Etudes épidémiologiques de la tremblante atypique ovine

Alexandre Fediavsky

▶ **To cite this version:**

Alexandre Fediavsky. Etudes épidémiologiques de la tremblante atypique ovine. Santé publique et épidémiologie. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2009. Français. NNT : 2009CLF21949 . tel-00725320

HAL Id: tel-00725320
https://theses.hal.science/tel-00725320

Submitted on 27 Aug 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Blaise Pascal **Année 2009**
DU N°1949

Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé
ED N°506

Thèse présentée à l'Université Blaise Pascal

Pour l'obtention du grade de

Docteur d'Université

Spécialité écologie – épidémiologie

Soutenue puliquement le 7 septembre 2009

Par

Alexandre FEDIAEVSKY

Etudes épidémiologiques de la tremblante atypique ovine

Jury

Monsieur DELBAC Frédéric, Professeur, Université Blaise Pascal	Président
Mme COSTAGLIOLA Dominique, Directeure de recherche, INSERM	Rapporteure
M. SAVEY Marc, Directeur de recherche, AFSSA	Rapporteur
M. ROGER François, Directeur Associé d'Unité, CIRAD	Membre
M. CALAVAS Didier, Ingénieur de recherche hors classe, AFSSA Lyon	Directeur de thèse
M. DUCROT Christian, Directeur de recherche, INRA Clermont Theix	Directeur de thèse

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
Laboratoire d'études et de recherches en pathologie bovine et hygiène des viandes
Unité Epidémiologie
31, avenue Tony Garnier,
69394 LYON Cedex 07

Institut National de Recherche Agronomique
Département Santé animale
Unité Epidémiologie Animale UR 346
Centre de recherche de Clermont-Theix
63122 Saint Genès Champanelle

Remerciements

Ma reconnaissance va en premier lieu à Didier Calavas et Christian Ducrot qui m'ont donné l'opportunité de faire cette thèse et qui se sont investis dans mon encadrement, chacun à sa manière. *Merci de votre patience, de vos conseils, de vos réflexions, de votre écoute et pour tout ce que vous m'avez transmis. J'espère que nous continuerons longtemps à collaborer dans le même climat amical…*

Je remercie Dominique Costagliola et Marc Savey qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie Frédéric Delbac et François Roger qui m'ont fait l'honneur d'être examinateurs de cette thèse.

Je remercie René Ecochard et Petter Hopp de s'être véritablement impliqués dans l'animation scientifique du comité de pilotage de cette thèse, *vos conseils ont été précieux*. Je remercie aussi Guillaume Gerbier pour l'intérêt qu'il a porté à ce projet bien que sa vie professionnelle l'ait conduit loin de nos réunions.

Je remercie la DGAl pour son soutien technique et financier et notamment Olivier Faugère, Sophie Bélichon, Ariane Raynal, Patrice Chasset, Anne Van de Wiele, Fabienne Lusetti et Laurent Marguin pour leur assistance tout au long de ce projet.

J'exprime également ma gratitude au personnel de l'ENSV pour son soutien et notamment à Véronique Bellemain, Olivier Faugère, Michel Mas, Bruno Hachler et Ana Gorgette.

Un immense merci à mes compagnons d'R-ance : Eric Morignat, David Abrial, Patrick Gasqui et Myriam Garrido pour le temps qu'ils m'ont accordé, leurs conseils amicaux et leur sens de l'humour.

Je voudrais également exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à faire avancer les choses, le plus souvent dans une bonne ambiance, que ce soit à l'AFSSA, à l'INRA ou ailleurs et dans le désordre : Pauline (*pour tes blagues et ton écoute*), Madame SCOTTO (*Super Corinne Organisée, Totipotente, Truculente et Optimale*), Jean-Luc et Christian, Géraldine (*sincèrement*), Christelle (*désolé pour les chocs thermiques !*), Valérie, Marie-Anne, Carole (*merci pour les conseils alpestres*), Nathalie (*ta doc, ton bureau, …*), Jean-Noël (*un autre regard sur la tremblante atypique*), Anne-Gaëlle, Thierry, Johanne, Zaïd, Mireille, Agnès, Pierre-Yves, Myriame, Céline (*et le pommier magique !*), Mathilde (*bon voyage ou bon courage ?*), Jocelyn (*bon courage aussi*), Jacques (*pour tes idées, bonnes ou mauvaises*), Françoise, Valérie (*now he sleeps*), Anne-Sophie, Michelle, Maud, Nelly (*dommage pour Le Caire*), Gwenaël, Xavier, Sébastien, Séverine (*biiiip*), Elsa, Carole (*toujours zen*), Katayoun, Laurent, Danièle, Jennifer, Claire, Leïla, Elizabeth, Fabien, Giuseppe, Maria, Sue, Stefania, Cristiana, le personnel de Labogena, les agents des DDSV, les éleveurs, et bien sûr les moutons qui ont joué le jeu !

