la tremblante atypique (seuil de détection des méthodes biochimiques mettant en évidence la PrP (ELISA, Western blot)), quel que soit l'âge de l'animal. Chez des ovins de génotype sensible (VRQ), le niveau d'infectiosité du système nerveux central peut atteindre 10^8 DI₅₀ IC chez un individu de moins de 18 mois *versus* 10^2 DI₅₀ IC chez des ovins du même âge mais de génotype non sensible. Aucun facteur génétique de sensibilité n'a été identifié à ce jour chez les bovins.

4.4.2.2. Les facteurs extrinsèques de variabilité de l'infectiosité tissulaire

Les trois principaux facteurs extrinsèques sont le type de souche de prion, le type de tissu prélevé et la disponibilité du résultat d'un test de dépistage effectué sur l'animal prélevé.

➤ Influence de la nature de la souche de prion

Elle n'est observée que chez les petits ruminants pour lesquels des différences sensibles de niveau d'infectiosité des tissus peuvent être constatées selon la souche de tremblante, classique ou atypique. Dans le cas de tremblante atypique, l'infectiosité des tissus périphériques est toujours inférieure à 10^2 DI₅₀ IC quel que soit l'âge de l'animal. En revanche, lors d'une infection par une souche de tremblante classique des niveaux d'infectiosité supérieurs à 10^6 DI₅₀ IC peuvent être constatés sur les NL ou le placenta, y compris sur des animaux relativement jeunes (<18 mois). Il

convient de souligner également une certaine variabilité de virulence au sein même de ces deux catégories (classique et atypique) se traduisant par des incubations raccourcies (i.e. souche de tremblante classique mise en évidence dans le SNC d'un petit ruminant âgé de 6 mois (Couquet et al. 2005)). Suivant le même raisonnement que pour les bovins les experts considèrent que les prions pourraient atteindre le SNC après l'âge de 3 mois.

➤ **Influence de la nature des tissus prélevés**

Quel que soit le type d'EST, les niveaux d'infectiosité les plus élevés sont constatés dans le SNC. On notera également le niveau d'infectiosité particulièrement élevé du placenta et des tissus lymphoïdes chez les petits ruminants (par exemple, $NL \geq 10^6$ DI₅₀ IC). Chez les petits ruminants, les travaux de Corbière et Andréoletti ont montré que la réalisation des tests sur les NL (mésentériques ou tonsilles palatines) en plus de l'obex permettait de détecter plus efficacement les animaux en incubation de tremblante et donc d'apporter des informations supplémentaires sur le niveau d'infectiosité de certains tissus (Corbière, Chauvineau-Perrin, Lacroux, Costes, et al. 2013). Ainsi le GT considère que la charge infectieuse du placenta ou des NL ne dépasse pas $10^{3,7}$ DI₅₀ IC pour la tremblante classique et $10^{2,7}$ DI₅₀ IC pour la tremblante atypique chez un individu testé négatif sur l'obex et sur une formation lymphoïde, alors que le niveau d'infectiosité pourrait atteindre $10^{5,5}$ DI₅₀ IC pour ces mêmes organes chez un animal seulement testé négatif sur l'obex (voir Annexe 3).

➤ **Influence de la réalisation de tests de dépistage et des modalités de réalisation de ces tests (voir Annexe 3)**

Dans le cadre de la surveillance des EST en France, tous les bovins morts de plus de 48 mois arrivant en équarrissage font l'objet d'une recherche systématique d'EST. Il en est de même pour un échantillonnage réalisé à l'équarrissage sur les petits ruminants de plus de 18 mois (39 954 ovins en 2014, 60 557 caprins en 2014 (Cazeau et al. 2015)). Les tests utilisés dits tests rapides (ELISA) ou tests biochimiques permettent d'obtenir un résultat en 48 h. Ils sont réalisés sur l'obex. On considère que leur seuil de détection se situe à 10^2 DI₅₀ IC pour l'ESB, à $10^{3,7}$ DI₅₀ IC pour la tremblante classique et à $10^{2,7}$ DI₅₀ IC pour la tremblante atypique.

4.4.2.3. Estimation de la variabilité de la charge infectieuse en fonction des matrices et du type d'EST

En s'appuyant sur les différents éléments exposés ci-dessus les experts ont élaboré différents scénarios afin d'évaluer le risque de transmission du prion en cas d'utilisation d'autovaccin chez les ruminants. Ils n'ont pas abordé les risques d'infection hétérologue pouvant résulter de l'utilisation d'un autovaccin pour une autre espèce que celle à partir de laquelle l'isolement bactérien a été réalisé. Il n'a pas été non plus développé le cas de l'infection de petits ruminants par l'agent de l'ESB. Cette éventualité est en effet exceptionnelle (2 cas seulement décrits à ce jour chez les caprins). Les experts considèrent en outre que le résultat serait identique à celui de la tremblante classique compte tenu de la distribution et du niveau de l'infectiosité de l'ESB dans les infections expérimentales (Bellworthy et al. 2005, McGovern et al. 2015).

Le cas des animaux testés positifs dans le cadre des opérations de surveillance n'a pas été pris en compte dans les différents scénarios, la réalisation de prélèvements sur de tels animaux étant bien évidemment à proscrire. D'autre part, seules les matrices classiquement utilisées dans les conditions habituelles du terrain pour la recherche de l'agent pathogène ont été prises en compte

pour ne pas surcharger les schémas. Le lecteur peut se référer à l'Annexe 4 qui répertorie l'ensemble des données disponibles sur l'infectiosité des autres matrices.

Les données disponibles dans la littérature sur le niveau d'infectiosité des différents tissus reposent selon les cas, sur la réalisation de tests biochimiques (méthodes employées sans amplification préalable par PMCA¹⁴) ou de bioessais (sur souris transgéniques ou sur ruminants). La limite de détection de ces différentes méthodes dépend de la nature de la méthode mais également de la souche de prion (BSE, tremblante classique ou tremblante atypique). Pour les tests biochimiques, la limite de détection est dépendante de la résistance des prions à la protéolyse ou/et de la plus ou moins grande affinité des anticorps utilisés.

S'appuyant sur les données bibliographiques (cf. Annexe 4), les experts du GT ont considéré que lorsque le résultat des méthodes biochimiques de la PrP^{Sc} était négatif, l'infectiosité était égale ou inférieure :

- à 10^2 DI₅₀ IC / g ou mL pour l'ESB ;
- à $10^{3,7}$ DI₅₀ IC / g ou mL pour la tremblante classique ;
- à $10^{2,7}$ DI₅₀ IC/ g ou mL pour la tremblante atypique dans les ganglions lymphatiques ;
- à $10^{7,7}$ DI₅₀ IC/ g ou mL pour la tremblante atypique, dans le SNC.

En cas de résultat négatif obtenu avec une méthode de type bioessai (plus sensible que les méthodes biochimiques), l'infectiosité des tissus n'est pas mesurable et a donc été estimée par défaut inférieure ou égale à 10 DI₅₀ IC/g ou mL.

En l'absence de donnée précise, les niveaux d'infectiosité tissulaires pour un bovin atteint d'ESB atypiques (L ou H) ont été considérés comme équivalents à ceux d'un bovin atteint d'ESB classique.

Les niveaux d'infectiosité constatés dans les différents organes sont variables selon le stade évolutif. Les chiffres utilisés dans les figures qui suivent correspondent aux valeurs maximales mentionnées dans la littérature.

Il n'est pas possible de décrire en 4 schémas toute la diversité des souches de prions et leurs interactions avec leurs hôtes de différentes espèces et génotypes et les informations tirées de ces 4 schémas ne sont pas transposables à d'autres situations. Le raisonnement prend en compte également la réalisation éventuelle d'un test de dépistage, tel que prévu par la réglementation ou tel qu'il pourrait être appliqué par le laboratoire pour certains tissus. Enfin, les doses infectantes figurant dans les schémas sont exprimées en DI₅₀ IC par g ou mL et il est rappelé que le volume d'une dose vaccinale est généralement de 1 mL.

Avertissement important : Ces schémas visent avant tout à donner un ordre de grandeur des charges infectieuses susceptibles d'être contenues dans les doses vaccinales, en fonction de la nature du prélèvement utilisé d'une part et du type d'EST d'autre part. Il est rappelé que les chiffres obtenus correspondent au scénario le plus défavorable (expliqué au point 4.4.3.2, p. 50).

¹⁴ PMCA : *Protein Misfolding Cyclic Amplification*, technique d'amplification du prion dans un tube à essai.

➤ **Evaluation de la dose infectante (DI) résiduelle en fonction de la nature des matrices prélevées dans un contexte d'infection par l'ESB classique ou par ESB atypique (Bovins) (Figure 3)**

Dans le cas de la réalisation d'un prélèvement sur un animal infecté d'ESB classique ou atypique, le système nerveux central est le seul prélèvement dont la DI peut atteindre $10^{6,1} DI_{50} IC$, s'il provient d'un animal de moins de 48 mois non testé. Les experts du GT considèrent néanmoins que le SNC de bovins âgés de moins de 12 mois ne présente pas de risque prion. En effet, la présence de PrP^{Sc} a été détectée au plus tôt 24 mois après infection expérimentale dans le tronc cérébral d'un bovin (Hoffmann et al. 2007). Il est de plus considéré que l'agent de l'ESB atteint le SNC dans la deuxième moitié de cette période d'incubation (soit au-delà de 12 mois). Les autres tissus ou fluides présentent des niveaux d'infectiosité inférieurs ou égaux à $10^2 DI_{50} IC$, quel que soit l'âge de l'animal. Au terme des opérations de préparation de l'autovaccin et en tenant compte du facteur de réduction résultant de la voie d'administration, SC ou IM, les niveaux d'infectiosité résiduels dans l'autovaccin sont inférieurs ou égaux à 0,01 DI_{50} , quelle que soit la nature de la matrice utilisée pour l'isolement bactérien, sauf dans le cas d'un prélèvement de départ constitué par le SNC d'un animal de moins de 48 mois non testé.

➤ **Evaluation de la DI résiduelle en fonction de la nature des matrices prélevées dans un contexte d'infection par la tremblante atypique (Figure 4)**

La tremblante atypique se caractérise par une faible infectiosité des tissus périphériques (inférieure ou égale à $10^{2,7} DI_{50} IC$), quels que soient l'âge des petits ruminants et la nature du tissu. Le prion est concentré dans le système nerveux central, avec des niveaux d'infectiosité pouvant atteindre $10^{7,7} DI_{50} IC$ chez un individu de plus de 18 mois testé négatif, voire $10^{9,5} DI_{50} IC$ chez un animal non testé quel que soit son âge. Au terme des opérations de préparation de l'autovaccin et en tenant compte du facteur de réduction résultant de la voie d'administration, SC ou IM, le niveau d'infectiosité résiduel dans l'autovaccin est compris entre 0 et $10^{5,5} DI_{50}$ pour un isolat réalisé à partir du SNC d'un animal non testé, et compris entre 0 et $10^{3,7} DI_{50}$ pour un isolat réalisé chez un animal testé négatif (âgé de plus de 18 mois). Pour les isolats réalisés à partir d'autres matrices que le SNC, le titre infectieux résiduel potentiel est inférieur à 0,1 DI_{50} dans toutes les configurations.

➤ **Evaluation de la DI résiduelle en fonction de la nature des matrices prélevées dans un contexte d'infection par la tremblante classique (Figure 5 et Figure 6)**

Deux situations peuvent être rencontrées, selon le profil génétique des petits ruminants. Chez les individus de génotype résistant (R171 pour le mouton et K222 chez la chèvre), les niveaux d'infectiosité des différents tissus sont considérés comme similaires à ceux constatés chez un animal infecté de tremblante atypique.

Chez les individus de génotype sensible, l'infection par le prion de la tremblante classique se traduit par des niveaux d'infectiosité généralement plus élevés, variables selon la matrice mais relativement élevés pour les tissus périphériques contrairement à ce qui est constaté dans un cas de tremblante atypique.

a) Cas d'un ovin/caprin vivant

Dans ce cas, (Figure 5) les niveaux d'infectiosité les plus importants sont constatés sur le placenta, les nœuds lymphatiques et sur l'écouvillon lacrymal (jusqu'à $10^{5,5}$ DI₅₀ IC). En l'absence de données précises, le niveau d'infectiosité du pus d'abcès localisés sur des ganglions (lymphadénite caséuse) a été considéré comme équivalent à celui d'un nœud lymphatique. Il en a été de même pour un écouvillon lacrymal (EL), prenant en considération la présence de formations lymphoïdes sur la troisième paupière qui peuvent être frottées lors de la réalisation du prélèvement (scénario du pire).

Au terme des opérations de préparation de l'autovaccin et en tenant compte du facteur de réduction résultant de la voie d'administration, SC ou IM, le niveau d'infectiosité résiduel dans l'autovaccin est compris entre 0 et 1 DI₅₀ si les matrices à risque (LBA, NL et placenta) se sont révélées négatives au test de dépistage. Dans les autres cas de figure (test positif ou pas de test), ces différentes matrices présentent un taux résiduel dans l'autovaccin inférieur ou égal à 10^2 DI₅₀.

b) Cas d'un ovin/caprin mort

Chez l'animal mort infecté de tremblante classique, on constate (cf. Figure 6) que le tissu susceptible de présenter le plus haut niveau d'infectiosité est le SNC chez un individu non testé ($\leq 10^{6,8}$ DI₅₀ IC). Il convient de noter également la variabilité de l'infectiosité du placenta, des nœuds lymphatiques, de l'écouvillon lacrymal ainsi que la rate selon que le test de dépistage a été réalisé sur l'obex seulement ($\leq 10^{5,5}$ DI₅₀ IC) ou sur l'obex et sur les NL mésentériques ($\leq 10^{3,7}$ DI₅₀ IC).

Au terme des opérations de préparation de l'autovaccin et en tenant compte du facteur de réduction résultant de la voie d'administration, SC ou IM, le niveau d'infectiosité résiduel dans l'autovaccin est compris entre 0,01 DI₅₀ et $10^{2,8}$ DI₅₀, le niveau d'infectiosité le plus important étant constaté pour le SNC prélevé sur animal non testé.

Pour résumer ces différents schémas (illustrant le scénario le plus défavorable), et en l'absence de réalisation d'un test de dépistage d'EST, les doses infectantes les plus importantes susceptibles d'être administrées par l'intermédiaire d'un autovaccin sont constatées lorsque l'isolement bactérien a été effectué :

- sur du SNC pour toutes les EST des ruminants (classiques ou atypiques) ;
- sur le placenta, la rate, les nœuds lymphatiques (ou pus isolé d'abcès localisés sur un NL) ou à partir d'un écouvillon lacrymal pour la tremblante classique.

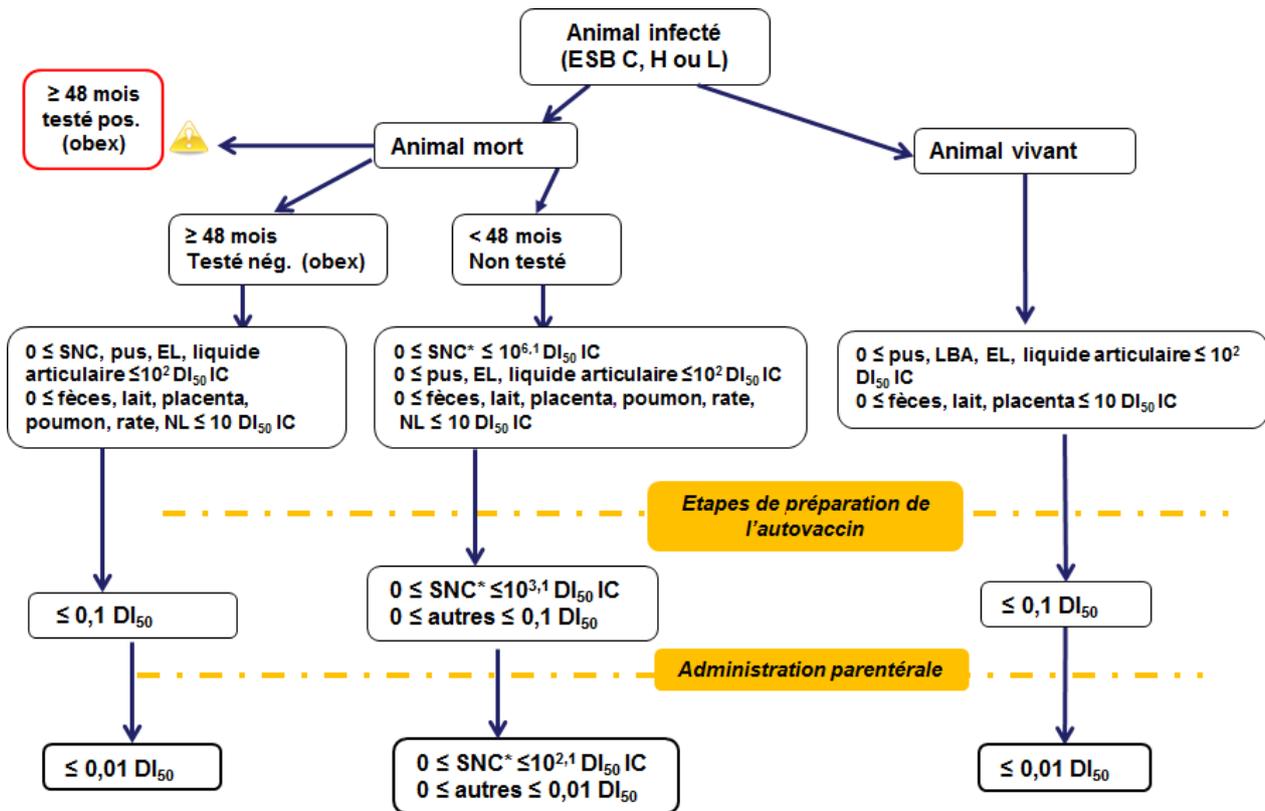


Figure 3 : Evaluation de la DI résiduelle en fonction de la nature des matrices prélevées pour la préparation d'un autovaccin, dans le cas de l'ESB classique des bovins et par extension d'ESB H ou L ($DI_{50} = DI_{50} \text{ IC/g}$ ou mL bovins ou souris transgénique bovine (valeurs issues de (EFSA 2014b), voir pour complément d'information le Tableau 6, Annexe 4 ; NL = nœud lymphatique, LBA = Lavage broncho alvéolaire ; SNC = système nerveux central ; ⚠ = les experts considèrent que les prélèvements sur ces animaux sont à écarter, * Les experts du GT considèrent que le SNC de bovins âgés de moins de 12 mois ne peut contenir de l'infectiosité prion).

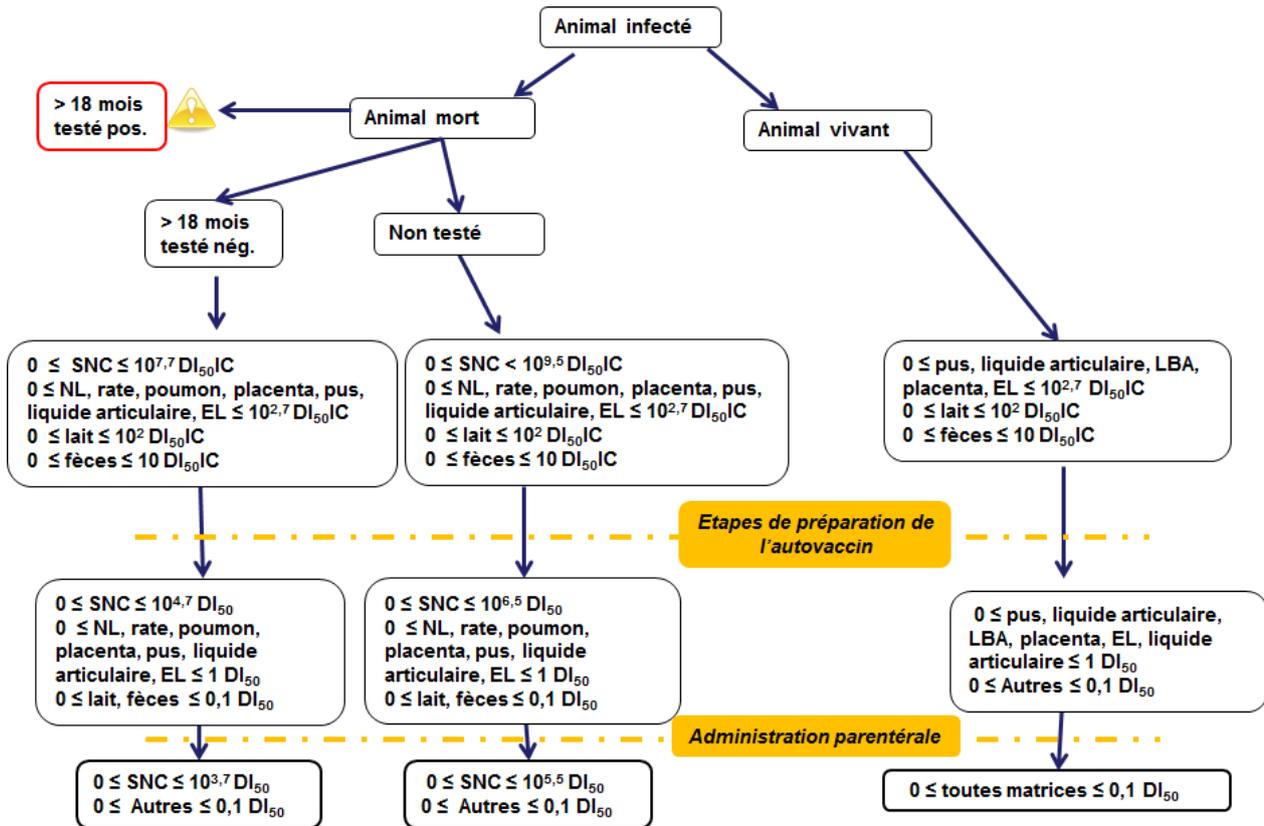


Figure 4 : Evaluation de la DI résiduelle en fonction de la nature des matrices prélevées pour la préparation d'un autovaccin, dans le cas de la tremblante atypique des petits ruminants (DI_{50} = DI_{50} IC/g ou mL ovins ou souris transgénique ovine, valeurs issues de (Andréoletti et al. 2011), voir pour complément d'information le Tableau 7 Annexe 4 ; NL = nœud lymphatique y compris pus d'abcès localisés sur les NL, LBA = Lavage broncho alvéolaire ; SNC = système nerveux central, EL = écouvillon lacrymal ; ⚠ = les experts considèrent que les prélèvements sur ces animaux sont à écarter).