Je remercie mes parents et toute ma famille de m'avoir encouragé et supporté dans tous les sens du terme, *vous êtes formidables*.

Je remercie ma femme et mes enfants pour tout et surtout d'être là, avec leur infaillible amour.

A l'Anatalexor qui laisse cette thèse dans son sillage…

« Why would I bother to do an exaggeratedly precise statistical test when I know that the other sources of error are likely so large ? »
Bradford Hill

Experts et profanes, professionnels et dilettantes […] - tous sont invités à participer au débat et à apporter leur contribution à l'enrichissement de notre culture"

Paul Feyerabend

Avant propos

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une formation complémentaire par la recherche (FCPR). Ce dispositif permet aux cadres du ministère de l'Agriculture (Ingénieur du Génie Rural et des Eaux et Forêts ou Inspecteur de la Santé Publique Vétérinaire dans le cas présent) de s'investir, le temps d'un Master et/ou d'un Doctorat, dans une thématique de recherche stratégique pour l'Etat, permettant également à l'agent d'acquérir un raisonnement scientifique et de tisser des liens avec le monde de la recherche. La réalisation du projet a été soutenue et en grande partie financée par la Direction générale de l'alimentation (DGAl) du ministère de l'Agriculture sans lequel il n'aurait pas été rendu possible.

Dans mon cas, ayant bénéficié d'une dispense de Master, la FCPR a consisté en une période de 3 ans consacrée à la préparation de la thèse. Je considère que le bénéfice de cette FCPR a été triple. Tout d'abord, les domaines de l'épidémiologie animale abordés dans ce travail sont en relation étroite avec une partie des principaux domaines d'exercice des inspecteurs de la santé publique vétérinaire, à savoir la surveillance et le contrôle des maladies animales. Ensuite, les deux laboratoires d'accueil, dirigés par Christian Ducrot, directeur d'unité à l'Institut national de recherche agronomique (INRA) et Didier Calavas, chargé national de mission épidémiologie auprès de la direction scientifique de l'AFSSA et directeur du laboratoire de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) de Lyon, sont reconnus pour leur implication dans la santé publique vétérinaire et m'ont permis de participer à des groupes de travail associés à l'évaluation scientifique de l'AFSSA ou au réseau d'excellence Neuroprion. Enfin, la thématique propre du sujet répond à un enjeu actuel et a permis la production de six articles dans des revues internationales à comité de lecture dont trois sont publiés ou en cours de publication, cinq communications orales en anglais dans des congrès internationaux et quatre articles de vulgarisation (Liste des publications et des communications orales, p. 283).

Sommaire

Introduction **17**

Chapitre 1 : La tremblante atypique ovine : caractéristiques et gestion sanitaire d'une EST méconnue25

1.1. L'origine controversée des EST 25
1.2. La protéine prion, biologie et relation avec l'agent infectieux 28
1.3. Les souches d'EST ovines 31
1.4. Pathologie des souches de tremblante ovine 39
1.5. Diagnostic de la tremblante 46
1.6. Surveillance des EST chez les ovins 54
1.7. Lutte contre la tremblante ovine 64

Chapitre 2 : Détection de la tremblante atypique via la surveillance active 71

2.1. Présentation des études 71
2.2. Analyse du programme de surveillance active des EST chez les petits ruminants en France continentale pour la période 2002-2008 73
2.3. Article 1 : Etude descriptive de la prévalence de la tremblante atypique et de la tremblante classique chez les ovins dans 20 pays européens 97

Chapitre 3 : Etudes des facteurs de risque de la tremblante atypique 131

3.1. Présentation des études 131
3.2. Article 2 : Enquête cas-témoin sur l'origine de la tremblante atypique ovine en France 133
3.3. Matériel et méthodes de l'étude du risque génétique de la tremblante atypique et de la tremblante classique ovines en France (article 3) 151
3.4. Article 3 : étude du risque génétique de la tremblante atypique et de la tremblante classique ovines en France 155

Chapitre 4 : Etudes de l'agrégation des cas de tremblante atypique et de tremblante classique 167

4.1. Présentation des études 167
4.2. Matériel et méthodes de l'étude de la distribution spatiale de la tremblante atypique et de la tremblante classique ovine en France (article 4) 171
4.3. Article 4 : Distribution spatiale de la tremblante atypique et de la tremblante classique ovines en France 179
4.4. Matériel et méthodes de l'étude des prévalences de tremblante dans les troupeaux ovins français soumis à des mesures de contrôle des EST (article 5) 195
4.5. Article 5 : Etude des prévalences de tremblante dans les troupeaux ovins français soumis à des mesures de contrôle des EST 199
4.6. Article 6 : Etude européenne de la prévalence de cas index et de cas secondaires de tremblante atypique ovine 207

Chapitre 5 : Discussion générale 229

5.1. La tremblante atypique, une maladie sporadique ? 229
5.2. La tremblante atypique, une maladie endogène ? 231
5.3. Limites des études entreprises 235
5.4. Quelle gestion du risque de tremblante atypique ? 242

Conclusion **247**

Liste des abréviations **249**

Références bibliographiques **251**

Annexes **283**

Liste des publications et des communications orales 283
Tremblante atypique acquis et interrogations 285
Chemin vers une caractérisation, tableau épidémiologique et contrôle 291
Surveillance et prévalence des EST chez les petits ruminants 299
Prévalence des formes classique et atypique de tremblante chez les petits ruminants en France entre 2002 et 2006 303
Fichier additionnel de l'article 1 : détails des prévalences de tremblante atypique et de tremblante classique estimées dans les différents pays européens 313
Questionnaire de l'enquête cas-témoins 327

Liste des tableaux

Tableau 1 : Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles : espèces cibles et origine principale . 19
Tableau 2 : Critères de classification des souches d'EST chez les petits ruminants 35
Tableau 3 : Rapport d'évaluation des tests rapides 53
Tableau 4 : Taux de sondage des animaux testés en application de la police sanitaire 67
Tableau 5 : Fréquences alléliques des principales races françaises en 1999 69
Tableau 6 : Algorithme de calcul de l'âge en fonction de la dentition 73
Tableau 7: Effectifs des ovins testés en surveillance active entre 2002 et 2008 75
Tableau 8: Utilisation des tests rapides par les LDA en surveillance active (2002-2008) 79
Tableau 9 : Nombre d'ovins négatifs génotypés par année et par plan de surveillance 81
Tableau 10 : Distribution des fréquences alléliques ARR, ARQ, AHQ et VRQ par année et par programme chez les ovins négatifs. 81
Tableau 11 : Répartition des fréquences alléliques par race (période 2002 à 2006, programmes abattoir et équarrissage confondus). 85
Tableau 12 : Prévalence et intervalle de confiance à 95% de la tremblante atypique et de la tremblante classique ovine détectées par la surveillance active en France entre 2002 et 2008 86
Tableau 13 : Tests used in sheep TSE active surveillance between 2001 and 2006.. 126
Tableau 14 : Variability of AS and CS detection with surveillance stream (reference is healthy slaughter) and year of surveillance 127
Tableau 15 : Comparison of detection of AS and CS in active surveillance in fallen stock and in healthy slaughter. OR is defined as chances to detect AS versus chances to detect CS. 127
Tableau 16 : Probability to detect zero case of AS depending on the sensitivity of the test and the number of tests for Estonia and Lithuania 128
Tableau 17 : Number and frequency (%) of allele carriers among 1258 AS and CS cases detected between 2002 and 2006 in healthy slaughter and fallen stock in 18 EU countries. 128
Tableau 18 : List of acknowledge people and affiliated institutions 128
Tableau 19 : Reference year 130
Tableau 20 : Genotypes grouped by levels of genetic risk for atypical scrapie in sheep, France ... 143
Tableau 21 : Univariate analyses of farm structure variables conditional to C0 for atypical scrapie in sheep, France 144
Tableau 22 : Univariate analyses of contact with sheep from other flocks and afterbirth exposure variables conditional to C0 for atypical scrapie in sheep, France 145
Tableau 23 : Univariate analyses of feeding component variables during the specified period and conditional to C0 for atypical scrapie in sheep, France 146
Tableau 24 : Univariate analyses of exposure to toxic products variables during the specified period and conditional to C0 for atypical scrapie in sheep, France 147
Tableau 25 : Multivariate analyses coefficient parameters of the final model for atypical scrapie in sheep, France 147
Tableau 26 : Adjusted odds ratios of atypical scrapie associated with variables computed from the final model in sheep, France 147
Tableau 27 : Multivariate analysis including genetic risk from multiple imputation parameters for atypical scrapie in sheep, France 148