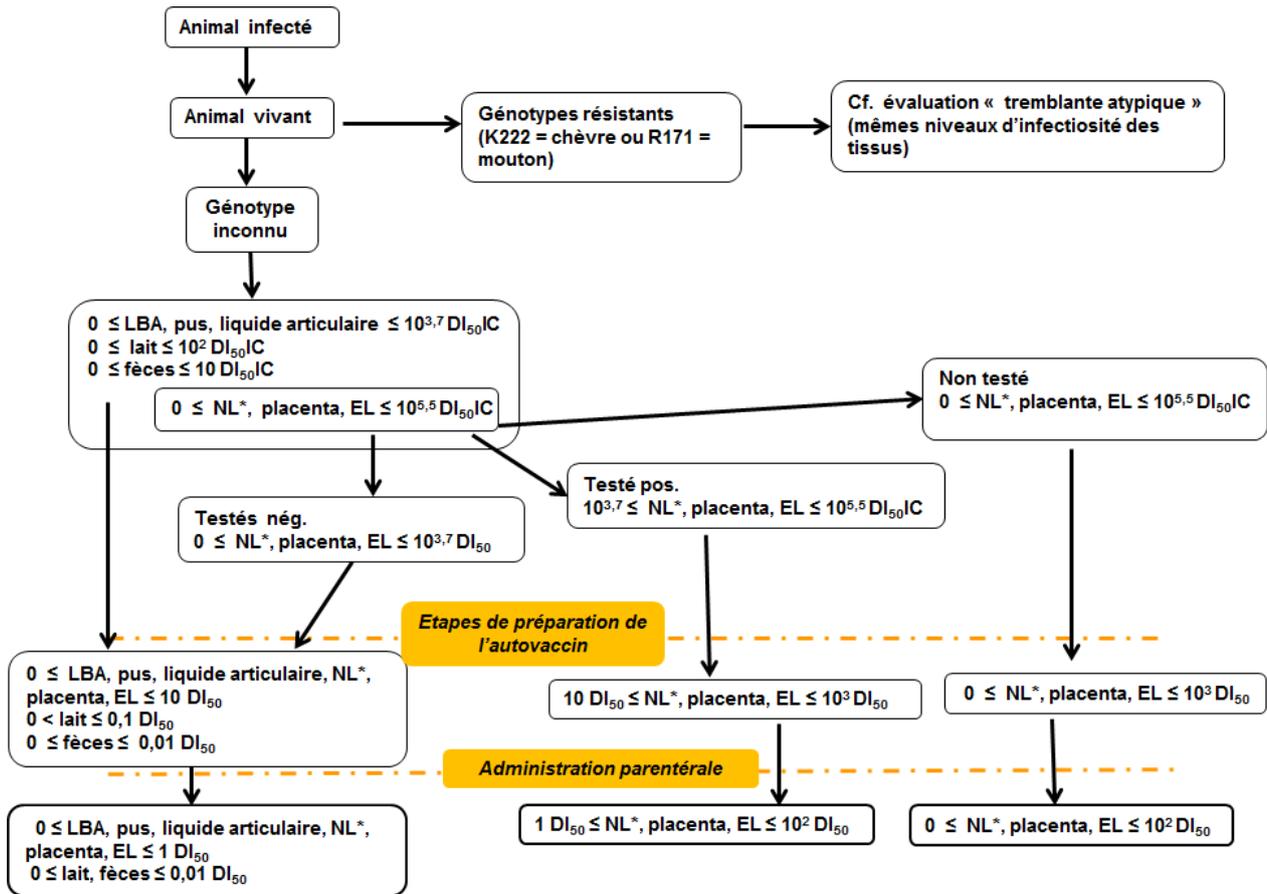


Figure 5 : Evaluation de la DI résiduelle en fonction de la nature des matrices prélevées pour la préparation d'un autovaccin, dans le cas de la tremblante classique des petits ruminants, pour un prélèvement pratiqué sur un animal vivant (DI₅₀ = DI₅₀ IC/g ou mL ovins ou souris transgénique ovine, voir pour les valeurs le Tableau 8, Annexe 4 ; NL = nœud lymphatique,* y compris pus d'abcès localisés sur les NL; LBA = Lavage broncho alvéolaire ; SNC = système nerveux central ; ⚠ = les experts considèrent que les prélèvements sur ces animaux sont à écarter).

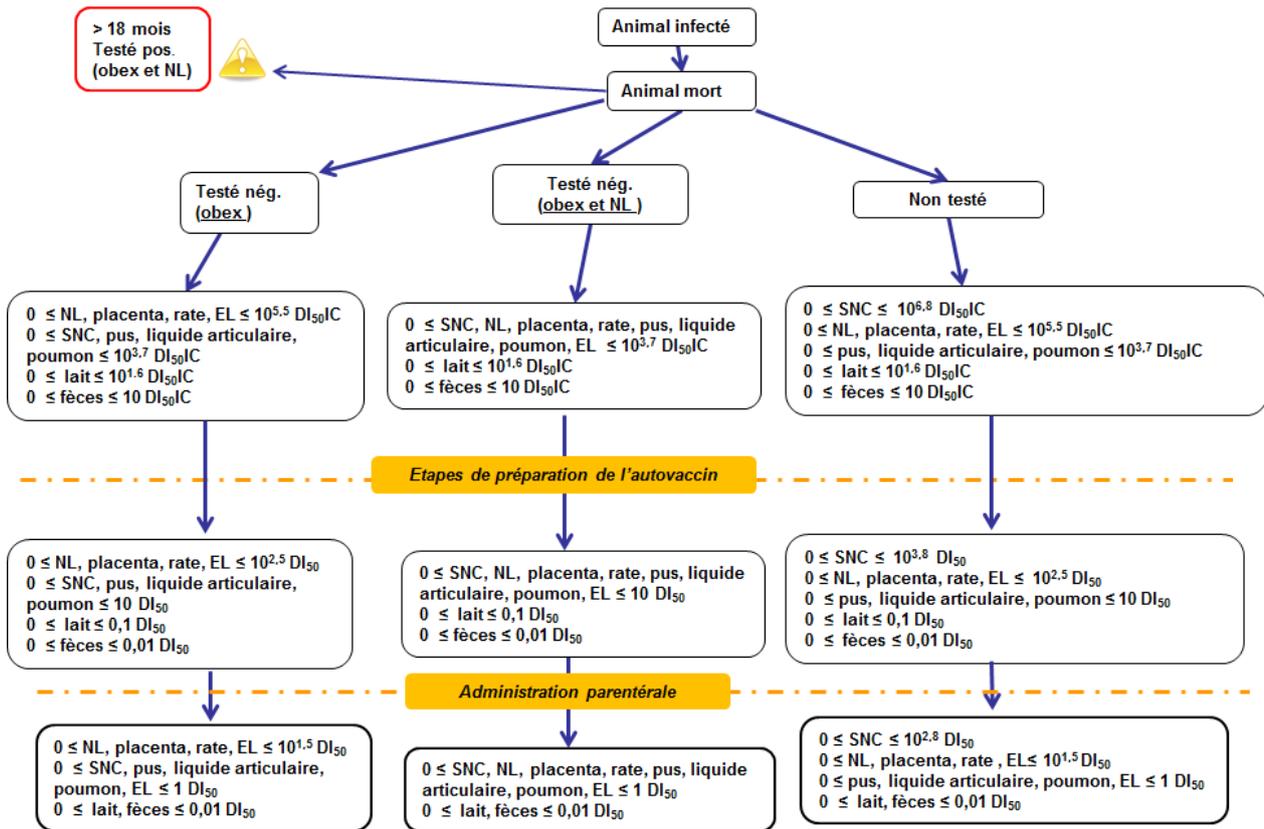


Figure 6 : Evaluation de la DI résiduelle en fonction de la nature des matrices prélevées pour la préparation d'un autovaccin, dans le cas de la tremblante classique des petits ruminants, pour un prélèvement pratiqué sur un animal mort (DI₅₀ = DI₅₀ IC/g ou mL ovins ou souris transgénique ovine, voir pour les valeurs le Tableau 8, Annexe 4 ; NL = nœud lymphatique y compris pus d'abcès localisés sur les NL ; LBA = Lavage broncho alvéolaire ; SNC = système nerveux central ; ⚠ = les experts considèrent que les prélèvements sur ces animaux sont à écarter).

4.4.3. Evaluation de la probabilité d'obtention d'un autovaccin contaminé par le prion au terme du processus de préparation

Pour appréhender cette partie, il est nécessaire de rappeler brièvement les différentes étapes de préparation d'un autovaccin, de l'isolement du germe responsable jusqu'à la préparation des doses vaccinales.

4.4.3.1. Rappels des différentes étapes de préparation d'un autovaccin

La préparation d'un autovaccin s'opère schématiquement en deux phases :

- l'isolement de l'agent pathogène responsable de la maladie, réalisé généralement dans un laboratoire d'analyses de terrain ;
- la préparation de l'autovaccin *sensu stricto*, effectuée dans des établissements spécialisés et disposant d'une autorisation administrative délivrée par l'ANMV.

➤ L'isolement de l'agent pathogène responsable de la maladie

Cet isolement s'effectue à partir d'un prélèvement effectué par un vétérinaire praticien sur l'animal vivant ou à l'occasion d'une autopsie par le praticien ou par le laboratoire d'analyses. L'ensemencement du milieu d'isolement est réalisé avec une prise d'essai variant de quelques μL (1 oëse¹⁵ d'ensemencement = 1 à 10 μL) à 100 μL pour les matrices liquides (lait, urine) et de quelques milligrammes jusqu'à un gramme pour les matrices solides comme les matières fécales. Cette étape d'ensemencement peut être précédée d'une étape d'enrichissement notamment lorsque le prélèvement provient d'un animal traité avec des antibiotiques. L'enrichissement se fait soit en bouillon type cœur cerveau, soit dans des bouillons d'enrichissement spécifiques (par exemple bouillon Fraser pour les listeria ou bouillon sélénite pour les salmonelles). Le caractère fréquemment polymicrobien du prélèvement nécessite souvent plusieurs opérations de repiquage avant de pouvoir disposer d'une culture pure permettant de réaliser l'étape d'identification du germe (en galerie API par exemple). Cette identification peut être complétée par une recherche de facteurs de pathogénicité (i.e. facteurs d'attachement ou toxines de colibacilles) et par la réalisation d'un antibiogramme. La pureté de la souche est régulièrement contrôlée par ensemencement sur gélose solide des inoculums ayant servi à la réalisation de la galerie API ou de l'antibiogramme. Les différents milieux de culture utilisés par les laboratoires d'analyse du terrain ne sont pas, pour leur très grande majorité, certifiés fabriqués avec des matières premières exemptes de prion. Lorsqu'une demande d'autovaccin est formulée par le vétérinaire praticien, le laboratoire d'analyses effectue, avant expédition au préparateur de l'autovaccin, un dernier repiquage sur milieu de conservation, le plus souvent à partir de la boîte de contrôle de l'inoculum d'identification.

¹⁵ Anneau de plastique à usage unique, utilisé pour prélever (colonie, liquide) ou pour l'isolement de bactéries sur un milieu solide (anciennement anse de platine stérilisable à la chaleur).

➤ La préparation de l'autovaccin

La commande de préparation d'un autovaccin s'effectue sur ordonnance, en indiquant le contexte de la demande et en précisant l'effectif et l'espèce à vacciner. Cette ordonnance accompagne la souche bactérienne identifiée et isolée par le laboratoire d'analyse. Lorsque la réglementation en vigueur¹⁶ permet la préparation d'un autovaccin, le laboratoire préparateur vérifie à nouveau l'identité et la pureté de la souche réceptionnée. Lorsque les résultats sont satisfaisants, les milieux de culture appropriés sontensemencés et la culture bactérienne est amplifiée autant que nécessaire. La fabrication de la biomasse est réalisée soit dans de grandes boîtes de culture (boîtes de Roux) à usage unique, soit dans des cuves à fermentation plus volumineuses et réutilisables. Toutes les matières premières d'origine animale utilisées entrant dans la composition des milieux de culture, sont identifiées et doivent être conformes à la réglementation sur les EST¹⁷. Après récolte, la concentration bactérienne est mesurée et la pureté de la souche peut à nouveau être vérifiée; la récolte est ensuite inactivée. Plusieurs protocoles d'inactivation peuvent être employés, les deux plus fréquemment utilisés sont l'inactivation par le formol ou l'inactivation par la chaleur (maximum 85°C), les protocoles appliqués étant adaptés aux souches à traiter (température, durée, ou concentration). Un contrôle d'inactivation est systématiquement effectué, la culture est ensuite traitée afin de réduire la quantité de résidus liés au processus de préparation. Sur la base des valeurs de concentration d'antigène ainsi obtenues, les volumes d'antigène et d'adjuvant appropriés sont mélangés pour la préparation d'un lot d'autovaccin. Les adjuvants autorisés¹⁸ font l'objet de l'annexe II jointe à l'autorisation de préparation d'autovaccins. Après répartition, étiquetage et emballage, le lot d'autovaccin est stocké en chambre froide. La stérilité du lot de produit fini est à nouveau contrôlée avant libération du lot.

Le préparateur d'autovaccins peut être amené à créer une souchothèque (conservation de souches bactériennes, essentiellement par congélation), notamment pour satisfaire des commandes ultérieures pour un même élevage.

L'ouverture d'un établissement de préparation d'autovaccins est soumise à autorisation. Les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP), telles que définies par l'arrêté du 6 mars 2008 du Code de la Santé publique, garantissent la traçabilité, la sécurité et la qualité des autovaccins : les obligations relatives aux BPP visent à garantir la qualité des autovaccins préparés par le biais d'une qualification de l'environnement scientifique et technique (obligation de moyens) du laboratoire préparateur d'autovaccins. Leur mise en œuvre est contrôlée par inspection réalisée par l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire.

¹⁶ Cf les articles L. 5141-2, L. 5141-12, R. 5141-129 à R. 5141-141 et D. 5141-142 du Code de la santé publique.

¹⁷ En conformité avec le document "Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products ([EMA/410/01 rev.3](#)).

¹⁸ Ne sont retenus que les adjuvants sans aucune limite maximale de résidus (LMR) requise, inscrits au tableau 1 du [règlement \(UE\) n°37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009](#). Le cas échéant, ils doivent également être conformes à la réglementation sur les EST.

4.4.3.2. Impact des modalités de préparation sur la probabilité de production d'un autovaccin contaminé par le prion

➤ Impact des étapes de l'isolement primaire à la préparation de la biomasse

La probabilité de contamination des doses vaccinales peut être considérée comme le croisement de probabilités de survenue d'un certain nombre d'évènements se produisant tout au long du processus de préparation de l'autovaccin tel que décrit ci-dessus. La Figure 2, page 37, résume cette séquence d'évènements à partir de laquelle les experts ont construit leur raisonnement. La principale difficulté rencontrée pour évaluer le risque est représentée par l'absence de données scientifiques publiées portant sur les relations pouvant exister entre le prion et les bactéries. Le fait que le prion se présente essentiellement sous la forme d'agrégats, suggère qu'il ne sera pas dispersé de manière homogène dans le prélèvement et qu'il en sera de même tout au long des étapes conduisant à l'obtention de l'autovaccin. Toutefois, on ignore si le prion peut présenter une affinité particulière pour la surface des bactéries ou pas, voire s'il peut pénétrer dans les bactéries. Ainsi, à chaque repiquage ou à chaque étape de dilution, il existe une forte incertitude quant au niveau de probabilité de prélever des colonies ou une prise d'essai « contaminées » par du prion.

Faute de pouvoir quantifier avec précision le niveau de réduction de l'infectiosité « prion », les experts ont développé quatre scénarios différents d'évaluation de l'impact des étapes de préparation de l'autovaccin sur la dose finale infectante contenue dans chaque dose vaccinale (cf. Annexe 5). **Quelque soit le scénario, les experts ont estimé à 10^3 la réduction minimale du niveau d'infectiosité entre la matrice ayant servi à l'isolement de l'agent pathogène et la culture bactérienne préparée par le préparateur d'autovaccins (biomasse). Ce chiffre ne tient compte que de la valeur de la prise d'essai classiquement utilisée pour l'ensemencement primaire des milieux de culture en vue de l'isolement/identification (de l'ordre du mg ou du μ L). Il exclut tous les autres facteurs de réduction liés aux autres étapes de la préparation de l'autovaccin et correspond donc au scénario le plus défavorable, tel qu'envisagé au point 4.4.2.3, notamment dans les figures 3, 4, 5 et 6.**

L'emploi de cuves à fermentation pour la production de cette biomasse représente un risque difficilement quantifiable mais non nul de contamination entre deux productions successives d'autovaccin compte tenu des propriétés d'adhésion des prions aux surfaces (Zobeley et al. 1999). Par ailleurs, la décontamination efficace de ces matériels nécessite l'utilisation de produits et procédés corrosifs, tandis que l'utilisation de matériel à usage unique permet aisément de prévenir tout risque de contamination croisée.

➤ Impact de l'étape d'inactivation

L'inactivation est réalisée par action unique du formol ou par action combinée du formol et de la chaleur. Si l'on se réfère aux deux exemples de transmission iatrogène de tremblante chez les petits ruminants décrits dans l'introduction, on pourrait conclure à l'absence d'effet du formol sur le prion. Toutefois il convient de se rappeler qu'il s'agit là de vaccins préparés à partir de broyats d'organes et non d'isolats viraux ou bactériens. Il n'est donc pas impossible que la présence de matières organiques (tissu nerveux ou lymphatique) ait pu protéger le prion de l'action du formol. Les prions présentent une résistance particulière aux procédés classiques d'inactivation. Leur profil de résistance varie en fonction des souches. La réduction du titre infectieux prion par les procédés thermiques d'inactivation bactérienne et/ou virale reste limitée. L'inactivation par les

agents aldéhydiques (type formol) est limitée également (réduction de un à deux logs dans le cas d'une matrice fortement infectée (Brown et al. 1982)). Elle dépend de la concentration active, du temps de contact et de la température. Il est à noter qu'une fixation aldéhydique préalable des prions augmente leur résistance à la décontamination par la chaleur (Brown et al. 1990). Ainsi l'OMS classe le formol comme inefficace vis-à-vis des prions. La question reste posée lorsque l'agent inactivant est appliqué sur des tissus à faible dose infectante ou sur des suspensions bactériennes contaminées, que le prion soit dans la suspension, ou fixé à la surface de bactéries ou dans les bactéries. De plus, la concentration de la solution de formol employée dans la publication de Brown est supérieure à celle utilisée pour la préparation des autovaccins (Brown et al. 1982). Cette concentration faible est choisie de manière à inactiver les bactéries sans altérer leurs composants antigéniques et de manière à ne pas provoquer des réactions locales au lieu de l'injection vaccinale.

En conclusion et sur la base des données disponibles, il a été considéré que, sans pouvoir l'établir avec précision, l'efficacité en matière de réduction de l'infectiosité « prion » des procédés d'inactivation utilisés, n'était pas nulle (> 1) mais au mieux faible ($< 1 \log_{10}$) (scénario le plus défavorable).

4.4.4. Influence des modalités d'administration de l'autovaccin sur la probabilité d'infecter l'animal vacciné par du prion contenu dans la dose vaccinale

Les autovaccins sont administrés par voie parentérale chez les ruminants (majoritairement en sous cutanée ou plus rarement en intramusculaire). Comparativement à la voie intracérébrale, ces voies d'inoculation du prion apparaissent moins « efficaces ». Les experts s'appuyant sur les données présentées dans le paragraphe (cf. 4.3.2 Mode de contamination et doses infectantes) ont estimé à au moins 10 **le facteur de réduction lié à la voie d'administration de l'autovaccin**

En résumé, la réduction de l'infectiosité « prion » au cours de la préparation de l'autovaccin (en intégrant toutes les étapes) est estimée supérieure à un facteur de 10^3 . Le mode d'administration parentérale entraîne une réduction estimée du niveau d'infectiosité d'au moins un facteur de 10.

4.4.5. Appréciation globale de la probabilité de transmission du prion par usage d'autovaccins chez les ruminants

Dans la démarche d'appréciation globale du risque, les experts n'ont pris en compte que le risque pour la santé animale. Le risque lié à une inoculation accidentelle au manipulateur d'un autovaccin destiné à des ruminants et pouvant contenir du prion a été écarté compte tenu de :

- la rareté de cet évènement (pour l'ensemble des vaccins vétérinaires toutes espèces confondues, les injections accidentelles ayant entraîné un effet indésirable sont de 93 cas en 2011 (Anses 2012) et de 100 cas en 2012 (Anses 2013d)) ;
- les précautions prises par les vétérinaires comme lors de tout acte médical (contention, port de gants, matériel adapté, etc.), ainsi que les conseils donnés par les vétérinaires lors de la prescription ;
- la quantité minimale de DI susceptible d'être injectée (s'agissant plus souvent d'une piqûre avec une aiguille souillée que d'une injection de la suspension vaccinale) ;
- et l'existence de la barrière à la transmission inter- espèces.

N'a pas été non plus pris en compte le risque lié à l'utilisation de milieux de culture non conformes aux recommandations de la pharmacopée européenne vis-à-vis des EST, dans les laboratoires d'analyses réalisant l'isolement et l'identification de la bactérie responsable du processus morbide. Au cours de cette étape, les milieux de culture classiquement utilisés par les laboratoires d'analyses sont majoritairement des milieux inertes synthétiques. Quelques milieux contiennent des composants biologiques (sang, sérum, lait, extrait de viande ou cervelle), sans risque majeur de transmission de prion, compte tenu de l'origine de ces composants. Ainsi, le bouillon cœur cervelle, (BHI = Brain Heart Infusion) classiquement employé pour réaliser un enrichissement et qui représente probablement le risque le plus élevé, contient généralement du système nerveux de veau.

Pour établir l'appréciation globale de la probabilité de transmission du prion par utilisation des autovaccins chez les ruminants, différents paramètres doivent être pris en compte :

- la prévalence intercheptel et intracheptel qui va en particulier conditionner le nombre d'animaux susceptibles d'être infectés (Les experts du GT ont choisi de se placer dans la configuration la plus défavorable, c.à.d. ne prenant pas en compte l'impact potentiel de facteurs de résistance d'origine génétique) ;
- la taille du cheptel, conditionnant notamment le nombre de doses vaccinales préparées et le nombre d'animaux susceptibles de recevoir le vaccin et donc d'être infectés en fonction de la prévalence intracheptel ;
- le nombre de doses vaccinales pouvant contenir du prion ;
- et la DI contenue dans chaque dose vaccinale injectée.

Les deux derniers paramètres sont dépendants de la manière dont se répartissent dans les doses vaccinales les prions présents dans la prise d'essai réalisée pour l'isolement et l'identification bactérienne. Comme indiqué précédemment, les experts du GT ont construit quatre scénarios de répartition de la charge infectieuse:

- Scénario 1 : le prion reste tout au long du processus de préparation, sous la forme d'agrégats associés aux bactéries initialement prélevées qui se retrouvent toutes dans

une seule dose vaccinale. Cette dose vaccinale contient donc au final l'intégralité de la charge infectieuse de départ.

- Scénario 2 : le ou les agrégats de prion se dissocient et la charge infectieuse se dilue progressivement au cours des différentes étapes de préparation de l'autovaccin, chaque dose vaccinale contenant à terme une charge infectieuse équivalente.
- Scénario 3 : lors des étapes de repiquage en milieu solide, le prion reste sous forme d'agrégats associés aux bactéries, mais en milieu de culture liquide, il se répartit de façon équivalente entre toutes les doses vaccinales.
- Scénario 4 : le prion reste tout au long du processus de préparation, sous la forme d'agrégats associés aux bactéries mais la charge infectieuse initiale se répartit de manière équivalente dans un nombre variable de doses vaccinales (1/3, 2/3 ou la totalité des doses vaccinales). Ce scénario, variante du scénario 1, peut être considéré comme le scénario le plus défavorable (conservation de l'intégralité de la charge infectieuse initiale et répartition de celle-ci dans un nombre plus ou moins important de doses vaccinales).

Ces différents scénarios sont détaillés dans l'Annexe 5, l'Annexe 6 présente les calculs mis en œuvre pour l'appréciation globale du risque. Les 4 scénarios permettent d'évaluer le niveau de la charge infectieuse de la (des) dose(s) vaccinale(s) contaminée(s) et la probabilité de survenue de l'évènement. Les charges infectieuses retrouvées dans les doses vaccinales pour les scénarios 1 et 4, sont estimées réduites d'un facteur 10^{-3} par rapport à la dose initiale. Dans les scénarios 2 et 3, elles correspondent à une dilution de la DI initiale d'un facteur de 10^{-19} à 10^{-27} . Il n'existe pas de données précises sur la probabilité qu'un individu s'infecte ou non en recevant de telles charges infectieuses. Les données disponibles sur la relation dose/effet sont parcellaires et le plus souvent limitées à des doses infectantes supérieures ou égales à 0,1 DI_{50} . Dans les cas des calculs présentés en Annexe 6, les probabilités d'infection ont été extrapolées en utilisant la fonction de Konold (Konold et al. 2012).

Compte tenu de ces éléments, les chiffres obtenus dans les calculs de l'Annexe 6 sont entachés d'une certaine incertitude (Tableau 3) et il n'est pas possible de hiérarchiser les différents scénarios développés par ordre de probabilité de survenue.