Tableau 28 : Sample sizes, estimated OR for AS and CS according to genotypes and covariates and their 95% confidence intervals (CI95%), estimates of prevalence of AS per genotype and 95% credibility intervals (ci 95%) 163
Tableau 29 : Estimated OR for AS and CS according to allele carriers and covariates and their 95% confidence intervals (CI95%) 164
Tableau 30 : Characteristics of the AS and CS clusters and of baseline population detected by active surveillance programme between 2003 and 2007 in mainland France.. 189
Tableau 31 : Prevalence per type of scrapie and origin of sheep tested in France, together with 95% binomial confidence intervals, for the period 2002-2007..... 202
Tableau 32 : Groups of detection of atypical scrapie according to rapid tests and material usually analysed (according to EFSA 2005) 220
Tableau 33 : Grouped control strategies reported by countries..... 221
Tableau 34 : Prevalence of atypical scrapie (AS) in active surveillance from starting year for detection of AS in active surveillance to 2007..... 222
Tableau 35 : Prevalences of secondary atypical scrapie (AS) cases by control strategy and country from flocks in which the first scrapie animal had either AS or classical scrapie (CS)..... 223
Tableau 36 : Prevalence of secondary classical scrapie (CS) cases by control strategy and country from flocks in which the first scrapie animal had either atypical scrapie (AS) or CS. 224

Liste des figures

Figure 1 : Structure primaire de la protéine PrP^{C} humaine 28
Figure 2 : Modèles de conformation de la PrP^{C} et de la PrP^{Sc} 29
Figure 3 : Courbe de survie de type Kaplan-Meier des animaux morts de tremblante dans une étude de cohorte de six troupeaux de race Manech tête rousse 40
Figure 4 : Distribution de l'âge des cas de tremblante détectés par la surveillance active en 2005 dans l'Union Européenne 41
Figure 5 : Prélèvements de cerveau et positivité à la tremblante atypique et classique 48
Figure 6 : Profil électrophorétique de PrP^{Sc} résolu par WesterBlot 50
Figure 7 : Population ovine européenne en 2005 54
Figure 8 : Population ovine française en 2005 d'après Agreste 55
Figure 9 : Distribution de l'âge à la dernière mise bas dans un troupeau allaitant en région PACA de 1977 à 1989 57
Figure 10: Distribution mondiale de la tremblante (classique) en 1969 58
Figure 11 : Distribution de cas de tremblante clinique rapportés en France entre 1968 et 1979 59
Figure 12 : Distribution de la tremblante (classique) en France entre 1997 et 2001 60
Figure 13 : Organisation de la surveillance active des EST 62
Figure 14 : Evolution mensuelle du nombre d'ovins testés entre 2002 et 2007 76
Figure 15 : Distribution du nombre d'ovins testés par exploitation 77
Figure 16 : Taux de sondage des ovins à l'abattoir. 78
Figure 17 : Taux de sondage des ovins à l'équarrissage. 78
Figure 18 : Evolution de la proportion de tests recommandés pour la détection de la tremblante atypique à partir du tronc cérébral 79
Figure 19 : Proportions de tests BioRad et Idexx (en %) à l'abattoir entre 2002 et 2005 80
Figure 20 : Proportions de tests BioRad et Idexx (en %) à l'abattoir entre 2006 et 2007 80
Figure 21 : Proportions de tests BioRad et Idexx (en %) à l'équarrissage entre 2002 et 2005 80
Figure 22 : Proportions de tests BioRad et Idexx (en %) à l'équarrissage entre 2005 et 2007 80
Figure 23 : Taux de génotypage des animaux dépistés pour la recherche d'EST. 82
Figure 24 : Distribution de la fréquence de l'allèle ARR chez les ovins négatifs. 83
Figure 25 : Distribution de la fréquence de l'allèle ARQ chez les ovins négatifs. 83
Figure 26 : Distribution de la fréquence de l'allèle AHQ chez les ovins négatifs. 84
Figure 27 : Distribution de la fréquence de l'allèle VRQ chez les ovins négatifs. 84
Figure 28 : Prévalence (en ‰) et intervalle de confiance à 95% de la tremblante atypique ovine entre 2002 et 2008 86
Figure 29 : Prévalence (en ‰) et intervalle de confiance à 95% de la tremblante classique ovine entre 2002 et 2008 87
Figure 30 : Distribution mensuelle de la proportion d'animaux testés dans les différentes classes de dentition à l'abattoir et à l'équarrissage entre 2002 et 2007 88
Figure 31 : Prévalence de la tremblante atypique en fonction de la dentition et du canal de surveillance pour la période 2002-2007 et IC 95% 89
Figure 32 : Prévalence de la tremblante classique en fonction de la dentition et du canal de surveillance pour la période 2002-2007 et IC 95% 89
Figure 33 : Distribution de l'âge des cas de tremblante atypique par génotype 91
Figure 34 : Distribution de l'âge des cas de tremblante classique par génotype 92