En résumé de l'Annexe 6, repris au Tableau 2, les calculs montrent que, dans le cas des ESB, pour :

- une prévalence nationale de $3 \cdot 10^{-6}$ (prévalence cumulative des ESB classique et atypique),
- une prévalence intratroupeau variant de 1 animal à 5% des animaux ;
- une taille de cheptels de 50 ou de 350 animaux ;
- et une DI dans la prise d'essai variant de 0,01 à 10 DI_{50} ;

la probabilité d'infecter au moins un animal sensible varie de $2 \cdot 10^{-20}$ à $1,2 \cdot 10^{-13}$ pour les scénarios 1, 2, 3 et 4.

Dans le cas de la tremblante (classique ou atypique), pour

- une prévalence nationale de $1 \cdot 10^{-4}$;
- une prévalence intratroupeau variant de 1 animal à 5% des animaux ;
- une taille de cheptels de 50 ou de 350 animaux ;
- et une DI dans la prise d'essai variant de 0,01 à 10 DI_{50} ;

la probabilité d'infecter au moins un animal sensible varie de $6,7 \cdot 10^{-19}$ à $4 \cdot 10^{-12}$ pour les scénarios 1, 2, 3 et 4.

Tableau 2 : Résumé des résultats obtenus pour les valeurs des probabilités d'infecter au moins un animal sensible avec l'utilisation d'un autovaccin.

EST	Scénario	DI dans la prise d'essai	Probabilité d'infecter au moins un animal sensible	
			Min.	Max.
ESB	S1	0,01	$1,08 \cdot 10^{-14}$	$1,12 \cdot 10^{-14}$
		0,1	$2,77 \cdot 10^{-14}$	$2,92 \cdot 10^{-14}$
		1	$5,66 \cdot 10^{-14}$	$5,94 \cdot 10^{-14}$
		10	$8,56 \cdot 10^{-14}$	$8,99 \cdot 10^{-14}$
	S2	0,01	$1,76 \cdot 10^{-16}$	$3,30 \cdot 10^{-15}$
		0,1	$5,41 \cdot 10^{-16}$	$1,01 \cdot 10^{-14}$
		1	$1,66 \cdot 10^{-15}$	$3,10 \cdot 10^{-14}$
		10	$5,08 \cdot 10^{-15}$	$9,51 \cdot 10^{-14}$
	S3	0,01	$2 \cdot 10^{-20}$	$3,74 \cdot 10^{-19}$
		0,1	$6,12 \cdot 10^{-20}$	$1,15 \cdot 10^{-18}$
		1	$1,88 \cdot 10^{-19}$	$3,52 \cdot 10^{-18}$
		10	$5,75 \cdot 10^{-19}$	$1,08 \cdot 10^{-17}$
	S4	0,01	$5,46 \cdot 10^{-14}$	$1,14 \cdot 10^{-13}$
		0,1	$1,00 \cdot 10^{-13}$	$1,20 \cdot 10^{-13}$
		1	$1,19 \cdot 10^{-13}$	$1,20 \cdot 10^{-13}$
		10	$1,20 \cdot 10^{-13}$	$1,20 \cdot 10^{-13}$
Tremblante	S1	0,01	$3,61 \cdot 10^{-13}$	$3,79 \cdot 10^{-13}$
		0,1	$9,24 \cdot 10^{-13}$	$9,72 \cdot 10^{-13}$
		1	$1,89 \cdot 10^{-12}$	$1,98 \cdot 10^{-12}$
		10	$2,85 \cdot 10^{-12}$	$3,00 \cdot 10^{-12}$
	S2	0,01	$5,88 \cdot 10^{-15}$	$1,10 \cdot 10^{-13}$
		0,1	$1,80 \cdot 10^{-14}$	$3,38 \cdot 10^{-13}$
		1	$5,52 \cdot 10^{-14}$	$1,03 \cdot 10^{-12}$
		10	$1,69 \cdot 10^{-13}$	$3,17 \cdot 10^{-12}$
	S3	0,01	$6,66 \cdot 10^{-19}$	$1,25 \cdot 10^{-17}$
		0,1	$2,04 \cdot 10^{-18}$	$3,82 \cdot 10^{-17}$
		1	$6,25 \cdot 10^{-18}$	$1,17 \cdot 10^{-16}$
		10	$1,92 \cdot 10^{-17}$	$3,59 \cdot 10^{-16}$
	S4	0,01	$1,82 \cdot 10^{-12}$	$3,80 \cdot 10^{-12}$
		0,1	$3,34 \cdot 10^{-12}$	$4 \cdot 10^{-12}$
		1	$3,98 \cdot 10^{-12}$	$4 \cdot 10^{-12}$
		10	$4 \cdot 10^{-12}$	$4 \cdot 10^{-12}$

S1 : Intégralité de la DI contenue dans la prise d'essai retrouvée dans une seule dose vaccinale – S2 : Dilution de l'intégralité de la DI contenue dans la prise d'essai tout au long du processus de fabrication et niveau de contamination identique pour toutes les doses vaccinales. S3 : Dilution de la DI contenue dans la prise d'essai limitée à la phase de culture en milieu liquide et niveau de contamination identique pour toutes les doses vaccinales. S4 : Intégralité de la DI de la prise d'essai répartie dans un nombre variable de doses vaccinales.

Ce tableau de synthèse permet de constater que la probabilité d'infecter au moins un animal sensible reste très faible, quels que soient les prévalences intercheptel et intracheptel, le niveau de

contamination des doses vaccinales et la taille du cheptel. Ainsi les probabilités les plus élevées sont normalement constatées avec le scénario n°4 (de l'ordre de 10^{-12}), considéré comme le plus défavorable. Dans les autres cas de figure explorés, la probabilité d'infecter au moins un animal sensible est de l'ordre de 10^{-14} à 10^{-20} . Il convient de rappeler en outre qu'à l'exception du scénario 2, la probabilité qu'au moins une dose vaccinale soit contaminée est estimée à $4 \cdot 10^{-8}$. Lorsque le scénario prévoit la contamination systématique de toutes les doses vaccinales (scénario 2), la probabilité d'infecter au moins un animal sensible est de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-16} .

Les DI contenues dans la prise d'essai qui ont été utilisées dans les différents scénarios sont inférieures ou égales à 10, ce qui correspond à une DI maximale, dans le tissu prélevé, de 10^4 DI₅₀ IC par g ou mL. Dans certains tissus, selon l'espèce animale, l'âge et la souche de prion en cause, la DI peut atteindre des valeurs extrêmement élevées (i.e. jusqu'à $10^{9,5}$ pour du SNC dans les cas de tremblante atypique). Des simulations avec des valeurs de ce niveau n'ont pas été réalisées car ces situations extrêmes ne seront pas rencontrées. Etant donné les nombreuses incertitudes (voir Tableau 3 page 56) les experts recommandent d'éviter l'emploi des tissus suivants, à très forte charge infectieuse, comme prélèvement pour l'isolement de l'agent bactérien responsable :

- SNC pour tous les ruminants (sauf pour les bovins de moins de 12 mois et les petits ruminants de moins de 3 mois)
- Les tissus lymphoïdes (NL, rate, etc.), le pus isolé d'abcès localisés sur un NL, les écouillons lacrymaux (risque de frottement de la 3^{ème} paupière) et le placenta chez les petits ruminants.

En conclusion, et malgré toutes les incertitudes évoquées ci-dessus, les experts estiment que la probabilité de transmission du prion par les autovaccins varie de nulle à quasi nulle (0 à 1 sur l'échelle de 0 à 9 (Afssa 2008b), cf. Tableau 13, Annexe 7) si les animaux sont exposés à des autovaccins préparés à partir de tissus qui conduisent à la présence d'une dose infectieuse inférieure ou égale à 10 DI₅₀ dans la prise d'essai (soit une dose inférieure ou égale à 10^4 DI₅₀ IC par g ou mL dans le prélèvement initial). Il n'existe pas de données consensuelles sur la dynamique de contamination dans les conditions naturelles, en particulier dans les cheptels atteints de tremblante classique. Il est donc difficile de comparer cette probabilité de transmission de l'infection par un autovaccin, avec la progression naturelle de la maladie dans l'élevage. Toutefois, compte tenu des valeurs de probabilité d'infection d'au moins un animal sensible, obtenues dans les différents scénarios, le sur-risque représenté par l'usage d'un autovaccin dans de tels cheptels peut être considéré comme négligeable. Les souches de tremblante et d'ESB atypiques quant à elles, semblent avoir une transmissibilité en conditions d'élevage extrêmement limitée, voire nulle (elle reste toutefois possible en conditions expérimentales). L'emploi d'un autovaccin contaminé par du prion pourrait constituer un facteur potentiellement favorisant de la transmission de ce type de souches à l'intérieur de l'élevage, sans toutefois majorer de manière significative le sur-risque par rapport aux souches classiques, compte tenu des valeurs de probabilité de survenue.

4.4.6. Incertitudes

Les incertitudes liées à l'évaluation des risques lors de l'utilisation d'autovaccins chez les ruminants, sont principalement associées aux limites des connaissances scientifiques sur le comportement des prions lors de la préparation des autovaccins mais aussi à la surveillance de ces maladies, à la disponibilité des données, et également aux hypothèses sous-jacentes de la méthodologie suivie pour l'estimation de la réduction du titre infectieux de la prise initiale. En outre, il n'a pas été pris en compte dans le raisonnement, les conséquences de la vente d'animaux contaminés par l'intermédiaire de l'administration d'autovaccins. De même, les experts n'ont pas évalué des questions de gestion comme le respect des règles d'emploi de l'autovaccin sur le terrain (non usage dans un autre cheptel, administration à des ruminants différents de l'espèce cible). Pour certaines étapes, les informations disponibles étant limitées, il a été fait appel à l'opinion des experts du GT et par conséquent, l'interprétation des résultats doit se faire avec la prudence nécessaire.

Les experts ont tenu à lister quelques incertitudes importantes dans le Tableau 3 ci-dessous en suivant la logique du raisonnement d'appréciation du risque :

Tableau 3 : Sources et types d'incertitudes

Étapes du raisonnement	Incertitudes importantes identifiées par les experts
Probabilité d'intervenir dans un cheptel infecté et de prélever un individu infecté.	<ul style="list-style-type: none"> • La prévalence des EST chez les bovins, ovins et caprins en France est extrêmement faible, mais le nombre de tests réalisés pour la surveillance des EST a diminué. Les systèmes de surveillance n'ont plus la capacité de détecter des variations de prévalence modérée. • La sensibilité réelle des tests de dépistage vis-à-vis des animaux en incubation d'une EST, en particulier vis-à-vis des souches atypiques.
Probabilité de prélever, en vue de l'isolement bactérien, un tissu contenant du prion.	<ul style="list-style-type: none"> • Il n'est pas possible de connaître aujourd'hui les maladies pour lesquelles les vétérinaires de terrain sont susceptibles de demander la préparation d'autovaccins. Les experts du GT se sont basés, pour lister les différentes matrices qui pourraient être prélevées, sur leur expérience de terrain et sur les auditions des laboratoires et des GTV. • Les volumes ou les masses de la prise d'essai pour l'ensemencement ou les repiquages peuvent être variables en fonction des opérateurs. • Le manque de données sur les limites de détection des tests si ils sont utilisés sur des tissus autres que le SNC ou les ganglions. • Le manque de données consolidées sur les titres infectieux des organes, pour les souches atypiques.

Etapas du raisonnement	Incertitudes importantes identifiées par les experts
Probabilité de conserver du prion tout au long des différentes étapes de préparation de l'autovaccin (de l'isolement bactérien en passant par la production de la suspension bactérienne (biomasse)).	<ul style="list-style-type: none"> • Comportement des prions lors de la préparation : au niveau du prélèvement (distribution des prions dans les tissus), avec la bactérie (adsorption sur la bactérie), dans les milieux de culture (agrégation, taille et nombre d'agrégats ...), etc. • Estimation très difficile de l'effet « dilution » en milieu solide ou liquide lors des différentes étapes qui peut permettre de diminuer la quantité de prion par rapport à la prise d'essai.
Probabilité de provoquer une intercontamination entre lots de vaccins par l'intermédiaire du matériel utilisé pour la préparation.	<ul style="list-style-type: none"> • Comportement du prion dans les fermenteurs avec là aussi une incertitude sur le devenir des agrégats éventuellement présents (fixation sur les parois du fermenteur, modalités de décontamination des fermenteurs utilisés par les préparateurs, etc.).
Probabilité d'administrer une dose vaccinale suffisamment contaminée pour provoquer une infection.	<ul style="list-style-type: none"> • Manque de données sur la relation dose/réponse pour les faibles doses ($< 0,1 DI_{50}$) administrées en injection parentérale. • Développements possibles de nouvelles voies d'administration des autovaccins (voies locales) avec impact inconnu sur la réduction du risque versus voies parentérales.

4.5. Recommandations

Les conclusions des paragraphes précédents plaident en faveur d'une variabilité de la probabilité de transmission du prion *via* l'emploi d'autovaccin en fonction des matrices qui seraient utilisées et des animaux prélevés.

D'une manière générale, les experts considèrent que cette probabilité est nulle à quasi nulle (0 à 1 sur l'échelle de 0 à 9 des qualificatifs pour l'estimation qualitative du risque développée dans le rapport (Afssa 2008b), voir Annexe 7) :

- si le niveau d'infectiosité du tissu ou du fluide ayant servi à l'isolement bactérien est inférieur à $10^4 DI_{50} IC$ par g ou par mL (ce qui aboutit au final à une infectiosité résiduelle dans la préparation vaccinale (biomasse) inférieure à $10 DI_{50}$) ;
- et si les modalités de préparation de l'autovaccin correspondent à celles qui ont été prises en considération dans la démarche d'évaluation du risque.

Les experts formulent donc un certain nombre de recommandations à suivre pour chacune des étapes qui conduisent à la préparation de l'autovaccin. Ces recommandations concernent les préleveurs (vétérinaires de terrain, techniciens de laboratoire), le laboratoire d'analyse en charge de l'isolement et de l'identification du germe responsable, le laboratoire préparant l'autovaccin et enfin l'utilisateur final de la préparation vaccinale.

4.5.1. Recommandations concernant le prélèvement

Sur l'animal vivant, dépourvu de signes cliniques évocateurs d'une EST, le niveau d'infectiosité de la très grande majorité des tissus utilisables pour l'isolement bactérien apparaît suffisamment faible ($\leq 10^2 DI_{50} IC$) pour que le risque de transmission du prion soit considéré comme nul à quasi

nul (0 à 1 sur l'échelle de 0 à 9 (Afssa 2008b)) exception faite du placenta chez les petits ruminants. Par précaution, en raison de l'absence de données précises, cette exception peut être étendue aux nœuds lymphatiques, au pus provenant d'un abcès localisé sur un nœud lymphatique ainsi qu'à l'écouvillon lacrymal (du fait du risque de frottement de la 3^{ème} paupière).

S'il est envisagé de fabriquer un autovaccin à partir d'un isolat bactérien effectué dans le cas d'un avortement d'ovin ou de caprin (i.e. cas d'un avortement salmonellique), il peut être alors recommandé :

- de procéder à un examen clinique de l'animal prélevé afin de déceler d'éventuelles manifestations de tremblante ;
- de privilégier l'écouvillon vaginal ou le prélèvement de tissus foetaux (contenu stomacal, foie ou rate) plutôt que le placenta pour effectuer l'isolement de la bactérie responsable ;
- de se renseigner sur la disponibilité éventuelle du génotype de l'animal susceptible d'être prélevé, et sinon de le faire réaliser¹⁹.

Dans le cas d'un prélèvement de pus, il est souhaitable de ne pas le réaliser sur un abcès localisé sur un nœud lymphatique. Si la préparation d'un autovaccin est envisagée dans un cas de conjonctivite ou kératoconjonctivite, il est recommandé de procéder à un écouvillonnage en évitant de frotter la face interne de la 3^{ème} paupière.

La réalisation d'un test de dépistage des EST sur les tissus prélevés pourrait être envisagée et permettrait *a priori* de s'assurer d'un niveau d'infectiosité $\leq 10^2$ DI₅₀ IC pour l'ESB, $10^{3,7}$ DI₅₀ IC pour la tremblante classique si le résultat du test est négatif (seuil de détectabilité des méthodes biochimiques utilisées actuellement). Les tests disponibles en France ne sont cependant pas tous validés voire applicables pour la plupart de ces matrices. Quant au test sur biopsie amygdalienne effectué sur petits ruminants, il nécessite d'une part l'anesthésie de l'animal et d'autre part un matériel de prélèvement spécifique, ce qui rend son application illusoire sur le terrain.

Dans la majorité des cas, la recherche de l'agent causal se fera à partir d'animaux malades. L'existence d'un phénomène inflammatoire tissulaire peut être à l'origine d'une augmentation du niveau d'infectiosité (i.e. le lait lors de mammite, les matières fécales lors d'entérite). Toutefois, cette augmentation reste limitée et ne modifie pas les estimations faites précédemment (augmentation du niveau d'infectiosité < 10).

Dans un certain nombre de cas (affections respiratoires, nerveuses, septicémies), le prélèvement sera effectué **sur un animal mort** et peut alors être constitué d'un fragment d'organe : poumon, système nerveux, rate, nœuds lymphatiques, foie, par exemple. Parmi tous ces prélèvements potentiels, le système nerveux central est celui qui peut présenter les niveaux d'infectiosité « prion » les plus élevés, il est donc à éviter chez les bovins de plus de 12 mois et les petits ruminants de plus de 3 mois. Chez les petits ruminants, il est également recommandé de ne pas retenir les tissus lymphoïdes (NL, rate, etc.) et le placenta ceci, même en cas de réalisation d'un test de dépistage d'EST. En effet, ces tests présentent des limites de détection variables, notamment selon le type de souche de prion (i.e. tremblante atypique versus classique) et selon la

¹⁹ La réalisation d'un génotypage tremblante est effectuée sur une simple prise de sang sur anticoagulant par un certain nombre de laboratoires d'analyses de terrain. Le résultat est obtenu en 48 à 72h ce qui est tout à fait compatible avec le délai classique de réalisation d'un isolement et d'une identification bactérienne. La réalisation du génotypage caprin n'est en revanche pas disponible à l'heure actuelle en routine.

nature des organes analysés (cf. Figure 6 page 47). L'obtention d'un résultat négatif avec les tests employés en routine ne peut en conséquence apporter qu'une garantie relative. La réalisation de ces tests induirait en outre un surcoût non négligeable dans un contexte déjà financièrement défavorable pour l'élevage (impacts économiques de la maladie et coût de la fabrication de l'autovaccin), notamment chez les petits ruminants (nécessité de procéder à un examen sur obex et sur NL pour une détection optimale des animaux infectés).

En résumé, le placenta, les tissus lymphoïdes (NL, rate, etc.), le pus isolé d'un abcès localisé sur un NL, les écouvillons lacrymaux sont des prélèvements à éviter sur les petits ruminants, de même que le SNC chez tous les ruminants sauf s'il est prélevé sur un jeune animal (< 12 mois chez un bovin, < 3 mois chez un petit ruminant).

4.5.2. Recommandations concernant la préparation de l'autovaccin

Par définition, la première étape de préparation de l'autovaccin consiste à isoler et à identifier le germe responsable de l'affection. La deuxième étape consiste en une multiplication de la bactérie qui est effectuée dans des boîtes de Roux (milieux solides) ou dans des fermenteurs (milieux liquides) avec des milieux adaptés aux exigences nutritives de la bactérie. Les milieux solides ou liquides employés par les préparateurs d'autovaccins doivent contenir des matières premières répondant aux exigences de la Pharmacopée européenne²⁰ (§ 5.2.8 « Réduction du risque de transmission des agents des encéphalopathies spongiformes animales par les médicaments à usage humain et vétérinaire »). Il s'agit d'une obligation réglementaire pour les préparateurs d'autovaccins ;

4.5.2.1. Recommandations

Plusieurs précautions peuvent être prises afin d'augmenter la probabilité d'obtention d'une biomasse non contaminée :

- la réalisation, au laboratoire préparant l'autovaccin et avant ensemencement de la biomasse, de plusieurs repiquages (au moins 3), en s'assurant à chaque repiquage d'une prise d'essai minimale. Cette précaution permet d'augmenter la probabilité de ne pas effectuer l'ensemencement du fermenteur avec des bactéries ou/et du milieu de culture susceptibles d'être contaminés avec du prion (cf. scénarios développés en Annexe 5).
- l'emploi de milieux solides ou liquides certifiés, fabriqués à l'aide des matières premières répondant aux exigences de la Pharmacopée européenne pour les préparateurs d'autovaccins conformément à la réglementation;
- privilégier l'usage sur le plan matériel, compte tenu de l'exceptionnelle résistance du prion à la majorité des agents physiques ou chimiques utilisés classiquement en désinfection et décontamination, de contenants à usage unique à tous les stades de la préparation, ceci afin d'éviter toute contamination croisée entre deux productions d'autovaccins.

Aucune des méthodes d'inactivation traditionnellement utilisées par les préparateurs d'autovaccin (chaleur et/ou formol) n'a d'impact significatif sur le niveau d'infectiosité, de même que la nature des adjuvants employés. Il n'y a donc pas lieu de formuler de recommandation sur ces deux étapes.

²⁰ http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003700.pdf

4.5.2.2. Cas des autovaccins fabriqués hors du territoire français

La directive 2001/82/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 institue un code communautaire relatif aux médicaments vétérinaires. Le second alinéa de l'article 3 de cette directive exclut l'autovaccin de son champ d'application : en effet, en raison même de sa définition, l'autovaccin répond uniquement à un besoin local. De ce fait, il n'existe pas de législation communautaire régissant la préparation et l'utilisation des autovaccins à ce jour. Ce sont donc les législations nationales qui s'appliquent, lorsqu'elles existent.

En France, la délivrance d'autorisation de préparation d'autovaccins est notamment subordonnée au respect des BPP, décrites dans le chapitre 2.3 - « Moyens de maîtrise de la préparation des autovaccins » du rapport d'expertise collective de l'Anses d'octobre 2013 - « Autovaccins à usage vétérinaire » (Anses 2013a). De ce fait, l'importation d'autovaccins d'un pays de l'Union Européenne ou d'un pays tiers n'est possible que si le préparateur d'autovaccins présente des critères de qualité au moins équivalents à ceux des BPP, conformément à l'arrêté du 6 mars 2008 relatif aux BPP des autovaccins à usage vétérinaire.

Il convient par ailleurs de préciser que la préparation d'un autovaccin en-dehors de la France ne déroge pas pour autant à la définition de l'autovaccin : il est lui aussi fabriqué à partir d'organismes pathogènes issus d'un élevage (français, en l'occurrence) et utilisés dans ce même élevage. En pratique, cela signifie donc que les préparateurs d'autovaccins situés hors France respectent soit les BPP telles que prévues par l'arrêté du 6 mars 2008, soit les BPF telles que prévues par la décision n° 2015-03-076 du 11 mars 2015 (JORF n°0071 du 25 mars 2015).

En résumé pour la partie préparation de l'autovaccin destiné à des ruminants, les recommandations qui viennent s'ajouter aux obligations réglementaires relatives aux milieux de culture et aux adjuvants sont les suivantes :

- la réalisation d'au moins trois repiquages en milieu solide chez le préparateur de l'autovaccin avant ensemencement du fermenteur;
- privilégier l'emploi de matériel de culture à usage unique.

4.5.3. Recommandations concernant les modalités de vaccination

➤ Espèces cibles

Par définition, **l'autovaccin ne doit être employé que sur l'espèce sur laquelle l'agent pathogène a été isolé et exclusivement dans le cheptel où cet agent pathogène a été mis en évidence.** En cas d'infection commune à deux espèces de ruminants présentes dans la même exploitation, le principe de la cascade²¹ ne doit pas être appliqué. La réglementation interdit cette pratique ce qui limite les risques éventuels de transmission interspécifique de souches de prions et qui n'est en outre pas pertinente sur le plan scientifique, aussi bien pour les autovaccins que pour

²¹ Lorsqu'aucun médicament autorisé et approprié n'est disponible, le principe de la cascade autorise le vétérinaire à employer un médicament vétérinaire autorisé pour des animaux d'une autre espèce dans la même indication thérapeutique.

les vaccins commerciaux. En effet, les souches bactériennes présentent souvent des profils antigéniques et/ou des facteurs de virulence différents, selon l'espèce de ruminant infectée.