Figure 35: Quantity of samples examined by tests A, F and G 117
Figure 36: Cases detected in sheep in active surveillance. 118
Figure 37: Reported AS cases by test. 118
Figure 38: Sheep CSPE (‰) in healthy slaughter surveillance 119
Figure 39: Sheep CSPE (‰) in fallen stock surveillance 120
Figure 40: Sheep CSPE (‰) in fallen stock surveillance in Slovenia 121
Figure 41: Sheep TSEs prevalence (‰) in active surveillance in Cyprus 121
Figure 42: Sheep ASPE (‰) in healthy slaughter surveillance 122
Figure 43: Sheep ASPE (‰),in fallen stock surveillance 123
Figure 44: Age distribution of AS and CS cases according to stream of surveillance (in %) 124
Figure 45: Genotype distribution of AS and CS cases 125
Figure 46 : Distribution of cases of atypical scrapie and controls (no. cases/no. controls) in sheep, France, 2007 148
Figure 47: Distribution of C0 for cases of atypical scrapie and controls in sheep, France, 1994–2005. 149
Figure 48: Distribution of control weightings 150
Figure 49: Probability for a 100% ALRR-ALRR flock to have at least one AS case detected according to the number of animals tested. 165
Figure 50 : Nombre de cas de tremblante atypique (à gauche) et de tremblante classique (à droite) par unité géographique 174
Figure 51 : Nombre de tests pour la détection de la tremblante atypique (à gauche) et de la tremblante classique (à droite) par unité géographique 175
Figure 52: Risque relatif brut de tremblante atypique (à gauche) et de tremblante classique (à droite) par unité géographique 175
Figure 53 : Hétérogénéité géographique de l'importance relative de la surveillance à l'abattoir entre 2003 et 2007 177
Figure 54 : Hétérogénéité géographique de l'importance relative de la classe d'âge la plus avancée (8 DI) entre 2003 et 2007 178
Figure 55: Map of France displaying the main areas referred to in the text and the main cities .. 190
Figure 56: Distribution of AS cases, density of tests for AS in number per grid of 2x2km and significant clusters of AS (all p-values<0.01) detected by active surveillance programme between 2003 and 2007 in mainland France. 191
Figure 57: Distribution of CS cases, density of tests for CS in number per grid of 2x2km and significant clusters of CS (all p-values<0.01) detected by active surveillance programme between 2003 and 2007 in mainland France. 192
Figure 58: Smoothed relative risk of AS detected by active surveillance in mainland France between 2003 and 2007 193
Figure 59: Smoothed relative risk of CS detected by active surveillance in mainland France between 2003 and 2007 194
Figure 60 : Prevalence per type of scrapie and origin of sheep tested in France, together with 95% binomial confidence intervals, for the period 2002-2007 203
Figure 61 : Distributions of the prevalence of secondary cases in AS outbreaks (bold blue line) and in CS outbreaks (thin red line). 204
Figure 62 : Density of probability of the distribution, for 10,000 simulations, of the number of outbreaks with 1 or more secondary cases 205

Figure 63: Forest plot for the probability of atypical scrapie (AS) secondary cases in AS positive flocks versus active surveillance in healthy slaughtered animals. 225
Figure 64: Forest plot for the probability of atypical scrapie (AS) secondary cases in AS positive flocks versus active surveillance in fallen stock animals. 225
Figure 65: Forest plot for the probability of atypical scrapie (AS) secondary cases in AS positive flocks versus secondary AS cases in classical scrapie (CS) positive flocks. 226
Figure 66: Forest plot for the probability of atypical scrapie (AS) secondary cases in classical scrapie (CS) positive flocks versus active surveillance in healthy slaughtered animals. 226
Figure 67: Forest plot for the probability of atypical scrapie (AS) secondary cases in classical scrapie (CS) positive flocks versus active surveillance in fallen stock animals. 227

Introduction

L'étude des maladies à prion…

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST), aussi appelées 'maladies à prion', constituent un groupe de maladies neurodégénératives qui affectent de nombreux mammifères, dont l'homme (Tableau 1). La première description d'EST remonterait à la tremblante du mouton, au Royaume-Uni en 1772 (Comber and Morborne, 1772) ; chez l'homme, la maladie de Creutzfeldt Jakob (MCJ) fut décrite en 1921. Les connaissances sur la physiopathologie de ces maladies ne se sont vraiment développées que pendant la deuxième moitié du XXème siècle (Poser, 2002a; Poser, 2002b).