Enfin, il convient de rappeler que l'isolement régulier de l'agent pathogène responsable des cas constatés dans l'exploitation reste toujours la meilleure garantie de l'adéquation avec la souche bactérienne présente dans l'autovaccin, notamment en termes de facteurs de pathogénicité (par exemple les facteurs d'attachement de colibacilles).

➤ Voies d'administration

Les auto-vaccins sont administrés par voie parentérale (sous-cutanée ou intra-musculaire), ce qui constitue un facteur supplémentaire de sécurisation vis-à-vis du risque (réduction d'un facteur 10 du risque de transmission du prion par rapport à la voie intracérébrale). L'administration par contact avec des muqueuses n'est que très peu utilisée en vaccinologie chez les ruminants et concerne à ce jour essentiellement des vaccins vivants. Des travaux sont en cours afin de pouvoir utiliser ces voies locales pour des vaccins inactivés et celles-ci pourraient donc être mises en œuvre prochainement également pour les autovaccins. L'apparition de ces nouvelles modalités d'administration nécessitera une réévaluation du risque de transmission du prion, prenant en compte l'efficacité relative des différentes voies d'infection.

Au final, les recommandations les plus importantes sont les suivantes :

- étant donné les incertitudes évoquées au paragraphe 4.4.6, éviter l'emploi des tissus suivants pour l'isolement de l'agent bactérien responsable :
 - le SNC pour tous les ruminants (sauf les bovins de moins de 12 mois et les petits ruminants de moins de 3 mois) ;
 - les tissus lymphoïdes (NL, rate, etc.), le pus isolé d'abcès localisés sur un NL, l'écouvillon lacrymal réalisé avec frottement de la face interne de la 3^{ème} paupière et le placenta chez les petits ruminants.
- effectuer chez le préparateur au moins trois repiquages en milieu solide avant ensemencement de milieux de fabrication de la biomasse, en minimisant autant que faire se peut la prise d'essai à chaque opération;
- privilégier des matériels à usage unique sur toute la chaîne de préparation des autovaccins ;
- rappeler sur l'étiquetage des doses vaccinales l'espèce cible de ruminants ainsi que l'exploitation (n° de cheptel par exemple) concernée par l'emploi exclusif de cet autovaccin.

4.6. Conclusion

Le bilan des connaissances dressé par les experts confirme :

- l'intérêt de pouvoir à nouveau fabriquer des autovaccins pour un certain nombre de maladies bactériennes des ruminants, afin de répondre à des besoins liés à la paupérisation de l'arsenal thérapeutique, notamment en matière de vaccins pour les petits ruminants ainsi qu'aux recommandations du plan Ecoantibio 2017;

- la très grande diversité des matrices susceptibles d'être utilisées pour l'isolement bactérien, associée à une grande variabilité de l'infectiosité de ces matrices en fonction de l'espèce de ruminant et de la nature de la souche de prion ;
- une évolution favorable de la situation épidémiologique de la France vis-à-vis des EST (prévalence estimée à $1 \cdot 10^{-4}$ chez les petits ruminants et $1 \cdot 10^{-6}$ chez les bovins) tout en soulignant que les EST persistent sur notre territoire sous forme sporadique.

Ce bilan fait apparaître toutefois l'absence de données notamment sur l'affinité du prion vis-à-vis des bactéries et sur les limites de détection des tests sur certains tissus. Il met également en évidence la difficulté de quantifier le facteur de réduction de l'infectiosité au cours de la préparation de l'autovaccin du fait, en particulier, d'un prion se présentant sous la forme d'agrégats, de taille variable, de répartition hétérogène dans les tissus et de stabilité inconnue sous l'effet des différentes opérations de repiquage ou de culture en milieu liquide.

Compte tenu de ces différents éléments, les experts ont estimé la probabilité de transmission du prion suite à l'utilisation d'un autovaccin chez les ruminants. Au terme de cette démarche, en lien avec les très faibles valeurs obtenues en combinant les probabilités des événements successifs aboutissant à cette transmission, et en évitant comme prélèvements employés pour l'isolement bactérien, le SNC pour tous les ruminants (sauf les bovins de moins de 12 mois et les petits ruminants de moins de 3 mois), les tissus lymphoïdes (NL, rate, etc.), le pus isolé d'abcès localisés sur un NL, l'écouvillon lacrymal réalisé avec frottement de la face interne de la 3^{ème} paupière et le placenta chez les petits ruminants, cette probabilité est estimée nulle à quasi nulle (0 à 1 sur une échelle de 0 à 9 (Afssa 2008b)).

BIBLIOGRAPHIE

- Acutis, P. L., A. Bossers, J. Priem, M. V. Riina, S. Peletto, M. Mazza, C. Casalone, G. Forloni, G. Ru, et M. Caramelli. 2006. "Identification of prion protein gene polymorphisms in goats from Italian scrapie outbreaks." *Journal of general virology* 87 (4):1029-1033.
- Acutis, P. L., F. Martucci, A. D'Angelo, S. Peletto, S. Colussi, C. Maurella, C. Porcario, B. Iulini, M. Mazza, et L. Dell'Atti. 2012. "Resistance to classical scrapie in experimentally challenged goats carrying mutation K222 of the prion protein gene." *Vet Res* 43 (8).
- Afssa. 2004. Rapport sur la disponibilité du médicament vétérinaire en France. Maisons-Alfort, France.
- Afssa. 2007a. Avis relatif à l'évaluation de la sensibilité diagnostique des tests rapides réalisés chez les petits ruminants sur un échantillon d'obex (saisine 2007-SA-371). Maisons-Alfort, France.
- Afssa. 2007b. Avis relatif à l'évaluation de la sensibilité diagnostique des tests rapides réalisés chez les petits ruminants sur un échantillon d'obex . Maisons-Alfort, France.
- Afssa. 2007c. Avis relatif à l'évaluation de l'efficacité des mesures prises en novembre 2000 pour contrôler l'épizootie d'ESB (2006-SA-0329). Maisons-Alfort, France.
- Afssa. 2008a. Avis relatif aux possibles conséquences, en termes de santé animale et de santé publique, des nouvelles données scientifiques disponibles concernant la transmission intraspécifique de l'agent de la tremblante classique par le lait (n°2008-SA-115). Maisons-Alfort, France.
- Afssa. 2008b. Une méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale. Maisons-Alfort, France.
- Afssa. 2009. Avis relatif aux conséquences de deux nouvelles études scientifiques sur les mesures de police sanitaire en cas de tremblante atypique (Saisine n°2009-SA-0032). Maisons-Alfort, France.
- Aguilar-Calvo, P., J. C. Espinosa, B. Pintado, A. Gutierrez-Adan, E. Alamillo, A. Miranda, I. Prieto, A. Bossers, O. Andreoletti, et J. M. Torres. 2014. "Role of the goat K222-PrP(C) polymorphic variant in prion infection resistance." *J Virol* 88 (5):2670-6.
- Andreoletti, O, C Lacroux, A Chabert, L Monnereau, G Tabouret, F Lantier, P Berthon, F Eychenne, S Lafond-Benestad, et J-M Elsen. 2002. "PrPSc accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission." *Journal of General Virology* 83 (10):2607-2616.
- Andreoletti, O, S Simon, C Lacroux, N Morel, G Tabouret, A Chabert, S Lugan, F Corbiere, P Ferre, et G Foucras. 2004. "PrPSc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie." *Nature medicine* 10 (6):591-593.
- Andreoletti, O., L. Orge, S. L. Benestad, V. Beringue, C. Litaïse, S. Simon, A. Le Dur, H. Laude, H. Simmons, S. Lugan, F. Corbière, P. Costes, N. Morel, F. Schelcher, et C. Lacroux. 2011. "Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues." *PLoS Pathogens* 7 (2).

- Anses. 2011. Avis relatif aux évolutions de la réglementation communautaire proposées par la feuille de route n°2 pour les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) : aspects concernant la police sanitaire bovine (Saisine n°2010-SA-0208). Maisons-Alfort, France.
- Anses. 2012. Pharmacovigilance Vétérinaire - Le système français de pharmacovigilance et les principaux événements 2011 en matière d'effets indésirables Maisons-Alfort, France.
- Anses. 2013a. Autovaccins à usage vétérinaire. Maisons-Alfort, France.
- Anses. 2013b. Avis concernant l'allègement du dispositif de surveillance de l'ESB à l'abattoir (Saisine n°2013-SA-0008). Maisons-Alfort, France.
- Anses. 2013c. Avis relatif à l'évaluation des risques liés aux graisses bovines collectées après fente de la carcasse pour une utilisation en alimentation des espèces de rente (Saisine n°2012-SA-0144). Maisons-Alfort, France.
- Anses. 2013d. Pharmacovigilance Vétérinaire - Le système français de pharmacovigilance et les principaux événements 2012 en matière d'effets indésirables. Maisons-Alfort, France.
- Anses. 2014. Evolution du dispositif de surveillance des EST des petits ruminants. Maisons-Alfort, France.
- Anses. 2015. Avis relatif à la valorisation des tissus adipeux récoltés sur les carcasses de ruminants en alimentation animale (Saisine n° 2015-SA-0158). Maisons-Alfort, France.
- Arsac, J.-N., O. Andreoletti, J.-M. Bilheude, C. Lacroux, S. L. Benestad, et T. Baron. 2007. "Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway." *Emerging infectious diseases* 13 (1):58.
- Balkema-Buschmann, A., M. Eiden, C. Hoffmann, M. Kaatz, U. Ziegler, M. Keller, et M. H. Groschup. 2011a. "BSE infectivity in the absence of detectable PrP(Sc) accumulation in the tongue and nasal mucosa of terminally diseased cattle." *J Gen Virol* 92 (Pt 2):467-76.
- Balkema-Buschmann, A., M. Eiden, C. Hoffmann, M. Kaatz, U. Ziegler, M. Keller, et M. H. Groschup. 2011b. "BSE infectivity in the absence of detectable PrPSc accumulation in the tongue and nasal mucosa of terminally diseased cattle." *Journal of General Virology* 92 (2):467-476. doi: 10.1099/vir.0.025387-0.
- Barillet, F., D. Mariat, Y. Amigues, R. Faugeras, H. Caillat, K. Moazami-Goudarzi, R. Rupp, J. M. Babillot, C. Lacroux, et S. Lugan. 2009. "Identification of seven haplotypes of the caprine PrP gene at codons 127, 142, 154, 211, 222 and 240 in French Alpine and Saanen breeds and their association with classical scrapie." *Journal of general virology* 90 (3):769-776.
- Beal, R. K., P. Wigley, C. Powers, P. A. Barrow, et A. L. Smith. 2006. "Cross-reactive cellular and humoral immune responses to *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis are associated with protection to heterologous re-challenge." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114 (1-2):84-93.
- Bellworthy, S. J., S. A. C. Hawkins, R. B. Green, I. Blamire, G. Dexter, I. Dexter, R. Lockey, M. Jeffrey, S. Ryder, C. Berthelin-Baker, et M. M. Simmons. 2005. "Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to the onset of clinical disease after oral challenge." *Veterinary Record* 156 (7):197-202.

- Bertolini, S., C. Maurella, C. Bona, F. Ingravalle, R. Desiato, E. Baioni, L. Chiavacci, M. Caramelli, et G. Ru. 2012. "A relevant long-term impact of the circulation of a potentially contaminated vaccine on the distribution of scrapie in Italy. Results from a retrospective cohort study." *Veterinary Research* 43 (1).
- Bessen, R. A., S. Martinka, J. Kelly, et D. Gonzalez. 2009. "Role of the lymphoreticular system in prion neuroinvasion from the oral and nasal mucosa." *Journal of Virology* 83 (13):6435-6445.
- Bradley, R. 1996. *Experimental transmission of bovine spongiform encephalopathy*. Edited by Elsevier, *Transmissible subacute spongiform encephalopathies: Prion diseases*. Paris, France: Court L, Dodet B.
- Brown, P., P. P. Liberski, A. Wolff, et D. C. Gajdusek. 1990. "Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360°C: Practical and theoretical implications." *Journal of Infectious Diseases* 161 (3):467-472.
- Brown, P., R. G. Rohwer, E. M. Green, et D. C. Gajdusek. 1982. "Effect of chemicals, heat, and histopathologic processing on high-infectivity hamster-adapted scrapie virus." *Journal of Infectious Diseases* 145 (5):683-687.
- Buonavoglia, D., G. Greco, V. Quaranta, M. Corrente, V. Martella, et N. Decaro. 2008. "An oil-emulsion vaccine induces full-protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep." *New Microbiologica* 31 (1):117-123.
- Buschmann, A., et M. H. Groschup. 2005. "Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle." *Journal of Infectious Diseases* 192 (5):934-42.
- Capucchio, M. T., F. Guarda, M. C. Isaia, S. Caracappa, et V. Di Marco. 1998. "Natural occurrence of scrapie in goats in Italy. Vet Rec 143, 452–453." *Veterinary Record* 143:452-453.
- Casalone, C., G. Zanusso, P. Acutis, S. Ferrari, L. Capucci, F. Tagliavini, S. Monaco, et M. Caramelli. 2004. "Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (9):3065-70.
- Castilla, J., A. Gutierrez Adan, A. Brun, B. Pintado, M. A. Ramirez, B. Parra, D. Doyle, M. Rogers, F. J. Salguero, C. Sanchez, J. M. Sanchez-Vizcaino, et J. M. Torres. 2003. "Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice." *Archives of Virology* 148 (4):677-91.
- Cazeau, G., M. A. Botrel, C. Sala, M. Chazel, N. Jarrige, et D. Calavas. 2009a. "Contexte des prescriptions antibiotiques en filière bovine. Résultats de l'enquête Afssa-SNGTV." *Bull Group Tech Vet* 49:55-59.
- Cazeau, G., M. A. Botrel, C. Sala, M. Chazel, N. Jarrige, et D. Calavas. 2009b. "Motivations des prescriptions antibiotiques et adéquation usage-recommandations en filière bovine: Résultats de l'enquête Afssa-SNGTV." *Bull Group Tech Vet* 49:61-65.

- Cazeau, G., J. B. Perrin, V. Loywyck, B. Bouffartigue, et D. Calavas. 2015. "Surveillance des encéphalopathies spongiformes des petits ruminants en 2014 : aucun foyer de tremblante classique détecté." *Bulletin épidémiologique ANSES/DGAI 71* (Spécial MRE, Bilan 2014).
- Chandler, R. L. 1971. "Intramammary inoculation of mice with scrapie." *Br Vet J* 127 (2):i-ii.
- Cloucard, C., P. Beaudry, J. M. Elsen, D. Milan, M. Dussaucy, C. Bounneau, F. Schelcher, J. Chatelain, J. M. Launay, et J. L. Laplanche. 1995. "Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie." *Journal of General Virology* 76 (8):2097-2101.
- Colussi, S., G. Vaccari, C. Maurella, C. Bona, R. Lorenzetti, P. Troiano, F. Casalnuovo, A. Di Sarno, M. G. Maniaci, et F. Zuccon. 2008. "Histidine at codon 154 of the prion protein gene is a risk factor for Nor98 scrapie in goats." *Journal of general virology* 89 (12):3173-3176.
- Corbière, F., C. Chauvineau-Perrin, C. Lacroux, P. Costes, M. Thomas, I. Bremaud, S. Martin, S. Lugan, C. Chartier, F. Schelcher, F. Barillet, et O. Andreoletti. 2013. "PrP-associated resistance to scrapie in five highly infected goat herds." *J Gen Virol* 94:241-215.
- Corbière, F., C. Chauvineau-Perrin, C. Lacroux, S. Lugan, P. Costes, M. Thomas, I. Brémaud, C. Chartier, F. Barillet, F. Schelcher, et O. Andréoletti. 2013. "The Limits of Test-Based Scrapie Eradication Programs in Goats." *PLoS ONE* 8 (1).
- Couquet, C., M. J. Cornuejols, A. Fremont, S. Allix, K. H. El Hachimi, K. T. Adjou, M. O. Ouidja, H. Brugère, et J. Brugère-Picoux. 2005. "Observation d'un cas de transmission maternelle de la tremblante chez le mouton." *Bull. Acad. Vét. France* 158 (1):25-32.
- Cuillé, J., et P. L. Chelle. 1936. "La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?" *C. R. Acad. Sci. Paris* 203:1552-1554.
- Cuillé, J., et P. L. Chelle. 1938. "La tremblante du mouton est bien inoculable." *C. R. Acad. Sci. Paris* 206:78-79.
- Dehaumont, P., et G. Moulin. 2005. "Evolution du marché des médicaments vétérinaires et de leur encadrement réglementaire: conséquence sur leur disponibilité." *Bull. Acad. Vét. France* 158 (2).
- Direction générale de l'alimentation. 2014. Instruction technique DGAL/SDSSA/2014-1002; 11/12/2014. edited by de l'agroalimentaire et de la forêt Ministère de l'agriculture. Paris, France.
- Douet, J. Y., C. Lacroux, F. Corbière, C. Litaize, H. Simmons, S. Lugan, P. Costes, H. Cassard, J. L. Weisbecker, F. Schelcher, et O. Andreoletti. 2014. "PrP expression level and sensitivity to prion infection." *Journal of Virology* 88 (10):5870-5872.
- EFSA. 2005. "Scientific report of the European Food Safety Authority on the evaluation rapid post mortem TSE tests intended for small ruminants." (31):1-17.
- EFSA. 2010. "Panel on Biological Hazards (BIOHAZ): Scientific Opinion on BSE/TSE infectivity in small ruminant tissues." *EFSA Journal* 8(12):1875.

- EFSA. 2012a. "Scientific and technical assistance on the minimum sample size to test should an annual BSE statistical testing regime be authorised in healthy slaughtered cattle." *EFSA Journal* 10 (10):2913.
- EFSA. 2012b. "Scientific Opinion on the evaluation of new TSE rapid tests submitted in the framework of the Commission Call for expression of interest 2007/S204-2473391 " *EFSA Journal* 10(5):2660.
- EFSA. 2014a. "Panel on Biological Hazards (BIOHAZ): Scientific Opinion on BSE risk in bovine intestines and mesentery. ." *EFSA Journal* 12(2):3554.
- EFSA. 2014b. "Scientific report : Protocol for further laboratory investigations into the distribution of infectivity of atypical BSE." *EFSA Journal* 12(7):3798.
- EFSA Panel on Biological Hazard. 2014. "Scientific Opinion on the scrapie situation in the EU after 10 years of monitoring and control in sheep and goats." *EFSA Journal* 12(7):3781.
- Eloit, M., K Adjou, M. Couplier, J. J. Fontaine, R. Hamel, T. Lilin, S. Messiaen, O. Andreoletti, T. Baron, A. Bencsik, A. G. Biacabe, V. Beringue, H. Laude, A. Le Dur, J. L. Vilotte, E. Comoy, J. P. Deslys, J. Grassi, S. Simon, F. Lantier, et P. Sarradin. 2005. "BSE agent signature in a goat." *Veterinary Record* 156 (16):523-524.
- Elsen, J-M., Y. Amigues, F. Schelcher, V. Ducrocq, O. Andreoletti, F. Eychenne, J. V. Khang, J-P. Poivey, F. Lantier, et J-L. Laplanche. 1999. "Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov." *Archives of virology* 144 (3):431-445.
- European Commission Health and Consumer Protection, Directorate-General. 2013. Report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in the EU in 2012. Brussels, Belgique.
- European Commission Health and Consumer Protection, Directorate-General. 2015. Report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in the EU in 2013. Brussels, Belgique.
- Fediaevsky, A., P. Gasqui, D. Calavas, et C. Ducrot. 2010. "Discrepant epidemiological patterns between classical and atypical scrapie in sheep flocks under French TSE control measures." *The Veterinary Journal* 185 (3):338-340.
- Field, E. J. 1967. "Invasion of the mouse nervous system by scrapie agent." *Br J Exp Pathol* 48 (6):662-4.
- Fraser, H., et J. D. Foster. 1993. *Transmission to mice, sheep and goats and bioassay of bovine tissues*. Edited by European commission Agriculture, *Transmissible spongiform encephalopathies*. Brussels: Bradley R, Marchant B.
- Funk, L., A. M. O'Connor, M. Maroney, T. Engelken, V. L. Cooper, J. Kinyon, et P. Plummer. 2009. "A randomized and blinded field trial to assess the efficacy of an autogenous vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivis (IBK) in beef calves." *Vaccine* 27 (34):4585-4590.

- Garza, M. C., M. Monzoñ, B. Marín, J. J. Badiola, et E. Monleoñ. 2014. "Distribution of peripheral PrP^{Sc} in sheep with naturally acquired scrapie." *PLoS ONE* 9 (5). doi: 10.1371/journal.pone.0097768.
- Ghani, A. C. 2002. "The epidemiology of variant Creutzfeldt-Jakob disease in Europe." *Microbes and Infection* 4 (3):385-393.
- Groschup, M-H., C. Lacroux, A. Buschmann, G. Lühken, J. Mathey, M. Eiden, S. Lugan, C. Hoffmann, J-C. Espinosa, et T. Baron. 2007. "Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France." *Emerging infectious diseases* 13 (8):1201.
- Guldimann, C., M. Gsponer, C. Drögemüller, A. Oevermann, et T. Seuberlich. 2012. "Atypical H-type bovine spongiform encephalopathy in a cow born after the reinforced feed ban on meat-and-bone meal in Europe." *Journal of Clinical Microbiology* 50 (12):4171-4174.
- Hawkins, S. , G. Wells, A. Austin, S. Ryder, M. Dawson, I. Blamire, et M. M. Simmons. 2000. "Comparative efficiencies of the bioassay of BSE infectivity in cattle and mice." Proceedings of the Cambridge Healthtech Institute's Second International Transmissible Spongiform Encephalopathy Conference (Alexandria, VA, USA).
- Haybaeck, J., M. Heikenwalder, B. Klevenz, P. Schwarz, I. Margalith, C. Bridel, K. Mertz, E. Zirdum, B. Petsch, T. J. Fuchs, L. Stitz, et A. Aguzzi. 2011. "Aerosols transmit prions to immunocompetent and immunodeficient mice." *PLoS Pathogens* 7 (1).
- Heikenwalder, M., N. Zeller, H. Seeger, M. Prinz, P-C. Klöhn, P. Schwarz, N-H. Ruddle, C. Weissmann, et A. Aguzzi. 2005. "Chronic lymphocytic inflammation specifies the organ tropism of prions." *Science* 307 (5712):1107-1110.
- Hoffmann, C., U. Ziegler, A. Buschmann, A. Weber, L. Kupfer, A. Oelschlegel, B. Hammerschmidt, et M. H. Groschup. 2007. "Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy." *Journal of General Virology* 88 (3):1048-1055. doi: 10.1099/vir.0.82186-0.
- Hoinville, L. J. 1996. "A review of the epidemiology of scrapie in sheep." *OIE Revue Scientifique et Technique* 15 (3):827-852.
- Hunter, N., J. D. Foster, W. Goldmann, M. J. Stear, J. Hope, et C. Bostock. 1996. "Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes." *Archives of virology* 141 (5):809-824.
- Hunter, N., F. Houston, J. Foster, W. Goldmann, D. Drummond, D. Parnham, I. Kennedy, A. Green, P. Stewart, et A. Chong. 2012. "Susceptibility of young sheep to oral infection with bovine spongiform encephalopathy decreases significantly after weaning." *Journal of Virology* 86 (21):11856-11862.
- Kimberlin, R. H. , et C. A. Walker. 1977. "Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster." *Journal of General Virology* 34 (2):295-304.
- Kimberlin, R. H., H. J. Field, et C. A. Walker. 1983. "Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system." *Journal of General Virology* 64 (3):713-716.

- Kimberlin, R. H., G. C. Millson, et G. D. Hunter. 1971. "An experimental examination of the scrapie agent in cell membrane mixtures: III. Studies of the operational size." *Journal of Comparative Pathology* 81 (3):383-391.
- Kimberlin, R. H., et C. A. Walker. 1978. "Pathogenesis of mouse scrapie: effect of route of inoculation on infectivity titres and dose-response curves." *J Comp Pathol* 88 (1):39-47.
- Kimberlin, R. H., et C. A. Walker. 1979. "Pathogenesis of mouse scrapie: Dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes." *Journal of Comparative Pathology* 89 (4):551-562.
- Kimberlin, R. H., et C. A. Walker. 1986. "Pathogenesis of scrapie (strain 263k) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly." *Journal of General Virology* 67 (2):255-263.
- Konold, T., M. E. Arnold, A. R. Austin, S. Cawthraw, S. A. Hawkins, M. J. Stack, M. M. Simmons, A. R. Sayers, M. Dawson, et J. W. Wilesmith. 2012. "Bovine spongiform encephalopathy: the effect of oral exposure dose on attack rate and incubation period in cattle—an update." *BMC research notes* 5 (1):674.
- Lacroux, C., D. Bougard, C. Litaise, H. Simmons, F. Corbiere, D. Dernis, R. Tardivel, N. Morel, S. Simon, S. Lugan, P. Costes, J. L. Weisbecker, F. Schelcher, J. Grassi, J. Coste, et O. Andréoletti. 2012. "Impact of leucocyte depletion and prion reduction filters on TSE blood borne transmission." *PloS one* 7 (7).
- Lacroux, C., C. Perrin-Chauvineau, F. Corbière, N. Aron, P. Aguilar-Calvo, J. M. Torres, P. Costes, I. Brémaud, S. Lugan, F. Schelcher, F. Barillet, et O. Andréoletti. 2014. "Genetic resistance to scrapie infection in experimentally challenged goats." *Journal of Virology* 88 (5):2406-2413.
- Lacroux, C., S. Simon, S. L. Benestad, S. Maillet, J. Mathey, S. Lugan, F. Corbière, H. Cassard, P. Costes, D. Bergonier, J. L. Weisbecker, T. Moldal, H. Simmons, F. Lantier, C. Feraudet-Tarisse, N. Morel, F. Schelcher, J. Grassi, et O. Andréoletti. 2008. "Prions in milk from ewes incubating natural scrapie." *PLoS Pathogens* 4 (12). doi: 10.1371/journal.ppat.1000238.
- Lacroux, C., D. Vilette, N. Fernández-Borges, C. Litaise, S. Lugan, N. Morel, F. Corbière, S. Simon, H. Simmons, P. Costes, J. L. Weisbecker, I. Lantier, F. Lantier, F. Schelcher, J. Grassi, J. Castilla, et O. Andréoletti. 2012. "Prionemia and leukocyte-platelet-associated infectivity in sheep transmissible spongiform encephalopathy models." *Journal of Virology* 86 (4):2056-2066. doi: 10.1128/JVI.06532-11.
- Maestrale, C., G. Di Guardo, M. G. Cancedda, G. Marruchella, M. Masia, S. Sechi, S. Macciocu, C. Santucci, M. Petrucci, et C. Ligios. 2013. "A lympho-follicular microenvironment is required for pathological prion protein deposition in chronically inflamed tissues from scrapie-affected sheep." *PLoS ONE* 8(5).
- McGovern, G., S. Martin, M. Jeffrey, S. J. Bellworthy, J. Spiropoulos, R. Green, R. Lockey, C. M. Vickery, L. Thurston, et G. Dexter. 2015. "Influence of Breed and Genotype on the Onset and Distribution of Infectivity and Disease-associated Prion Protein in Sheep Following Oral Infection with the Bovine Spongiform Encephalopathy Agent." *Journal of comparative pathology* 152 (1):28-40.

- Millemann, Y., B. Heskia, et G. Belbis. 2013. "Les vaccins contre les enterobactéries responsables d'infection chez les animaux domestiques." *Bulletin des GTV* 68:17-28.
- Miller, M. W., et E. S. Williams. 2003. "Horizontal prion transmission in mule deer." *Nature* 425 (6953):35-36.
- Mohler, V. L., D. M. Heithoff, M. J. Mahan, K. H. Walker, M. A. Hornitzky, L. W. C. Shum, K. J. Makin, et J. K. House. 2008. "Cross-protective immunity conferred by a DNA adenine methylase deficient *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine in calves challenged with *Salmonella* serovar Newport." *Vaccine* 26 (14):1751-1758.
- Moreno, C. R., K. Moazami-Goudarzi, P. Laurent, G. Cazeau, O. Androletti, S. Chadi, J-M. Elsen, et D. Calavas. 2007. "Which PrP haplotypes in a French sheep population are the most susceptible to atypical scrapie?" *Archives of virology* 152 (6):1229-1232.
- Moum, T., I. Olsaker, P. Hopp, T. Moldal, M. Valheim, T. Moum, et S-L Benestad. 2005. "Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases." *Journal of General Virology* 86 (1):231-235.
- Nentwig, A., A. Oevermann, D. Heim, C. Botteron, K. Zellweger, C. Drogemuller, A. Zurbriggen, et T. Seuberlich. 2007. "Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie." *PLoS Pathog* 3 (6):e82.
- News and report. 2015a. "BSE case in Ireland confirmed as an isolated case of classical BSE." *Vet Rec* (177):6.
- News and report. 2015b. "Case of classical BSE confirmed in Wales." *Vet Rec* (177):353.
- News and report. 2016. "Case of classical BSE confirmed in France." (178):328.
- Orge, L., A. Oliveira, C. G. Machado, R. Carvalho, J. Silva, P. Tavares, P. Almeida, C. Ochoa, C. Lima, T. S. Santos, et M. J. Pinto. 2012. "Epidemiology and risk analysis. PO-103 : intensive surveillance in atypical scrapie affected Flocks- results and impact." *Prion* 6 (sup1).
- Parlement et Conseil européens. 2001. "Règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2001 fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles." *Journal officiel de l'Union européenne*.
- Poutrel, B., et P. Le Page. 2012. "Prévention vaccinale (Starvac) des mammites à staphylocoques et à coliformes." *Bulletin des GTV* 67:21-26.
- Prusiner, S. B., S. P. Cochran, et M. P. Alpers. 1985. "Transmission of scrapie in hamsters." *Journal of Infectious Diseases* 152 (5):971-978.
- Renwick, C. C., et I. Zlotnik. 1965. "The transmission of scrapie to mice by intracerebral inoculations of brain from an apparently normal lamb." *Veterinary Record* 77 (34):984-985.
- Rubenstein, R., B. Chang, P. Gray, M. Piltch, M. S. Bulgin, S. Sorensen-Melson, et M. W. Miller. 2011. "Prion disease detection, PMCA kinetics, and IgG in urine from sheep

naturally/experimentally infected with scrapie and deer with preclinical/clinical chronic wasting disease." *Journal of Virology* 85 (17):9031-9038.

- Sala, C., J. B. Perrin, A. G. Biacabe, et D. Calavas. 2013. "Encéphalopathie spongiforme bovine en 2013 : poursuite de l'allègement de la surveillance dans un contexte de maîtrise de la forme classique." *Bulletin épidémiologique ANSES/DGAI* 64 (Spécial Maladies réglementées et émergentes, Bilan 2013.).
- Sala, C., E. Morignat, N. Oussaïd, E. Gay, D. Abrial, C. Ducrot, et D. Calavas. 2012. "Individual factors associated with L- and H-type Bovine Spongiform Encephalopathy in France." *BMC Veterinary Research* 8.
- Salazar, E., E. Monleón, R. Bolea, C. Acín, M. Pérez, N. Álvarez, I. Leginagoikoa, R. Juste, E. Minguijón, et R. Reina. 2010. "Detection of PrPSc in lung and mammary gland is favored by the presence of Visna/maedi virus lesions in naturally coinfecting sheep." *Veterinary research* 41 (5):58.
- Scott, M. R., J. Safar, G. Telling, O. Nguyen, D. Groth, M. Torchia, R. Koehler, P. Tremblay, D. Walther, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, et S. B. Prusiner. 1997. "Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (26):14279-84.
- Spiropoulos, J., R. Lockey, R. E. Sallis, L. A. Terry, L. Thorne, T. M. Holder, K. E. Beck, et M. M. Simmons. 2011. "Isolation of prion with BSE properties from farmed goat." *Emerging Infectious Diseases* 17 (12):2253-2261.
- Tamgüney, G., J. A. Richt, A. N. Hamir, J. J. Greenlee, M. W. Miller, L. L. Wolfe, T. M. Sirochman, A. J. Young, D. V. Glidden, N. L. Johnson, K. Giles, S. J. DeArmond, et S. B. Prusiner. 2012. "Salivary prions in sheep and deer." *Prion* 6 (1):52-61.
- Terry, L. A., L. Howells, K. Bishop, C. A. Baker, S. Everest, L. Thorne, B. C. Maddison, et K. C. Gough. 2011. "Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie." *Vet Res* 42 (1):65.
- Vaccari, G., M. A. Di Bari, L. Morelli, R. Nonno, B. Chiappini, G. Antonucci, S. Marcon, E. Esposito, P. Fazzi, et N. Palazzini. 2006. "Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie." *Journal of General Virology* 87 (5):1395-1402.
- Wells, G. A., M. Dawson, S. A. Hawkins, R. B. Green, I. Dexter, M. E. Francis, M. M. Simmons, A. R. Austin, et M. W. Horigan. 1994. "Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy." *Vet Rec* 135 (2):40-1.
- Wells, G. A. H., T. Konold, M. E. Arnold, A. R. Austin, S. A. C. Hawkins, M. Stack, M. M. Simmons, Y. H. Lee, D. Gavier-Widén, M. Dawson, et J. W. Wilesmith. 2007. "Bovine spongiform encephalopathy: The effect of oral exposure dose on attack rate and incubation period in cattle." *Journal of General Virology* 88 (4):1363-1373.
- White, S. N., J. O. Reynolds, D. I. F. Waldron, D. A. Schneider, et K. I. O'Rourke. 2012. "Extended scrapie incubation time in goats singly heterozygous for PRNP S146 or K222." *Gene* 501 (1):49-51.

- Wilesmith, J. W., J. B. Ryan, et M. J. Atkinson. 1991. "Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin." *Veterinary Record* 128 (9):199-203.
- World Health Organization, et WHO Expert Committee on Biological Standardization. 2010. WHO Tables on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies. World Health Organization.
- Zobeley, E., E. Flechsig, A. Cozzio, M. Enari, et C. Weissmann. 1999. "Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface." *Molecular Medicine* 5 (4):240-243.

Annexe 1 : Lettre de saisine

2013 -SA- 0 2 3 1

COURRIER ARRIVE

1 8 DEC. 2013

DIRECTION GENERALE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE , DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORET



N° 0 1 4 1 3 - D

Direction générale de l'alimentation
 Service de la prévention des risques sanitaires de la production
 primaire
 Sous-direction de la santé et de la protection animales
 Bureau des intrants et de la santé publique en élevage

Dossier suivi par : Caroline Comau
 Tél. : 01.49.55.84.35
 Réf. interne : 20131210_CC_Saisine Anses Autovaccins ruminants

Le Directeur général de l'alimentation

à

Monsieur le Directeur général de l'Agence
 nationale de sécurité sanitaire de
 l'alimentation, de l'environnement et du
 travail
 27-31 avenue du Général Leclerc
 94701 Maisons-Alfort cedex

Paris, le 1 6 DEC. 2013

Objet : Saisine Anses Autovaccins chez les ruminants suite à la saisine 2011-SA-0156 sur les autovaccins à usage vétérinaire

L'Anses a été saisie le 17 juin 2011 par le Syndicat de l'Industrie du Médicament Vétérinaire et Réactif (SIMV) sur la problématique générale des autovaccins à usage vétérinaire (Saisine 2011-SA-0156).

Dans son avis du 21 octobre 2013, l'ANSES indique que le groupe de travail n'a pas traité de l'usage des autovaccins chez les ruminants du fait que cet usage n'était pas autorisé en France.

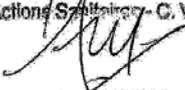
En effet, l'arrêté du 2 décembre 2003 portant interdiction de la préparation, la mise sur le marché, la prescription, la délivrance, l'administration, l'importation et l'exportation des autovaccins à usage vétérinaire destinés aux bovins, ovins ou caprins, à base de produits d'origine bovine, ovine ou caprine, et par application du principe de précaution relatif aux encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (voir pièce jointe) dispose à son article 1 que « la préparation, la mise sur le marché, la prescription, la délivrance, l'administration, l'importation et l'exportation des autovaccins à usage vétérinaire définis au 3° de l'article L. 5141-2 du code de la santé publique destinés aux bovins, ovins ou caprins, à base de produits d'origine bovine, ovine ou caprine, à l'exception de ceux qui répondent aux exigences de la pharmacopée sur les ESST, sont interdites ».

Pour autant et compte tenu de l'évolution très favorable de la situation épidémiologique en matière d'ESST depuis 2003, l'ANSES recommande d'étudier la révision de la réglementation concernant les autovaccins chez les ruminants.

C'est pourquoi, je souhaiterais recueillir l'avis de l'ANSES sur l'évaluation du risque en cas d'autorisation de l'usage des autovaccins chez les ruminants. En cas d'avis favorable l'arrêté du 2 décembre 2003 susmentionné sera abrogé.

En outre, il est rappelé que la mesure 15 du plan Ecoantibio 2017 porte sur la promotion de la recherche dans le domaine de l'immunité et de l'utilisation de vaccins ou d'auto-vaccins. Cette mesure indique que le recours à la vaccination, lorsqu'il est possible pour la prévention de certaines pathologies, doit être encouragé et que, sous réserve d'une validation scientifique de leur intérêt thérapeutique et en l'absence de vaccins autorisés, le recours aux autovaccins peut être envisagé.

Le Directeur Général Adjoint
 Chef du Service de la Coordination
 des Actions Sanitaires - C. V. O.


 Jean-Luc ANCOU

Annexe 2 : Principales maladies des ruminants pour lesquelles existent des vaccins commercialisés en France

Tableau 4 : Principales maladies des petits ruminants pour lesquelles existent des vaccins commercialisés en France

Exemple de maladie	Principales matières virulentes (matrice)	Existence de stock vaccins et espèces cibles	Défaut(s) d'efficacité potentiel(s) ou signalé(s)* des vaccins commercialisés	Pratiques de l'autovaccin avant interdiction réglementaire	Besoin d'autovaccin exprimé par les acteurs terrain
Colibacillose digestive (néonatale)	Matières fécales	Oui, contre F5 +/- Y (+/-) et CS31A (+/-) (Ov)	ND	Non	++ chez l'agneau ; +/- chez le chevreau = valeur commerciale faible – intérêts pour les engraisseurs mais vaccin administré aux mères
Salmonellose digestive	Matières fécales	Oui (Ov et Cp)	Ne couvre pas tous les sérotypes circulants	Non	Non
Paratuberculose	Matières fécales	Oui	Non	ND	ND
Mycoplasmoses mammaires	Lait	Non	Sans objet	Oui	+++
Mammite staphylococcique	Lait	Oui (Ov et Cp)	ND	Oui	+ / ++ (mieux adapté aux petits ruminants / souches)
Mycoplasmoses respiratoires	Poumon	Non	Sans objet	Oui (i.e agalactie contagieuse)	++
Pasteurellose à <i>Mannheimia haemolytica</i>	Poumon, sécrétions nasales	Oui (Ov)	Oui, 3 déclarations de défauts d'efficacité en 2014	Non	+ / ++ (mieux adapté aux petits ruminants / souches)
Pasteurellose à <i>Pasteurella multocida</i>	Poumon, sécrétions nasales	Oui, (Ov, Cp)	Oui, 3 déclarations de défauts d'efficacité en 2014.	Non	Non

Exemple de maladie	Principales matières virulentes (matrice)	Existence de stock vaccins et espèces cibles	Défaut(s) d'efficacité potentiel(s) ou signalé(s)* des vaccins commercialisés	Pratiques de l'autovaccin avant interdiction réglementaire	Besoin d'autovaccin exprimé par les acteurs terrain
Staphylococcie cutanée	Pus d'abcès cutané	Non, mais vaccin mammite (Ov, Cp) employé sur le terrain	ND	Oui	+/-
Maladie des abcès (lymphadénite caséuse) à <i>S. aureus anaerobius</i>	Pus d'abcès	Non	Sans objet	Oui	++
Maladie des abcès (lymphadénite caséuse) à <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Pus d'abcès	Non	Sans objet	Non	-/+
Listériose	Système nerveux, placenta, fœtus	Arrêté en 1990	Résultats controversés	ND	-/+ (modifications de l'alimentation souvent suffisantes)
Salmonellose abortive	Placenta, sécrétions génitales, fœtus	Non	Sans objet	Non	++
Piétin	Exsudat de lésion	Oui (Ov)	ND	ND	Non
Rouget	Liquide articulaire – Foie, rate	Oui (Ov)	ND	ND	Non
Chlamydiose	Sécrétions génitales - Avorton	Oui (Ov, Cp)	1 en 2014.	ND	Non
Coxiellose (Fièvre Q)	Sécrétions génitales - Avorton	Oui (Ov et Cp)	ND	ND	Non
Entérotoxémies	Contenu intestinal	Oui (Ov, Cp)	Variables	Non	Non

Ov = ovins ; Cp = caprins ; ND = information non disponible ; * = cas répertoriés dans le cadre de la pharmacovigilance vétérinaire française

Tableau 5 : Principales maladies des bovins pour lesquelles existent des vaccins commercialisés en France

Exemples de maladie	Principales matières virulentes (Matrice)	Existence de stock vaccins	Défaut(s) d'efficacité potentiel(s) ou signalé(s)* des vaccins commercialisés	Pratiques de l'autovaccin avant interdiction réglementaire	Besoin d'autovaccin exprimé par les acteurs terrain
Colibacillose digestive (néonatale)	Matières fécales	Oui, valences F5+/- F41+/- FY e+/-CS31A	Vaccin bovin adapté (mais pas tous types coli). Efficacité dépendante de la prise colostrale. 5 déclarations de défauts d'efficacité en 2014	Non	Non
Coxiellose (Fièvre Q)	Sécrétions génitales - Avorton	Oui	ND	ND	Non
Entérotoxémies	Contenu intestinal	Oui, nombreuses valences : anatoxines, anacultures, etc.	ND	Non	Non
Leptospirose	Urine	Oui	Protection contre sérovar <i>Hardjo</i> uniquement	Non	Non
Listériose	Système nerveux, placenta, fœtus	Non	Sans objet	ND	ND (modifications de l'alimentation souvent suffisantes)
Mammites	Lait	Oui, <i>E. coli</i> J5, <i>S. aureus</i> , et SCN	ND	Non	Non
Mycoplasmoses respiratoires	Poumon	Non	Sans objet	Non	Non
Paratuberculose	Matières fécales	Oui	Non	ND	Non

Exemples de maladie	Principales matières virulentes (Matrice)	Existence de stock vaccins	Défaut(s) d'efficacité potentiel(s) ou signalé(s)* des vaccins commercialisés	Pratiques de l'autovaccin avant interdiction réglementaire	Besoin d'autovaccin exprimé par les acteurs terrain
Pasteurellose	Poumon, sécrétions nasales	Oui, contre <i>M. haemolytica</i> A1 mais aussi <i>P. multocida</i>	Non pour les monovalents Mh ; mais émergence de Mh A6 9 déclarations de défauts d'efficacité en 2014.	Non	Non
Salmonellose (digestive ++)	Matières fécales (autre matrice selon forme rencontrée)	Oui, contre les seuls sérotypes Typhimurium et Dublin	Ne couvre pas tous les sérotypes circulants. 1 déclaration de défauts d'efficacité en 2014.	Non	+

* = cas répertoriés dans le cadre de la pharmacovigilance vétérinaire française ; ND = information non disponible ; Mh = *Mannheimia haemolytica*.

Annexe 3 : Tests de dépistage des EST

➤ Principe :

Les tests de dépistage permettent de mettre en évidence le marqueur spécifique des EST : la PrP^{sc}.

Ces tests de dépistage ont permis la mise en place de programme de surveillance active des EST au sein des cheptels de ruminants. Cette surveillance active comprend l'utilisation :

- de tests rapides utilisés en première intention.
- des tests ou méthodes de confirmation et de typages de souche.

Les tests rapides permettent de dépister la PrP^{sc} en moins de 24 heures et sont généralement pratiqués dans les laboratoires vétérinaires départementaux. Selon le test, la mise en évidence de la PrP^{sc} se fait par Western Blot ou différentes méthodes d'immunodosage de cette protéine (Parlement et Conseil européens 2001). Les différents tests commerciaux ont été évalués au travers de 4 programmes d'évaluation européens achevés respectivement en 1999, 2002, 2004 et 2012 (EFSA 2012b).

Les méthodes de confirmation (utilisées notamment dans les laboratoires nationaux de référence) permettent de mettre en évidence la PrP^{sc} par histopathologie, immunohistochimie, Western blot ou par détection de fibrilles caractéristiques au microscope électronique (Parlement et Conseil européens 2001). Dans certains cas des tests complémentaires discriminants sont réalisés afin de déterminer la nature de la souche (classique ou atypique ou ESB des petits ruminants).

➤ Utilisation dans les programmes de surveillance :

Pour le cadre de la surveillance de l'ESB en France et depuis le 1^{er} Janvier 2015 : en abattoir, les animaux «tout venant» nés à partir le 1^{er} Janvier 2002 ne font plus l'objet d'un test rapide.

Les animaux à risque (animaux trouvés morts, abattus d'urgence, suspicion clinique) continuent à être testés s'ils sont âgés de 48 mois et plus (Direction générale de l'alimentation 2014).

Dans le cadre de la surveillance des EST chez les petits ruminants, le dépistage n'est actuellement réalisé que sur une fraction de la population (échantillonnage) : de l'ordre de 10 000 tests à l'abattoir pour les ovins ou les caprins, environ 40 000 à l'équarrissage pour les ovins et 50 000 à l'équarrissage pour les caprins.

➤ Matrice :

Bien que certains tests de dépistage aient la capacité de détecter la PrP^{sc} dans les formations lymphoïdes (Corbière, Chauvineau-Perrin, Lacroux, Costes, et al. 2013, EFSA 2005)), la matrice prélevée dans le cadre des programmes actuels de surveillance des EST est une zone du SNC située à la base du tronc cérébral : l'obex (Note de service DGAL/SDSPA/SDSSA/N2004-8294 du 30 décembre 2004²²). L'obex constitue une zone anatomique relativement accessible du SNC, mais la présence de la PrP^{sc} dans cette matrice est donc tardive (6 derniers mois à 1 an avant l'apparition des signes cliniques pour l'ESB, et plus généralement dans la dernière moitié de la période d'incubation pour les autres souches). Comme mentionné en paragraphe 4.3.4, la PrP^{sc} peut être présente à des stades précoces dans d'autres tissus tels que les nœuds lymphatiques. Néanmoins, cette présence périphérique de la protéine pathologique est fortement dépendante de

²² [http://www.gds38.asso.fr/web/gds.nsf/0/3daa1940c9d7952ec1256f7900396844/\\$FILE/DGALN20048294.PDF](http://www.gds38.asso.fr/web/gds.nsf/0/3daa1940c9d7952ec1256f7900396844/$FILE/DGALN20048294.PDF)

l'espèce (petits ruminants), du génotype de l'hôte (sensibles) et des souches (treublantes classiques).

➤ **Sensibilité :**

Les sensibilités des tests rapides mentionnées dans les rapports européens ont été évaluées principalement sur des d'échantillons de SNC²³ de cas d'EST confirmés (donc déjà positifs par une des méthodes de référence). La sensibilité estimée dans ces rapports correspond donc (exprimée en pourcentage) au nombre d'échantillons que le test rapide a identifié comme positif par rapport au nombre total d'échantillons positifs utilisés lors de l'évaluation (égal ou proche de 100%).