Les EST ont une période d'incubation souvent longue par rapport à la durée de vie de l'espèce concernée. L'évolution clinique est généralement subaiguë (d'où la dénomination parfois rencontrée d'encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles – ESST, que je n'utiliserai pas par la suite) et consiste en diverses manifestations neurologiques d'intensité croissante ; l'issue est toujours fatale. Chez l'homme, les EST sont des maladies rares, dont l'incidence annuelle est de l'ordre de quelques cas par million, mais largement réparties dans le monde (De Pedro-Cuesta, Glatzel et al., 2006). Chez les animaux, les prévalences sont généralement faibles mais des flambées épizootiques ont également été décrites comme pour la maladie du dépérissement chronique des cervidés (CWD) et, dans une moindre mesure, la tremblante classique (revu par Doherr, 2007) ou anazootique dans le cas de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ou maladie de la « vache folle ».

Les EST se caractérisent par des lésions histologiques localisées principalement dans le système nerveux central (SNC) et qui incluent, avec une intensité variable selon les formes, une vacuolisation spongiforme des neurones, une mort neuronale, la prolifération de cellules astrocytaires et gliales (gliose) et parfois des plaques amyloïdes. Aucune séroconversion n'est décelée au cours du développement des EST. Par contre, il y a conversion de la protéine prion cellulaire, PrP^{C}, en un isoforme pathologique, PrP^{Sc}, qui s'accumule. L'accumulation de PrP^{Sc} est détectable au microscope électronique sous forme de fibrilles appelées 'scrapie associated fibrils' (SAF). Le produit de dégradation de la PrP^{Sc} par la protéinase K (PK), désigné PrP-res, peut être mis en évidence par différentes techniques biochimiques ou immunohistochimiques, la principale étant le Western Blot. La PrP-res est un marqueur spécifique des EST (Bolton, McKinley et al., 1982).

Les EST présentent des similitudes avec d'autres maladies neurodégénératives beaucoup plus fréquentes et associant l'accumulation anormale d'une protéine comme pour la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Caughey and Baron, 2006). La différence essentielle est que ces deux maladies ne semblent pas transmissibles (Gajdusek, 1977; Brown, Salazar et al., 1982; Caughey and Baron, 2006) même si dernièrement il a été montré qu'une certaine forme d'infectiosité pourrait exister dans la maladie d'Alzheimer (Meyer-Luehmann, Coomaraswamy et al., 2006; Riek, 2006). Le caractère transmissible des EST se démontre expérimentalement par inoculation intracérébrale à des espèces sensibles souvent choisies pour leur durée d'incubation courte par rapport à l'espèce hôte, principalement des rongeurs, et dont la réceptivité peut être améliorée par génie génétique (revu par Telling, 2008). La nature de l'agent infectieux, qualifié d'agent transmissible non conventionnel (ATNC), a fait l'objet de nombreuses controverses et sera évoquée ultérieurement. On distingue de façon consensuelle trois types d'EST chez l'homme (Tableau 1) :

i) des formes familiales ou génétiques pour le syndrome de Gertsmann-Straüssler-Scheinker (GSS) (Baker, Ridley et al., 1985; Hsiao, Baker et al., 1989), le variant familial de CJD

(fCJD)(Masters, Gajdusek et al., 1981), et l'insomnie familiale fatale (FFI) (Medori, Montagna et al., 1992) ;

ii) des formes acquises par exposition infectieuse soit de façon iatrogène pour la maladie de Creutzfeldt Jakob iatrogène (iCJD) notamment à travers des greffes de dure mère (Duffy, Wolf et al., 1974; Bernouilli, Siegfried et al., 1977) ou l'utilisation d'hormones de croissance extractive (Brown, Gajdusek et al., 1985) soit par l'alimentation pour le kuru (Gajdusek, 1977);

iii) des formes sporadiques comme la maladie de Creutzfeldt Jakob sporadique (sCJD), qui est la forme majoritaire (85%) et dont l'origine reste indéterminée (Masters, Harris et al., 1979; Baker, Ridley et al., 1985).

Les EST présentent une importante diversité phénotypique et se distinguent notamment par l'aspect et la localisation des lésions, les signes cliniques, la durée d'incubation et le spectre d'hôtes. Au sein des différentes EST, des souches, dont la définition biologique reste floue, sont différenciées notamment par le profil lésionnel, la durée d'incubation et le profil biochimique de la PrP-res (revus par Hill and Collinge, 2004 ; Collinge and Clarke, 2007). La faculté des différentes souches à être transmises plus ou moins facilement à différentes espèces correspond à la notion de barrière d'espèce (revu par Béringue, Vilotte et al., 2008). A l'occasion du franchissement de barrière d'espèce, de nouveaux phénotypes peuvent apparaître.

…Marquée par la crise de la vache folle…

Ainsi, il a été suggéré que l'agent de l'ESB provenait du passage de la tremblante aux bovins (Wells, Scott et al., 1987 ; Wilesmith, Wells et al., 1988). L'ESB a émergé en 1985 au Royaume-Uni sous forme d'une épizootie (Wells, Scott et al., 1987; Wilesmith, Wells et al., 1988). Il a rapidement été montré que la diffusion de la maladie était liée à la consommation par les bovins de farines de viande et d'os (FVO) contaminées ; cela ayant été rendu possible par les modifications des traitements thermiques et chimiques intervenant dans la production de ces farines autorisant le recyclage de l'agent infectieux de la tremblante ou de l'agent d'une EST bovine non identifiée jusqu'alors (Wilesmith, Ryan et al., 1991; Wilesmith, Ryan et al., 1992).

Dès 1998, le Royaume-Uni prit des mesures visant à interdire l'utilisation des aliments contenant des protéines de ruminants, hormis le lait, pour l'alimentation des ruminants (Bradley and Wilesmith, 1993). Les effets de ces mesures furent perçus après un délai de 4-5 ans, correspondant grossièrement au temps d'incubation chez les bovins (Hoinville, 1994). Cependant, plus de 10 000 cas apparurent chez des animaux nés après l'interdiction des farines animales (cas NAIF), ce qui posa question sur l'origine de leur contamination. Il fut montré que la transmission horizontale de l'ESB chez les bovins était nulle à négligeable (Hoinville, Wilesmith et al., 1995) et que la transmission verticale de l'ESB était possible mais très limitée (Hoinville, Wilesmith et al., 1995 ; Donnelly, Ferguson et al., 1997 ; Wilesmith, Wells et al., 1997). Corollairement, il fut montré que les cas NAIF avaient été vraisemblablement infectés par des aliments produits avant l'interdiction des farines de ruminants ou par contamination croisée via des farines dédiées aux monogastriques (Hoinville, Wilesmith et al., 1995). En 1990, l'interdiction des FVO d'origine bovine avait été étendue à toutes les espèces afin d'éviter l'exposition des porcs, espèce réceptive par inoculation intracérébrale (Dawson, Wells et al., 1990; Ryder, Hawkins et al., 2000) mais peu par voie orale (Wells, Hawkins et al., 2003). Cette mesure eut pour principal effet de limiter la contamination croisée, accidentelle ou pas, d'aliments destinés aux ruminants par des aliments contaminés destinés aux animaux monogastriques (Bradley and Wilesmith, 1993 ; Wilesmith, 1996; Stevenson, Wilesmith et al., 2000 ; Stevenson, Morris et al., 2005). Elle fut renforcée en 1996 par une interdiction complète des FVO contenant des protéines issues de mammifères.

Tableau 1 : Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles : espèces cibles et origine principale d'après (Prusiner, 1998) et (Hopp, 2007) modifiés

Maladie ***nom anglais (acronyme)***	**Principales espèces atteintes (hors conditions expérimentales) (*nom scientifique*)**	**Origine principale**	**Première description**
Tremblante *Scrapie*	Mouton (*Ovis aries*) Chèvre (*Capra hircus*) Mouflon (*Ovis aries musimon*)	Contagieuse	(Comber and Morborne, 1772)
Creutzfeldt-Jakob sporadique *Sporadic Creutzfeldt-Jakob* (sCJD)	Homme (*Homo sapiens)*	Inconnue – spontanée ?	Jakob, 1921, reviewed by (Prusiner, 1993)
Gertsmann-Straüssler-Scheinker (GSS)	Homme (*Homo sapiens)*	Héréditaire	Gerstmann , 1936, reviewed by (Prusiner, 1993)
Kuru	Homme (*Homo sapiens)*	Alimentaire (cannibalisme en Papouasie Nouvelle-Guinée)	(Gajdusek and Zigas, 1957)
Encéphalopathie spongiforme du vison *Mink transmissible encephalopathy* (TME)	Vison d'Amérique (*Neovison vison*)	Alimentaire	(Hartsough and Burger, 1965)
Creutzfeldt-Jakob iatrogène *Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob* (iCJD)	Homme (*Homo sapiens)*	Iatrogène	(Duffy, Wolf et al., 1974)
Creutzfeldt-Jakob familial *Genetic or familial Creutzfeldt-Jakob (gCJD, fCJD)*	Homme (*Homo sapiens)*	Héréditaire	(Rosenthal, Keesey et al., 1976)
Maladie du dépérissement chronique des cervidés *Chronic wasting disease* (CWD)	Cerf mulet (*Odocoileus hemionus hemionus*) Cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) Cerf de Colombie (*Odocoileus hemionus columbianus*) Wapiti (*Cervus elaphus nelsoni*) Orignal (*Alces americanus*)	Contagieuse	(Williams and Young, 1980)