Toutefois, cette valeur ne permet pas de déduire la sensibilité réelle d'un test appliqué sur le terrain. Cette sensibilité réelle peut être définie comme : la proportion de prélèvements identifiés positifs par le test par rapport au nombre total d'animaux infectés²⁴ dans la population testée. Par exemple, les tests pratiqués sur obex ne pourront pas identifier les animaux en incubation pour lesquels l'agent n'a pas encore atteint le système nerveux central, alors que certains de ces animaux ont déjà accumulé des quantités significatives de PrP^{Sc} dans divers tissus périphériques. L'Afssa et l'Anses ont fréquemment souligné qu'un résultat négatif d'un test réalisé uniquement sur obex des petits ruminants permettait de détecter de l'ordre de 50% des animaux infectés (Afssa 2007a). Des travaux ultérieurs réalisés sur des troupeaux caprins (8 troupeaux infectés totalisant près de 2000 caprins) ont permis de confirmer cette valeur (Corbière, Chauvineau-Perrin, Lacroux, Costes, et al. 2013). Ces mêmes travaux démontrent qu'en réalisant un test à la fois sur obex et sur un tissu lymphoïde (ganglions rétro pharyngien ou mésentérique) du même animal, le dépistage était alors capable de détecter plus de 95 % des animaux infectés au sein d'un foyer de treublante.

En outre, les études physiopathologiques ont montré que la répartition de la PrP^{Sc} au sein même du SNC, dans les cas des souches atypiques d'EST, était différente de celle observée avec les souches classiques (Casalone et al. 2004, Nentwig et al. 2007) et pour les petits ruminants sujette à de fortes variations individuelles (Nentwig et al. 2007). Dans certains cas, la PrP^{Sc} est abondante dans les structures antérieures de l'encéphale, et très peu présente dans le tronc cérébral. La fiabilité et la sensibilité réelle d'un test pratiqué sur obex pour le dépistage des souches atypiques restent donc encore inconnues (Afssa 2009, Anses 2011, EFSA 2014b).

²³ (tronc cérébral, cortex ou cervelet pour la treublante atypique)

²⁴ (asymptomatiques + cas cliniques)

Annexe 4 : Valeurs d'infectiosité des tissus prises en compte dans l'appréciation de risque

Tableau 6 : Valeurs d'infectiosité des tissus prises en compte dans l'appréciation de risque pour l'ESB classique des bovins

Matrice	Technique	Titre infectieux		Référence
		Mesuré par dilution limite	Estimé	
SNC	Bio essai souris Tg Bov			(Hoffmann et al. 2007)
	Si testé positif	$10^{6,1}$ DI ₅₀ /g tissu		
	Si testé négatif	Inférieur au seuil de détection de la PrP ^{sc} : 10^4 fois moins que dans le SNC, soit $\leq 10^2$ DI ₅₀ /g tissu		(Balkema-Buschmann et al. 2011b)
Ganglions lymphatiques (mésentériques)	Bioessai négatif /Immuno histo chimie (IHC) négative / mais PMCA positive		$\leq 10^{-6,7}$ DI ₅₀ /g sur souris RIII ²⁵ Cette valeur est estimée d'après la borne supérieure de l'intervalle de confiance d'un bio essai négatif sur 12 souris Tg Bov. Sachant que 1 DI ₅₀ IC/IP pour les souris RIII est équivalente à $10^{4,4}$ DI ₅₀ IC/IP pour les Tg Bov, l'infectiosité serait donc égale à $5 \cdot 10^{-3}$ DI ₅₀ IC sur souris Tg Bov (soit très inférieure au seuil des méthodes biochimiques par Western Blot (WB) défini à 10^2 DI ₅₀ (Balkema-Buschmann et al. 2011b)	(EFSA 2014a)
Rate	Négative en bio essai et PMCA		Niveau sans doute similaire à ceux des ganglions mésentériques. Les experts du GT considèrent ≤ 10 DI ₅₀ /g	(EFSA 2014a)

²⁵ Souris RIII = souris non transgéniques, moins sensibles à l'infection que les souris Tg bov.

Matrice	Technique	Titre infectieux		Référence
		Mesuré par dilution limite	Estimé	
Muqueuse nasale et langue	Positif en bioessai souris Tg Bov		$\leq 10^{2,5}$ DI ₅₀ /g ; estimé d'après les périodes d'incubation des souris du bioessai	(Balkema-Buschmann et al. 2011a)
Poumons	Négatif en bioessai souris Tg Bov		Les experts du GT considèrent ≤ 10 DI ₅₀ /g	(World Health Organization et WHO Expert Committee on Biological Standardization 2010)
Iléon distal (plaque de Peyer)	Modélisation d'après des bioessais et des mesures de PrP ^{sc}		En moyenne un titre de $10^{0,37}$ IC/IP DI ₅₀ /g sur souris RIII (variations allant de $10^{-1,2}$ à $10^{2,1}$). Sachant que 1 DI ₅₀ IC/IP pour les souris RIII est équivalente à $10^{4,4}$ DI ₅₀ IC/IP pour les Tg Bov, l'infectiosité moyenne serait donc de $5,8 \cdot 10^4$ DI ₅₀ IC/IP/g chez la souris Tg Bov.	(EFSA 2014a)
Placenta	Négatif en bioessai		Les experts du GT considèrent $\leq 10^2$ DI ₅₀ /g	(World Health Organization et WHO Expert Committee on Biological Standardization 2010)
Foie	Négatif en bioessai		Les experts du GT considèrent < 10 DI ₅₀ /g	(World Health Organization et WHO Expert Committee on Biological Standardization 2010)
Pus	NR		Les experts du GT considèrent $\leq 10^2$	
Liquide articulaire	NR		Les experts du GT considèrent $\leq 10^2$ DI ₅₀ /g	
EL	NR		Les experts du GT considèrent $< 10^2$ DI ₅₀ /g	
Salive	NR			
Lait	Négatif en bioessai		Les experts du GT considèrent ≤ 10 DI ₅₀ /g	(EFSA 2014b)
Sang	Négatif en bioessai		Les experts du GT considèrent ≤ 10 DI ₅₀ /g	(EFSA 2014b)

Matrice	Technique	Titre infectieux		Référence
		Mesuré par dilution limite	Estimé	
Urine	Négatif en bioessai		Les experts du GT considèrent $\leq 10 \text{ DI}_{50}/\text{g}$	(World Health Organization et WHO Expert Committee on Biological Standardization 2010)
Fèces	PMCA		Les experts du GT considèrent $\leq 10 \text{ DI}_{50}/\text{g}$	(World Health Organization et WHO Expert Committee on Biological Standardization 2010)
Muscles	Positif IHC/WB/ bioessai		Titre moins élevé de 6 log par rapport au cerveau $\leq 10 \text{ DI}_{50}/\text{g}$	(Buschmann et Groschup 2005)

NR: Non renseigné

Tableau 7 : Valeurs d'infectiosité des tissus prises en compte dans l'appréciation de risque pour la tremblante atypique des petits ruminants

Matrice	Technique	Titre infectieux		Référence
		Mesuré	Estimé	
SNC	Bio essai souris Tg Ov ²⁶ Si testé positif Si négatif sur obex	10 ^{8,7} DI ₅₀ /g à 10 ^{9,5} DI ₅₀ /g ≤ 10 ^{7,7} DI ₅₀ /g		(Andréoletti et al. 2011)
Ganglions lymphatiques	Bio essai souris Tg Ov		≤ 10 ^{2,7} DI ₅₀ /g par analogie des périodes d'incubation avec la titration des homogénats de cerveau	(Andréoletti et al. 2011)
Rate			Considéré comme équivalent au titre infectieux des formations lymphoïdes soit ≤ 10 ^{2,7} DI ₅₀ /g	(Andréoletti et al. 2011)
Poumons	NR		Les experts du GT considèrent ≤ 10 ^{2,7} DI ₅₀ /g	
GALT			Considéré comme équivalent au titre infectieux des formations lymphoïdes soit ≤ 10 ^{2,7} DI ₅₀ /g	(Andréoletti et al. 2011)
Placenta			Considéré comme équivalent au titre infectieux des formations lymphoïdes soit ≤ 10 ^{2,7} DI ₅₀ /g	(Andréoletti et al. 2011)
Pus	NR		Les experts du GT considèrent ≤ 10 ^{2,7}	
Liquide articulaire	NR		Les experts du GT considèrent ≤ 10 ^{2,7}	
EL	NR		Les experts du GT considèrent ≤ 10 ^{2,7}	

²⁶ Souris Tg Ov = souris transgénique exprimant la PrP^C ovine

Matrice	Technique	Titre infectieux		Référence
		Mesuré	Estimé	
Lait	NR		Données non disponibles, mais titre probablement inférieur à ceux de la tremblante classique. Les experts du GT considèrent $\leq 10^2$	(Afssa 2008a)
Sang	NR		Les experts du GT considèrent ≤ 10	
Urine	NR		Les experts du GT considèrent ≤ 10	
Fèces	NR		Les experts du GT considèrent ≤ 10	
Muscles	Bio essai souris Tg Ov		$\leq 10^{2,7}$ DI ₅₀ /g, par analogie des périodes d'incubation avec la titration des homogénats de cerveau.	(Andréoletti et al. 2011)

NR: Non renseigné

Tableau 8 : Valeurs d'infectiosité des tissus prises en compte dans l'appréciation de risque pour la tremblante classique des petits ruminants

Matrice	Technique	Titre infectieux		Référence
		Mesuré Dilution limite	Estimé	
SNC	Bio essai souris Tg Ov Si testé positif	$\leq 10^{6,8} \text{ DI}_{50}/\text{g}$		(Andréoletti et al. 2011)
	Si testé négatif	$\leq 10^{3,7} \text{ DI}_{50}/\text{g}$		
Ganglions lymphatiques	Bio essai souris Tg Ov Si ganglion testé positif		$\leq 10^{5,5} \text{ DI}_{50} /\text{g}$ (au maximum $1/10^{\text{ème}}$ du titre du cerveau)	(Andréoletti et al. 2011)
	Si ganglion testé négatif		$\leq 10^{3,7} \text{ DI}_{50}/\text{g}$	
Rate	Bio essai souris Tg Ov Si rate testée positive		$\leq 10^{5,5} \text{ DI}_{50} /\text{g}$	(Andréoletti et al. 2011)
	Si rate testée négative		$\leq 10^{3,7} \text{ DI}_{50}/\text{g}$	
Poumon	Faiblement positif par IHC, négatif par test rapide ELISA		Inférieur au seuil des méthodes biochimiques, estimé par les experts du GT $\leq 10^{3,7} \text{ DI}_{50}/\text{g}$	(Salazar et al. 2010) (Garza et al. 2014)(Andréoletti et al. 2011)
GALT (plaques Peyer)	de Bio essais, WB, IHC		$\leq 10^{5,5} \text{ DI}_{50} /\text{g}$ (au maximum $1/10^{\text{ème}}$ du titre du cerveau)	(EFSA 2010, Andréoletti et al. 2011)
Placenta	IHC, ELISA		Titre 47 fois moins élevé que dans le cerveau (soit 1,5 log de réduction) donc $\leq 10^{5,3} \text{ DI}_{50}/\text{g}$	(Andréoletti et al. 2002)
Foie	Faiblement positif par IHC, négatif par test rapide ELISA		Inférieur au seuil des méthodes biochimiques estimé par les experts du GT $\leq 10^{3,7} \text{ DI}_{50}/\text{g}$	(Garza et al. 2014)
Pus	NR		Estimé par les experts du GT $\leq 10^{3,7} \text{ DI}_{50}/\text{g}$	

Matrice	Technique	Titre infectieux		Référence
		Mesuré Dilution limite	Estimé	
Liquide articulaire	NR		Estimé par les experts du GT $\leq 10^{3.7}$ DI ₅₀ /g	
EL	NR		Estimé par les experts du GT équivalent aux tissus lymphoïdes (3 ^{em} paupière) soit $\leq 10^{5.5}$ DI ₅₀ /g	
Salive	Bio essai souris Tg Ov		$\leq 10^{1.7}$ DI ₅₀ /mL	(Tamgüney et al. 2012)
Lait	Bio essai souris Tg Ov		$10^{0.1}$ à $10^{1.6}$ DI ₅₀ /g par analogie avec la période d'incubation	(Lacroux et al. 2008)
Sang	Bio essai souris Tg Ov, PMCA		Prionémie $10^{6.5}$ fois plus faible que dans 1g de cerveau au stade terminal soit ≤ 10 DI ₅₀ /g	(Lacroux, Vilette, et al. 2012)
Urine	PMCA		≤ 10 DI ₅₀ /g	(Rubenstein et al. 2011)
Fèces	PMCA		L'équivalent de 0,64 ng de cerveau au stade terminal, soit environ un facteur de réduction de $10^{8.4}$ par rapport à l'infectiosité /g d'un cerveau au stade terminal soit ≤ 10 DI ₅₀ /g	(Terry et al. 2011)
Muscles	WB et IHC		1/5 000 par rapport à l'infectiosité du cerveau, soit $\leq 10^{2.8}$ - $10^{3.8}$ DI ₅₀ /g	(Andreoletti et al. 2004)

NR: Non renseigné

Annexe 5 : Calcul de l'impact de la préparation de l'autovaccin sur le niveau d'infectiosité des doses vaccinales

Pour calculer l'impact de la préparation de l'autovaccin sur le niveau d'infectiosité des doses vaccinales, les experts ont travaillé à partir de quatre scénarios concernant le devenir du prion lors des étapes de préparation de l'autovaccin.

Les quatre scénarios retenus sont :

Scénario 1 : le prion reste sous forme d'agrégat(s) associé(s) aux bactéries, aboutissant à la contamination d'une seule dose vaccinale.

Scénario 2 : les agrégats de prion se dissocient et la charge infectieuse initiale se dilue progressivement au cours des différentes étapes de préparation de l'autovaccin.

Scénario 3 : Lors des étapes de repiquage en milieu solide (boîtes de Pétri), le prion reste sous forme d'agrégats associés aux bactéries, mais en milieu de culture liquide, il se répartit de façon homogène entre toutes les doses vaccinales.

Scénario 4 : Lors des étapes de repiquage en milieu solide (boîtes de Petri), le prion reste sous forme d'agrégats associés aux bactéries, mais en milieu de culture liquide, il se répartit de façon hétérogène entre les doses vaccinales (trois cas de figures ont été envisagées : 1/3, 2/3 ou la totalité des doses vaccinales est contaminée avec une DI équivalente).

Les différents calculs associés à ces scénarios sont présentés ci-dessous en tenant compte des différentes étapes de la préparation d'un autovaccin.

➤ **Scénario n°1 : Les prions restent sous forme d'agrégat(s) associé(s) aux bactéries (Figure 7).**

La première étape de préparation de l'autovaccin consiste à isoler la bactérie responsable des signes cliniques à partir du prélèvement infecté. Pour réaliser cet étalement primaire, on utilise au maximum 1mg ou 1 μ L du prélèvement. Toutes les doses infectieuses étant données par g de matrice, on a donc une première dilution de la charge infectieuse de 10^{-3} .

Pour la suite des calculs, les experts ont considéré que toute la charge infectieuse était sous forme d'agrégat(s) fixé(s) sur les bactéries. Il est important de noter qu'il n'y a pas de multiplication du prion pendant les étapes de préparation de l'autovaccin.

Les étapes suivantes sont des calculs de probabilité que les bactéries contaminées se retrouvent dans la préparation vaccinale.

Lors de l'étalement primaire, les experts ont considéré que l'on obtenait au minimum 25 colonies distinctes sur la boîte de Pétri. A partir de ces colonies, une seule, bien isolée, est choisie sur des critères morphologiques pour être purifiée et identifiée. **La probabilité de choisir la colonie contaminée est donc de $4 \cdot 10^{-2}$.**

A partir de ce repiquage, deux étalements successifs vont être réalisés pour s'assurer de la pureté de la souche sélectionnée et pour permettre son identification. Pour chacun de ces repiquages, on obtient au minimum 100 colonies par boîte.

Nous obtenons donc une **probabilité de $1 \cdot 10^{-4}$ de prélever à nouveau la colonie bactérienne contaminée.**

Pour les étapes d'identification et d'amplification (culture en bouillon) avant l'envoi au laboratoire qui préparera l'autovaccin, les experts ont estimé qu'il n'y avait pas de réduction de la DI. Si la préparation est contaminée, elle gardera son titre infectieux. A noter qu'il s'agit là d'une surestimation du risque.

Pour les étapes de préparation de l'autovaccin, il y a au minimum un étalement réalisé par le laboratoire à l'arrivée de la souche, avec 100 colonies au minimum sur la gélose. Nous obtenons donc une probabilité de **$1 \cdot 10^{-2}$** de prélever à nouveau la seule colonie bactérienne contaminée.

A partir de cette étape, il n'y a plus de réduction de la DI.

On obtient donc une probabilité estimée de **$4 \cdot 10^{-8}$** d'avoir la bactérie contaminée dans la préparation vaccinale.

En appliquant le scénario n°1 (totalité de la charge infectieuse présente sous la forme d'agrégat(s) associé(s) aux bactéries), les experts estiment que lors du processus de préparation d'un auto-vaccin, on obtient une **réduction de la charge infectieuse d'un facteur 10^3** et que **la probabilité de retrouver cette dose infectieuse** dans une dose vaccinale est de **$4 \cdot 10^{-8}$** . Une seule dose de vaccin sera contaminée.

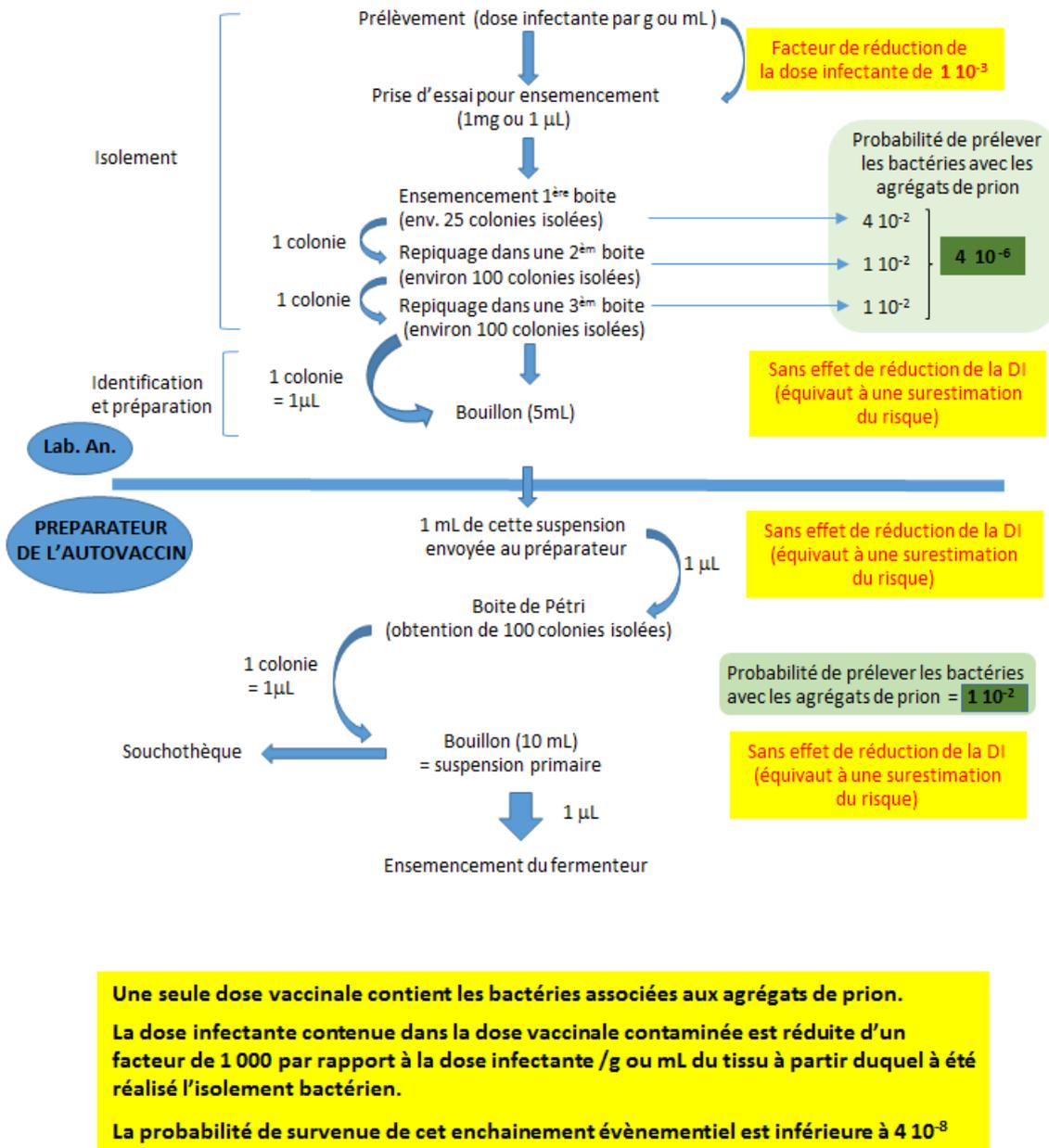


Figure 7 : Scénario n°1 : Un ou des agrégats restant associés aux bactéries tout au long du processus de préparation (de l'isolement jusqu'à préparation de la suspension vaccinale), une seule dose vaccinale étant contaminée à la fin du processus (Lab. An. = laboratoire d'analyse).

➤ **Scénario n°2 : Les prions sont répartis de façon homogène dans la préparation et se diluent à chaque étape (Figure 8)**

Comme précédemment, les experts ont considéré que 1 µL ou 1 mg du prélèvement tissulaire était utilisé pour l'étalement primaire. On a donc une première dilution de 10^{-3} de la charge infectieuse initiale.

Lors des différentes étapes de purification, pour pouvoir réaliser les calculs de dilution, les experts ont considéré que les prions se répartissaient de façon homogène sur les différentes colonies bactériennes.

Ainsi, avec les 3 étapes de repiquage décrites précédemment, on aboutit à un effet de dilution de la charge infectieuse de $4 \cdot 10^{-6}$.

Pour réaliser l'identification, la bactérie est cultivée en bouillon, le plus souvent dans un volume de 5 mL.

On considère qu'une colonie bactérienne représente au maximum 1 µL. On a donc un facteur de dilution de $2 \cdot 10^{-4}$.

Lorsque l'identification bactérienne est validée, un aliquot est envoyé au laboratoire préparateur de l'auto-vaccin. Les experts ont estimé qu'il n'était pas possible de quantifier l'effet dilution associé à l'envoi de cet aliquot. Le laboratoire producteur d'auto-vaccin réalise un étalement sur gélose pour repiquer la souche et obtenir le lot primaire. A partir de cet étalement, on obtient au minimum 100 colonies sur la gélose, soit une dilution de 10^{-2} .

Une colonie (1 µL) sera choisie pour la préparation du stock primaire de la souche, en général de 10 mL. On a donc un nouvel effet dilution de 10^{-4} .

A partir de cette étape, les bactéries sont cultivées en fermenteurs (gros volumes) pour préparer les doses vaccinales. Le volume de préparation dépend du nombre de doses à administrer. Les experts du GT ont pris deux scénarios : une préparation pour des petits cheptels (50 individus) et une préparation vaccinale destinée à des grands cheptels (350 individus).

Pour les petits cheptels, l'effet dilution sera de $1 \cdot 10^{-5}$ (100 doses préparées au minimum car 2 injections).

Pour les gros cheptels, l'effet dilution de $7 \cdot 10^{-5}$ (700 doses préparées au minimum).

Avec ce scénario, la dilution finale de la DI initiale obtenue est de :

Pour les petits cheptels (50 animaux ou 100 doses) : $8 \cdot 10^{-27}$

Pour les grands cheptels (350 animaux ou 700 doses) : $5,6 \cdot 10^{-26}$

Avec ce scénario, les experts considèrent que toutes les doses vaccinales contiennent la même quantité de prion avec une probabilité de 1 mais on constate également que l'effet de dilution est tel, que chaque dose vaccinale va contenir une charge infectieuse tellement faible qu'il est probable qu'elle sera sans capacité infectante.

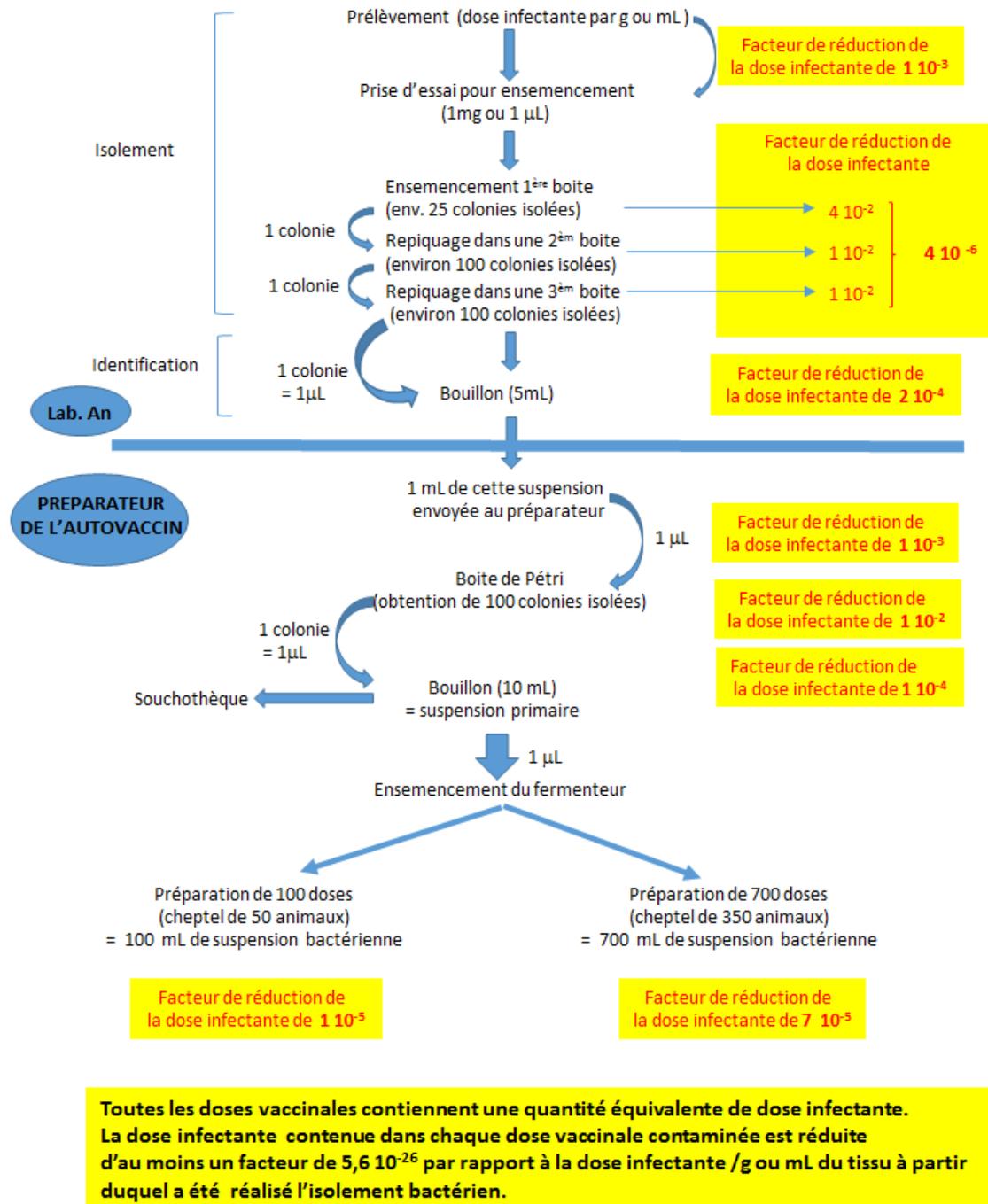


Figure 8 : Scénario n°2 : Les prions sont répartis de façon homogène dans la préparation et se diluent à chaque étape.

➤ **Scénario n°3 : Les prions restent sous forme d'agrégat(s) associé(s) aux bactéries lors des phases de repiquage en milieu solide et répartis dans le milieu lors des phases de culture en milieu liquide (Figure 9)**

Pour réaliser les calculs, les experts ont considéré que lorsque les bactéries étaient cultivées en milieu solide, on calculait une probabilité de contamination, et que lorsque les bactéries étaient cultivées en milieu liquide, on calculait un effet dilution de la charge infectieuse.

Pour ce scénario, les premières étapes de calcul sont identiques à celles utilisées pour le scénario n°1.

Après la phase d'isolement, on a donc une réduction de la charge infectieuse de 10^{-3} , avec une probabilité que la préparation vaccinale soit contaminée de $4 \cdot 10^{-6}$.

Lors de l'étape d'identification, on retrouve un facteur de dilution de $2 \cdot 10^{-4}$ de la charge infectieuse. Les calculs sont identiques à ceux présentés pour le scénario n°2.

Comme pour le scénario n°2, les experts ont estimé qu'il n'était pas possible de quantifier l'effet dilution lié à l'envoi de la souche au laboratoire producteur d'auto-vaccin. Lors de la préparation de l'autovaccin, on retrouve une probabilité de sélectionner une souche contaminée de 10^{-2} à partir de cette culture en gélose.

Pour la préparation du stock primaire de la souche (10 mL), on retrouve un effet dilution de 10^{-4} .

Pour les cultures en fermenteurs, on retrouve les effets dilutions estimés pour le scénario 2 :

Pour les petits cheptels, l'effet dilution sera de $1 \cdot 10^{-5}$.

Pour les gros cheptels, l'effet dilution de $7 \cdot 10^{-5}$.

Avec le scénario n°3, les experts obtiennent donc une dilution finale de la DI initiale de :

Pour les petits cheptels (50 animaux ou 100 doses) : $1 \cdot 10^{-19}$

Pour les grands cheptels (350 animaux ou 700 doses) : $7 \cdot 10^{-19}$

Et avec une probabilité de $4 \cdot 10^{-8}$ que les doses vaccinales soient contaminées.

Avec ce calcul, on considère que toutes les doses vaccinales contiennent la même quantité de prion.

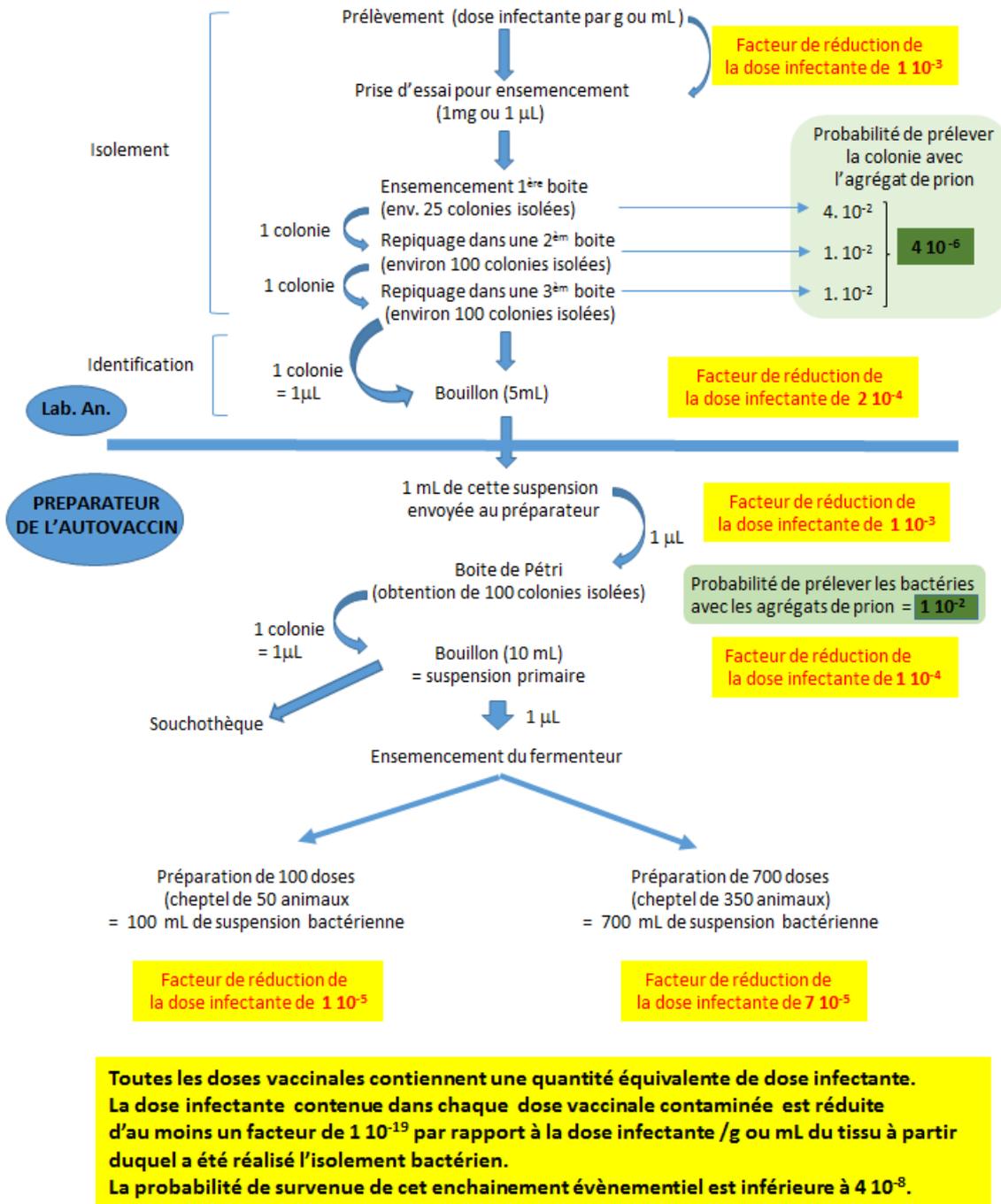


Figure 9 : Scénario n°3 : Le prion reste sous forme d'agrégat(s) associé(s) aux bactéries lors des phases de repiquage en milieu solide puis se répartit de manière homogène dans le milieu lors des phases de culture en milieu liquide.

- **Scénario n°4 : Les prions restent sous forme d'agrégat(s) associé(s) aux bactéries lors des phases de repiquage en milieu solide et puis se répartissent de manière hétérogène dans un nombre variable de doses vaccinales (Figure 10)**

Dans ce scénario, le raisonnement est proche de celui du scénario 1. La différence réside dans le fait que l'on considère dans ce cas que la DI initiale ne se retrouve pas intégralement dans une seule dose vaccinale, mais dispersée de manière équivalente dans un nombre variable de doses (pour les calculs les experts ont utilisé une répartition dans 1/3, 2/3 ou dans la totalité des doses préparées). La probabilité de retrouver la DI initiale répartie dans les différentes doses vaccinales est la même que pour le scénario 1, à savoir $4 \cdot 10^{-8}$.

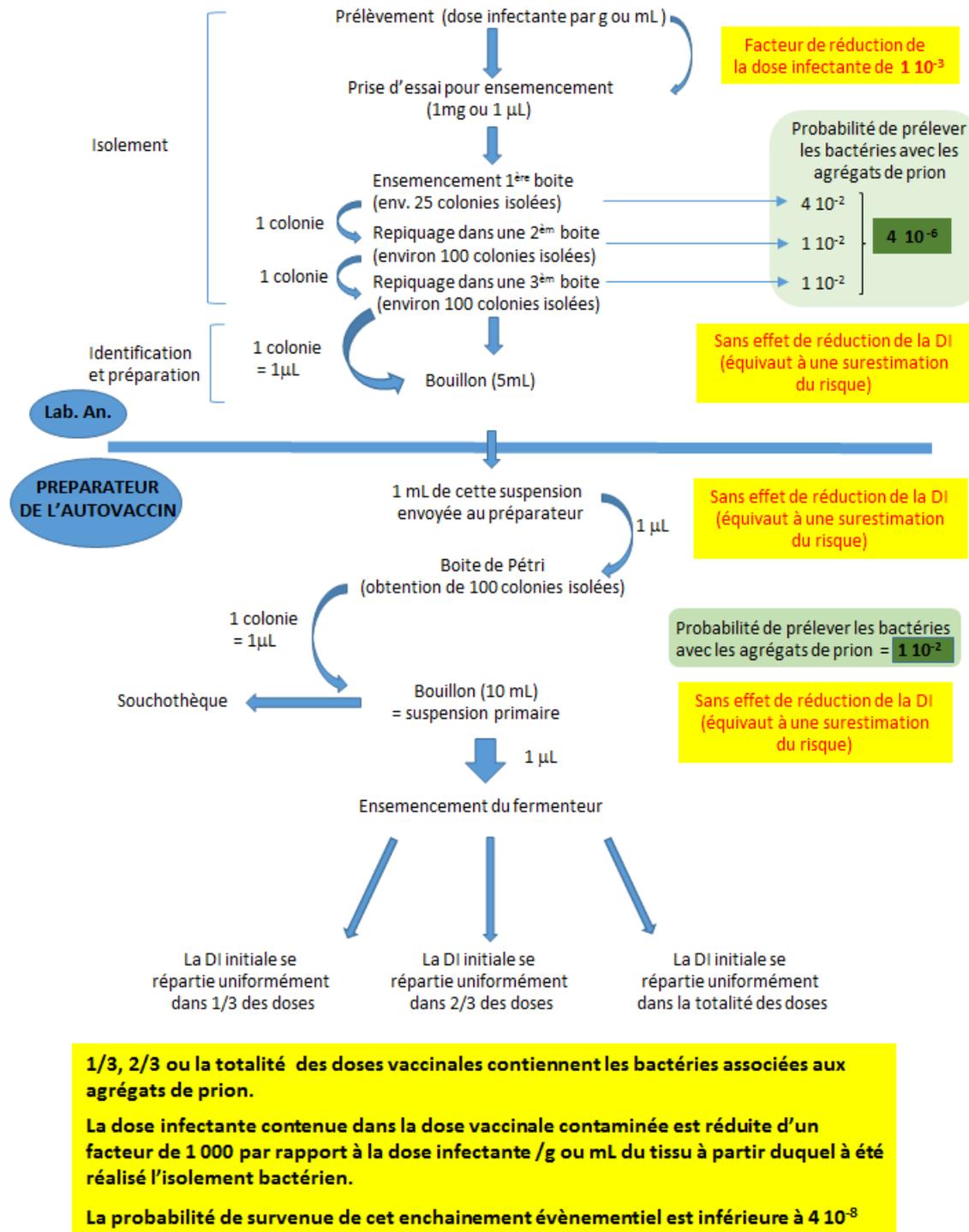


Figure 10 : Scénario n°4 : Le prion reste sous forme d'agrégat(s) associé(s) aux bactéries lors des phases de repiquage en milieu solide puis se répartit de manière homogène dans 1/3, 2/3 ou la totalité des doses vaccinales.

Annexe 6 : Calculs pour l'appréciation globale du risque de transmission du prion par utilisation des autovaccins chez les ruminants

➤ Scénario 1 :

Dans ce scénario, les experts ont considéré que le prion reste, tout au long du processus de préparation de l'autovaccin sous la forme d'agrégat(s) associé(s) aux bactéries. Dans ce cas, la réduction de la charge infectieuse (ou DI) est de 10^{-3} par rapport à la DI initiale contenue dans le prélèvement réalisé sur l'animal malade et la probabilité que cette DI se retrouve dans une dose vaccinale est de $4 \cdot 10^{-8}$ (cf. Annexe 5). Dans ce scénario, une seule dose de vaccin est contaminée et susceptible de transmettre le prion (Figure 11).

Les calculs ont été effectués en faisant varier certains paramètres :

- la prévalence intratroupeau (1 seul animal ou 5% des animaux²⁷) ;
- le nombre d'animaux dans le cheptel (50 ou 350) ;
- la DI dans la prise d'essai, c.à.d. après réduction du facteur 10^{-3} (0,01 ; 0,1 ; 1 ou 10 DI_{50}).

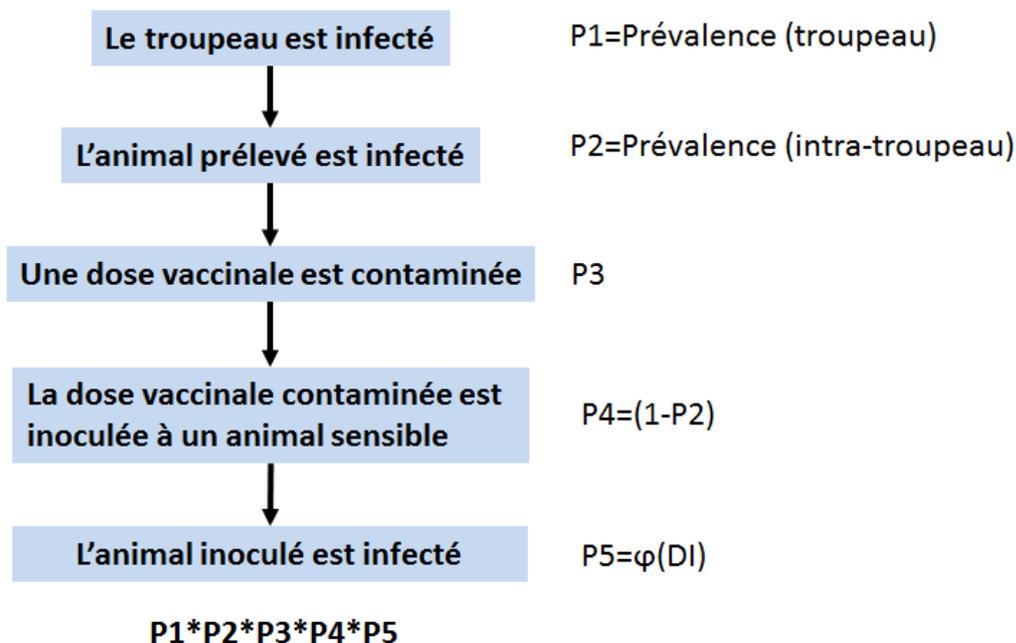


Figure 11 : Schéma illustrant le scénario 1.

$P1 = [\text{Prévalence nationale}]/P2^{28}$; $P3 = 4 \cdot 10^{-829}$; $DI = DI$ exprimée en DI_{50} ; $\varphi(x) =$ probabilité d'infection pour une dose x (exprimée en DI_{50}) ; $\varphi(x) = \exp(-3,01+1,12*d)/(1+\exp(-3,01+1,12*d))$ et $d = \log_{10}(x \cdot 0,15 \cdot 10^{3,5})$ (Konold et al. 2012).

²⁷ Pour les cheptels de 50 animaux une prévalence de 2% correspond à un animal, pour 350 animaux, un animal correspond à 0,3%. Pour avoir un nombre entier d'animaux avec une prévalence de 5%, les calculs ont été arrondis : 4% de 50 animaux = 2 animaux et 5,1% de 350 animaux = 18 animaux.

²⁸ La probabilité d'intervenir dans un cheptel infecté ($P1$) correspond à la prévalence intertroupeau qui est calculée en divisant la prévalence nationale des cas d'EST (résultats des enquêtes en abattoir et à l'équarrissage) par la prévalence intracheptel ($P2$).

²⁹ $P3$ correspond à la probabilité qu'au cours des repiquages effectués pour l'isolement et l'identification au laboratoire d'analyse, on prélève les bactéries auxquelles la DI contenue dans la prise d'essai est associée (cf. détail du calcul de cette probabilité dans le texte explicatif du scénario 1 (Annexe 5)).

Tableau 9: Calcul de la probabilité d'infecter un animal sensible dans le cas du scénario 1.

EST	Prévalence nationale	Prévalence intra-troupeau (nbre et %)	Nombre d'animaux	Probabilité qu'au moins une dose vaccinale soit contaminée	DI dans la prise d'essai	Probabilité d'infecter un animal sensible
ESB	3 10 ⁻⁶	1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	0,01	1,12 10 ⁻¹⁴
		1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	0,1	2,87 10 ⁻¹⁴
		1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	1	5,84 10 ⁻¹⁴
		1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	10	8,84 10 ⁻¹⁴
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	0,01	1,14 10 ⁻¹⁴
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	0,1	2,92 10 ⁻¹⁴
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	1	5,94 10 ⁻¹⁴
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	10	8,99 10 ⁻¹⁴
		2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	0,01	1,10 10 ⁻¹⁴
		2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	0,1	2,81 10 ⁻¹⁴
		2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	1	5,72 10 ⁻¹⁴
		2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	10	8,66 10 ⁻¹⁴
		18 Bv (5,1%)	350	4 10 ⁻⁸	0,01	1,08 10 ⁻¹⁴
		18 Bv (5,1%)	350	4 10 ⁻⁸	0,1	2,77 10 ⁻¹⁴
		18 Bv (5,1%)	350	4 10 ⁻⁸	1	5,66 10 ⁻¹⁴
		18 Bv (5,1%)	350	4 10 ⁻⁸	10	8,56 10 ⁻¹⁴
Tremblante classique ou atypique	1 10 ⁻⁴	1 Ov/Cp (2%)	50	4 10 ⁻⁸	0,01	3,73 10 ⁻¹³
		1 Ov/Cp (2%)	50	4 10 ⁻⁸	0,1	9,55 10 ⁻¹³
		1 Ov/Cp (2%)	50	4 10 ⁻⁸	1	1,95 10 ⁻¹²
		1 Ov/Cp (2%)	50	4 10 ⁻⁸	10	2,95 10 ⁻¹²
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	0,01	3,79 10 ⁻¹³
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	0,1	9,72 10 ⁻¹³
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	1	1,98 10 ⁻¹²
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	10	3,00 10 ⁻¹²
		2 Ov/Cp (4%)	50	4 10 ⁻⁸	0,01	3,65 10 ⁻¹³
		2 Ov/Cp (4%)	50	4 10 ⁻⁸	0,1	9,36 10 ⁻¹³
		2 Ov/Cp (4%)	50	4 10 ⁻⁸	1	1,91 10 ⁻¹²
		2 Ov/Cp (4%)	50	4 10 ⁻⁸	10	2,89 10 ⁻¹²
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	4 10 ⁻⁸	0,01	3,61 10 ⁻¹³
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	4 10 ⁻⁸	0,1	9,24 10 ⁻¹³
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	4 10 ⁻⁸	1	1,89 10 ⁻¹²
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	4 10 ⁻⁸	10	2,85 10 ⁻¹²

➤ **Scénario 2 :**

Dans ce scénario, les experts ont considéré que le prion ou l'agrégat est soluble et se répartit de façon homogène lors des étapes de préparation de l'autovaccin pour aboutir à une dispersion parfaitement homogène de la DI initiale entre toutes les doses vaccinales. Dans ce cas, la réduction de la DI par rapport à la DI_{50} initiale, contenue dans le prélèvement réalisé sur l'animal malade, est de $8 \cdot 10^{-24}$ pour les troupeaux de 50 animaux et $5,6 \cdot 10^{-26}$ pour les troupeaux de 350 animaux (cf. Annexe 5). La probabilité que cette DI se retrouve dans une dose vaccinale est de 1 puisque toutes les doses sont contaminées. Les calculs ont été effectués en faisant varier les mêmes paramètres que pour S1.

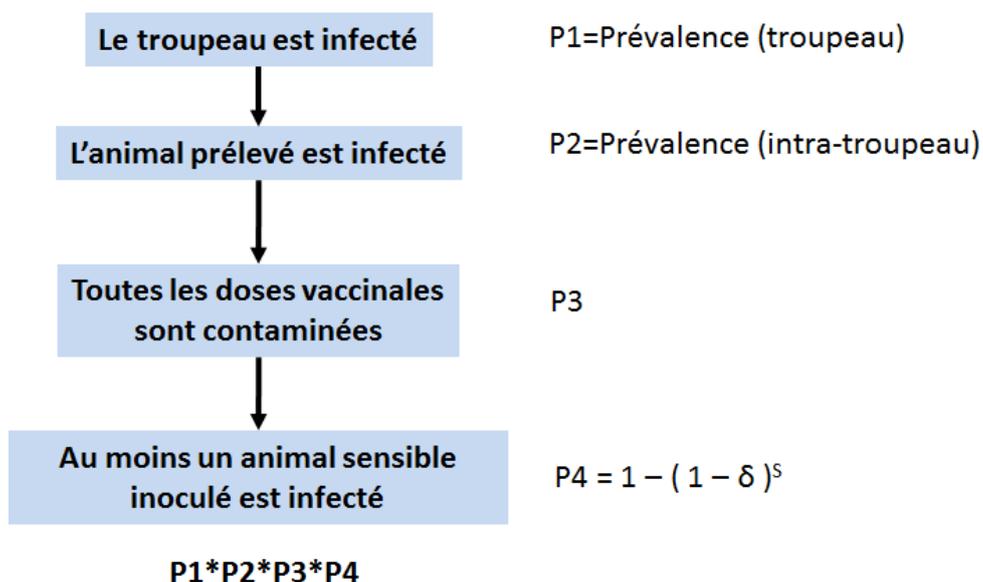


Figure 12 : Schéma illustrant les scénarios 2 et 3.

$P1 = [\text{Prévalence nationale}]/P2$ ³⁰; $P3 = 1$ pour S2 et $4 \cdot 10^{-8}$ pour S3³¹; S = nombre d'animaux sensibles; $\delta = \text{Probabilité qu'un animal sensible inoculé deux fois devienne infecté}$: $\delta = 1 - [1 - \varphi(DI \cdot f)]^2$; DI = dose infectante initiale exprimée en DI_{50} ; f = facteur de dilution de la DI initiale dans la ou les doses vaccinales contaminées; $\varphi(x)$ = probabilité d'infection pour une dose x (exprimée en DI_{50}); $\varphi(x) = \exp(-3,01+1,12 \cdot d)/(1+\exp(-3,01+1,12 \cdot d))$ et $d = \log_{10}(x \cdot 0,15 \cdot 10^{3,5})$ (Konold et al. 2012).

³⁰ La probabilité d'intervenir dans un cheptel infecté (P1) correspond à la prévalence intertroupeau qui est calculée en divisant la prévalence nationale des cas d'EST (résultats des enquêtes en abattoir et à l'équarrissage) par la prévalence intra cheptel (P2).

³¹ Pour le scénario 2, P3 correspond à la probabilité qu'au cours des repiquages effectués pour l'isolement et l'identification au laboratoire d'analyse, on prélève les bactéries auxquelles la DI contenue dans la prise d'essai est associée (cf. détail du calcul de cette probabilité dans le texte explicatif du scénario 1 (Annexe 5)). Le scénario 3 repose sur l'hypothèse d'une infection à un niveau identique de toutes les doses vaccinales. La P3 (probabilité qu'au moins une dose vaccinale soit infectée) est donc égale à 1 dans ce scénario.

Tableau 10: Calcul de la probabilité d'infecter au moins un animal sensible dans le cas du scénario 2.

EST	Prévalence nationale	Prévalence intra-troupeau (nbre et %)	Nombre d'animaux	Probabilité qu'au moins une dose vaccinale soit contaminée	DI dans la prise d'essai	Facteur de réduction de la DI	Probabilité d'infecter au moins un animal sensible
ESB	$3 \cdot 10^{-6}$	1 Bv (2%)	50	1	0,01	$8 \cdot 10^{-24}$	$1,80 \cdot 10^{-16}$
		1 Bv (2%)	50	1	0,1	$8 \cdot 10^{-24}$	$5,52 \cdot 10^{-16}$
		1 Bv (2%)	50	1	1	$8 \cdot 10^{-24}$	$1,69 \cdot 10^{-15}$
		1 Bv (2%)	50	1	10	$8 \cdot 10^{-24}$	$5,18 \cdot 10^{-15}$
		1 Bv (0,3%)	350	1	0,01	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$3,30 \cdot 10^{-15}$
		1 Bv (0,3%)	350	1	0,1	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$1,01 \cdot 10^{-14}$
		1 Bv (0,3%)	350	1	1	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$3,10 \cdot 10^{-14}$
		1 Bv (0,3%)	350	1	10	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$9,51 \cdot 10^{-14}$
		2 Bv (4%)	50	1	0,01	$8 \cdot 10^{-24}$	$1,76 \cdot 10^{-16}$
		2 Bv (4%)	50	1	0,1	$8 \cdot 10^{-24}$	$5,41 \cdot 10^{-16}$
		2 Bv (4%)	50	1	1	$8 \cdot 10^{-24}$	$1,66 \cdot 10^{-15}$
		2 Bv (4%)	50	1	10	$8 \cdot 10^{-24}$	$5,08 \cdot 10^{-15}$
		18 Bv (5,1%)	350	1	0,01	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$3,14 \cdot 10^{-15}$
		18 Bv (5,1%)	350	1	0,1	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$9,63 \cdot 10^{-15}$
		18 Bv (5,1%)	350	1	1	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$2,95 \cdot 10^{-14}$
		18 Bv (5,1%)	350	1	10	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$9,05 \cdot 10^{-14}$
Tremblante classique ou atypique	$1 \cdot 10^{-4}$	1 Ov/Cp (2%)	50	1	0,01	$8 \cdot 10^{-24}$	$6,00 \cdot 10^{-15}$
		1 Ov/Cp (2%)	50	1	0,1	$8 \cdot 10^{-24}$	$1,84 \cdot 10^{-14}$
		1 Ov/Cp (2%)	50	1	1	$8 \cdot 10^{-24}$	$5,64 \cdot 10^{-14}$
		1 Ov/Cp (2%)	50	1	10	$8 \cdot 10^{-24}$	$1,73 \cdot 10^{-13}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	1	0,01	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$1,10 \cdot 10^{-13}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	1	0,1	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$3,38 \cdot 10^{-13}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	1	1	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$1,03 \cdot 10^{-13}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	1	10	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$3,17 \cdot 10^{-13}$
		2 Ov/Cp (4%)	50	1	0,01	$8 \cdot 10^{-24}$	$5,88 \cdot 10^{-15}$
		2 Ov/Cp (4%)	50	1	0,1	$8 \cdot 10^{-24}$	$1,80 \cdot 10^{-14}$
		2 Ov/Cp (4%)	50	1	1	$8 \cdot 10^{-24}$	$5,52 \cdot 10^{-14}$
		2 Ov/Cp (4%)	50	1	10	$8 \cdot 10^{-24}$	$1,69 \cdot 10^{-13}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	1	0,01	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$1,05 \cdot 10^{-13}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	1	0,1	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$3,21 \cdot 10^{-13}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	1	1	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$9,84 \cdot 10^{-13}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	1	10	$5,6 \cdot 10^{-23}$	$3,02 \cdot 10^{-12}$

➤ **Scénario 3 :**

Dans ce scénario, les experts ont considéré que lors des étapes de repiquage en milieu solide (boîtes de Pétri), le prion reste sous forme d'agrégat(s) associé(s) aux bactéries puis en milieu de culture liquide (lors de la préparation de la biomasse), il se répartit de façon homogène entre toutes les doses vaccinales. Une partie des doses est contaminée, et toutes les doses contaminées contiennent la même quantité de prion. Dans ce cas, la réduction de la DI par rapport à la DI_{50} initiale, contenue dans le prélèvement réalisé sur l'animal malade, est de $1 \cdot 10^{-16}$ pour les troupeaux de 50 animaux et $7 \cdot 10^{-16}$ pour les troupeaux de 350 animaux (cf. Annexe 5). La probabilité que cette DI se retrouve dans une dose vaccinale est de $4 \cdot 10^{-8}$. Les calculs ont été effectués en faisant varier les mêmes paramètres que pour S1 (voir Figure 12).

Tableau 11 : Calcul de la probabilité d'infecter au moins un animal sensible dans le cas du scénario 3.

EST	Prévalence nationale	Prévalence intra-troupeau (nbre et %)	Nombre d'animaux	Probabilité qu'au moins une dose vaccinale soit contaminée	DI dans la prise d'essai	Facteur de réduction de la DI	Probabilité d'infecter au moins un animal sensible
ESB	$3 \cdot 10^{-6}$	1 Bv (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	10^{-16}	$2,04 \cdot 10^{-20}$
		1 Bv (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	10^{-16}	$6,25 \cdot 10^{-20}$
		1 Bv (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	1	10^{-16}	$1,92 \cdot 10^{-19}$
		1 Bv (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	10	10^{-16}	$5,87 \cdot 10^{-19}$
		1 Bv (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	$7 \cdot 10^{-16}$	$3,74 \cdot 10^{-19}$
		1 Bv (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	$7 \cdot 10^{-16}$	$1,15 \cdot 10^{-18}$
		1 Bv (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	1	$7 \cdot 10^{-16}$	$3,52 \cdot 10^{-18}$
		1 Bv (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	10	$7 \cdot 10^{-16}$	$1,08 \cdot 10^{-17}$
		2 Bv (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	10^{-16}	$2,00 \cdot 10^{-20}$
		2 Bv (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	10^{-16}	$6,12 \cdot 10^{-20}$
		2 Bv (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	1	10^{-16}	$1,88 \cdot 10^{-19}$
		2 Bv (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	10	10^{-16}	$5,75 \cdot 10^{-19}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	$7 \cdot 10^{-16}$	$3,56 \cdot 10^{-19}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	$7 \cdot 10^{-16}$	$1,09 \cdot 10^{-18}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	1	$7 \cdot 10^{-16}$	$3,34 \cdot 10^{-18}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	10	$7 \cdot 10^{-16}$	$1,02 \cdot 10^{-17}$

EST	Prévalence nationale	Prévalence intra-troupeau (nbre et %)	Nombre d'animaux	Probabilité qu'au moins une dose vaccinale soit contaminée	DI dans la prise d'essai	Facteur de réduction de la DI	Probabilité d'infecter au moins un animal sensible
Tremblante classique ou atypique	1 10 ⁻⁴	1 Ov/Cp (2%)	50	4 10 ⁻⁸	0,01	10 ⁻¹⁶	6,80 10 ⁻¹⁹
		1 Ov/Cp (2%)	50	4 10 ⁻⁸	0,1	10 ⁻¹⁶	2,08 10 ⁻¹⁸
		1 Ov/Cp (2%)	50	4 10 ⁻⁸	1	10 ⁻¹⁶	6,39 10 ⁻¹⁸
		1 Ov/Cp (2%)	50	4 10 ⁻⁸	10	10 ⁻¹⁶	1,96 10 ⁻¹⁷
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	0,01	7 10 ⁻¹⁶	1,25 10 ⁻¹⁷
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	0,1	7 10 ⁻¹⁶	3,82 10 ⁻¹⁷
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	1	7 10 ⁻¹⁶	1,17 10 ⁻¹⁶
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	10	7 10 ⁻¹⁶	3,59 10 ⁻¹⁶
		2 Ov/Cp (4%)	50	4 10 ⁻⁸	0,01	10 ⁻¹⁶	6,66 10 ⁻¹⁹
		2 Ov/Cp (4%)	50	4 10 ⁻⁸	0,1	10 ⁻¹⁶	2,04 10 ⁻¹⁸
		2 Ov/Cp (4%)	50	4 10 ⁻⁸	1	10 ⁻¹⁶	6,25 10 ⁻¹⁸
		2 Ov/Cp (4%)	50	4 10 ⁻⁸	10	10 ⁻¹⁶	1,92 10 ⁻¹⁷
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	4 10 ⁻⁸	0,01	7 10 ⁻¹⁶	1,19 10 ⁻¹⁷
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	4 10 ⁻⁸	0,1	7 10 ⁻¹⁶	3,64 10 ⁻¹⁷
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	4 10 ⁻⁸	1	7 10 ⁻¹⁶	1,11 10 ⁻¹⁶
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	4 10 ⁻⁸	10	7 10 ⁻¹⁶	3,42 10 ⁻¹⁶

➤ Scénario 4 :

Les experts ont également exploré un quatrième scénario. Dans ce scénario, lors des étapes de repiquage en milieu solide (boîtes de Pétri), le prion reste sous forme d'agrégat(s) associé(s) aux bactéries puis, en milieu de culture liquide (lors de la préparation de la biomasse), il se répartit de façon hétérogène entre les doses vaccinales, à une extrême, la DI peut être distribuée dans une seule dose (idem scénario 1), à l'autre extrême, la DI peut être distribuée de façon homogène dans les toutes les doses vaccinale (idem scénario 3) ; entre les deux extrêmes la DI peut être distribuée de façon homogène dans une partie des doses vaccinales (pour les calculs, ont été choisi 1/3 ou 2/3 des doses). Dans ce scénario les experts ont calculé le nombre d'animaux qui pourraient être infectés par l'utilisation de l'autovaccin préparé.

Dans ce cas, la réduction de la DI par rapport à la DI initiale, contenue dans le prélèvement réalisé sur l'animal malade, est également de 10⁻³ (cf. Annexe 5) et la probabilité que ce scénario se produise est de 4 10⁻⁸.

Pour ce scénario les calculs ont été effectués en faisant varier les paramètres suivants :

- la prévalence intratroupeau (1 animal et 5%) ;
- le nombre d'animaux dans le cheptel (50 ou 350) ;
- la proportion de doses vaccinales contaminées (1/3, 2/3 ou toutes les doses) ;
- la DI dans la prise d'essai, c.à.d. après réduction du facteur 10⁻³, répartie dans le vaccin (0,01 ; 0,1 ; 1 ou 10 DI).

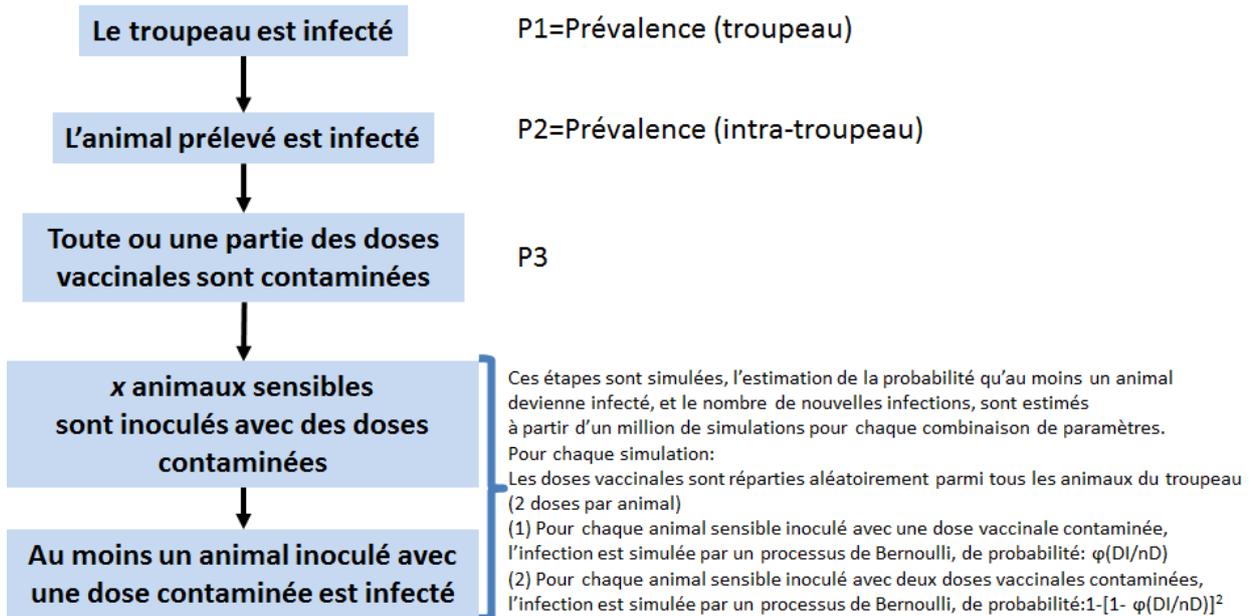


Figure 13 : Schéma illustrant le scénario 4

$P1 = [\text{Prévalence nationale}]/P2^{32}$; $P3 = 4 \cdot 10^{-833}$; DI: dose infectante exprimée en DI_{50} ; nD = nombre de doses contaminées ; $\varphi(x)$: probabilité d'infection pour une dose x (exprimée en DI_{50}) ; $\varphi(x) = \exp(-3,01+1,12 \cdot d)/(1+\exp(-3,01+1,12 \cdot d))$ et $d = \log_{10}(x \cdot 0,15 \cdot 10^{3,5})$ (Konold et al. 2012).

³² La probabilité d'intervenir dans un cheptel infecté (P1) correspond à la prévalence intertroupeau qui est calculée en divisant la prévalence nationale des cas d'EST (résultats des enquêtes en abattoir et à l'équarrissage) par la prévalence intra cheptel (P2).

³³ P3 correspond à la probabilité qu'au cours des repiquages effectués pour l'isolement et l'identification au laboratoire d'analyse, on prélève les bactéries auxquelles la DI contenue dans la prise d'essai est associée (cf. détail du calcul de cette probabilité dans le texte explicatif du scénario 1 (Annexe 5)).

Tableau 12: Calcul de la probabilité d'infecter au moins un animal sensible dans le cas du scénario 4.

EST	Prévalence nationale	Prévalence intra-troupeau (nbre et %)	Nombre d'animaux	Probabilité qu'au moins une dose vaccinale soit contaminée	DI dans la prise d'essai	Proportion de doses vaccinales contaminées	Probabilité d'infecter au moins un animal sensible
ESB	3,00 10 ⁻⁶	1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	0,01	0,33	5,54 10 ⁻¹⁴
		1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	0,01	0,67	7,06 10 ⁻¹⁴
		1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	0,01	1	7,96 10 ⁻¹⁴
		1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	0,1	0,33	1,01 10 ⁻¹³
		1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	0,1	0,67	1,12 10 ⁻¹³
		1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	0,1	1	1,16 10 ⁻¹³
		1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	1	0,33	1,19 10 ⁻¹³
		1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	1	0,67	1,20 10 ⁻¹³
		1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	1	1	1,20 10 ⁻¹³
		1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	10	0,33	1,20 10 ⁻¹³
		1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	10	0,67	1,20 10 ⁻¹³
		1 Bv (2%)	50	4 10 ⁻⁸	10	1	1,20 10 ⁻¹³
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	0,01	0,333	9,85 10 ⁻¹⁴
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	0,01	0,667	1,10 10 ⁻¹³
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	0,01	1	1,14 10 ⁻¹³
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	0,1	0,333	1,19 10 ⁻¹³
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	0,1	0,667	1,20 10 ⁻¹³
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	0,1	1	1,20 10 ⁻¹³
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	1	0,333	1,20 10 ⁻¹³
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	1	0,667	1,20 10 ⁻¹³
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	1	1	1,20 10 ⁻¹³
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	10	0,333	1,20 10 ⁻¹³
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	10	0,667	1,20 10 ⁻¹³
		1 Bv (0,3%)	350	4 10 ⁻⁸	10	1	1,20 10 ⁻¹³
		2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	0,01	0,33	5,46 10 ⁻¹⁴
		2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	0,01	0,67	6,95 10 ⁻¹⁴
		2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	0,01	1	7,85 10 ⁻¹⁴
		2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	0,1	0,33	1,00 10 ⁻¹³
		2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	0,1	0,67	1,11 10 ⁻¹³
		2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	0,1	1	1,15 10 ⁻¹³
		2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	1	0,33	1,19 10 ⁻¹³
		2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	1	0,67	1,20 10 ⁻¹³
2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	1	1	1,20 10 ⁻¹³		
2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	10	0,33	1,20 10 ⁻¹³		
2 Bv (4%)	50	4 10 ⁻⁸	10	0,67	1,20 10 ⁻¹³		

EST	Prévalence nationale	Prévalence intra-troupeau (nbre et %)	Nombre d'animaux	Probabilité qu'au moins une dose vaccinale soit contaminée	DI dans la prise d'essai	Proportion de doses vaccinales contaminées	Probabilité d'infecter au moins un animal sensible
		2 Bv (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	10	1	$1,20 \cdot 10^{-13}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	0,333	$9,66 \cdot 10^{-14}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	0,667	$1,08 \cdot 10^{-13}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	1	$1,13 \cdot 10^{-13}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	0,333	$1,19 \cdot 10^{-13}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	0,667	$1,20 \cdot 10^{-13}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	1	$1,20 \cdot 10^{-13}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	1	0,333	$1,20 \cdot 10^{-13}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	1	0,667	$1,20 \cdot 10^{-13}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	1	1	$1,20 \cdot 10^{-13}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	10	0,333	$1,20 \cdot 10^{-13}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	10	0,667	$1,20 \cdot 10^{-13}$
		18 Bv (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	10	1	$1,20 \cdot 10^{-13}$
Tremblante classique ou atypique	$1 \cdot 10^{-4}$	1 Ov/Cp (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	0,33	$1,85 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	0,67	$2,35 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	1	$2,65 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	0,33	$3,36 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	0,67	$3,73 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	1	$3,86 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	1	0,33	$3,98 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	1	0,67	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	1	1	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	10	0,33	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	10	0,67	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (2%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	10	1	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	0,333	$3,28 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	0,667	$3,66 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	1	$3,80 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	0,333	$3,98 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	0,667	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	1	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	1	0,333	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	1	0,667	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	1	1	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	10	0,333	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		1 Ov/Cp (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	10	0,667	$4,00 \cdot 10^{-12}$
1 Ov/Cp (0,3%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	10	1	$4,00 \cdot 10^{-12}$		
2 Ov/Cp (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	0,33	$1,82 \cdot 10^{-12}$		
2 Ov/Cp (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	0,67	$2,32 \cdot 10^{-12}$		

EST	Prévalence nationale	Prévalence intra-troupeau (nbre et %)	Nombre d'animaux	Probabilité qu'au moins une dose vaccinale soit contaminée	DI dans la prise d'essai	Proportion de doses vaccinales contaminées	Probabilité d'infecter au moins un animal sensible
		2 Ov/Cp (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	1	$2,62 \cdot 10^{-12}$
		2 Ov/Cp (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	0,33	$3,34 \cdot 10^{-12}$
		2 Ov/Cp (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	0,67	$3,71 \cdot 10^{-12}$
		2 Ov/Cp (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	1	$3,84 \cdot 10^{-12}$
		2 Ov/Cp (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	1	0,33	$3,98 \cdot 10^{-12}$
		2 Ov/Cp (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	1	0,67	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		2 Ov/Cp (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	1	1	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		2 Ov/Cp (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	10	0,33	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		2 Ov/Cp (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	10	0,67	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		2 Ov/Cp (4%)	50	$4 \cdot 10^{-8}$	10	1	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	0,333	$3,22 \cdot 10^{-12}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	0,667	$3,61 \cdot 10^{-12}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,01	1	$3,77 \cdot 10^{-12}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	0,333	$3,97 \cdot 10^{-12}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	0,667	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	0,1	1	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	1	0,333	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	1	0,667	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	1	1	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	10	0,333	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	10	0,667	$4,00 \cdot 10^{-12}$
		18 Ov/Cp (5,1%)	350	$4 \cdot 10^{-8}$	10	1	$4,00 \cdot 10^{-12}$

Annexe 7 : Qualificatifs des probabilités pour l'estimation qualitative du risque

Tableau 13 : Valeurs chiffrées proposées pour chaque qualificatif de probabilité et correspondance avec les valeurs ordinales (Afssa 2008b)

Echelle ordinale	Qualitatifs	Borne inférieure	Valeur médiane	Borne supérieure	Ordre de grandeur
0	Nulle	0	0	0	0
1	Quasi-nulle	> 0	1/390 625	1/78 125	1/10 ⁶
2	Minime	1/390 625	1/78 125	1/15 625	1/10 ⁵
3	Extrêmement faible	1/78 125	1/15 625	1/3 125	1/15 000
4	Très faible	1/15 625	1/3 125	1/625	1/3 000
5	Faible	1/3 125	1/625	1/125	1/500
6	Peu élevée	1/625	1/125	1/25	1/100
7	Assez élevée	1/125	1/25	1/5	1/25
8	Elevée	1/25	1/5	1	1/5
9	Très élevée	1/5	1	1	1

Notes





Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr / [@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)

ISBN 979-10-286-0104-1
Dépôt légal : mai 2016 - © Anses Éditions : mai 2016 - Date de publication : mai 2016 - Couverture: Anses, Patrimoine - Crédit photo: Anses