Insomnie Fatale Familiale *Fatal familial insomnia (FFI)*	Homme (*Homo sapiens)*	Héréditaire	(Lugaresi, Medori et al., 1986)
Encéphalopathie spongiforme bovine *Bovine Spongiform Encephalopathy* (BSE)	Bovin (*Bos taurus taurus*) Nyala (*Tragelaphus angasii*) Gemsbok (*Oryx gazella*) Oryx d'Arabie (*Oryx leucoryx*) Eland (*Taurotragus oryx*) Watusi (*Bos primigenius taurus)* Grand kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) *Oryx* blanc *(Oryx dammah)* Bison (*Bison bison*) Chèvre (*Capra hircus*) Zébu (*Bos taurus indicus*)	Alimentaire (farines animales)	(Wells, Scott et al., 1987)
Encéphalopathie spongiforme féline *Feline spongiform encephalopathy* (FSE)	Chat (*Felis catus*) Puma (*Puma concolor*) Guépard (*Acinonyx jubatus*) Chat de Temminck (C*atopuma temminckii*) Ocelot (*Leopardus pardalis*) Tigre (*Panthera tigris*) Lion (*Panthera leo*) Leopard (*Prionailurus bengalensis*)	Alimentaire (agent de l'ESB)	(Wyatt, Pearson et al., 1990)
Variant de Creutzfeldt-Jakob *Variant Creutzfeldt-Jakob* (vCJD)	Homme (*Homo sapiens)*	Alimentaire (agent de l'ESB)	(Will, Ironside et al., 1996)
Tremblante atypique incluant Nor98 *Atypical scrapie (AS)*	Mouton (*Ovis aries*) Chèvre (*Capra hircus*)	Inconnue – spontanée ?	(Benestad, Sarradin et al., 2003)
Encéphalopathies spongiforme bovine atypique formes H et L *Bovine atypical spongiform encephalopathy (BASE)*	Bovin (*Bos taurus taurus*)	Inconnue – spontanée ?	(Biacabe, Laplanche et al., 2004)

Avec un certain décalage par rapport au Royaume-Uni, de nombreux autres pays européens furent touchés par l'épizootie d'ESB, principalement du fait de l'importation de FVO britannique qui n'a cessé en Europe que courant 1990 (Schreuder, Wilesmith et al., 1997). A partir de 1990, la maladie fit l'objet d'une réglementation communautaire (Decision 90/134/EEC). En France, des mesures réglementaires et un réseau de surveillance clinique furent mis en place à partir de 1990, avec l'inscription de l'ESB à la liste des maladies réputées contagieuses (MRC) (Arrêté, du 3 décembre 1990; Décret, du 13 juin 1990) et l'interdiction de l'utilisation de certaines protéines issues de bovins pour l'alimentation des bovins (Arrêté, du 24 juillet 1990). Les premiers cas furent détectés en 1991 et étaient localisés dans le grand Ouest (Savey, Belli et al., 1991). En France, l'interdiction des FVO en vigueur pour les bovins fut étendue à l'ensemble des ruminants en 1994 (Arrêté, du 20 décembre 1994) suivant une décision communautaire, renforcée à partir de juin 1996 par une série de mesures visants à sécuriser les FVO (Arrêté, du 8 juillet 1996 ; Arrêté, du 13 juin 1996). En 2000, il fut finalement décidé de suspendre complètement l'utilisation des FVO pour toutes les espèces de rente au niveau européen (Arrêté, du 14 novembre 2000), ces mesures ont été pleinement effectives à partir de 2001.

L'agent de l'ESB s'avéra capable d'infecter de nombreuses espèces animales (Tableau 1). Lorsqu'en 1996, le lien entre l'agent de l'ESB et un variant de la maladie de Creutzfeldt Jakob (vCJD) chez l'homme fut établi (Will, Ironside et al., 1996 ; Bruce, Will et al., 1997), l'ESB devint un enjeu majeur de santé publique. Des mesures avaient déjà été prises pour éviter l'exposition du consommateur en retirant de la chaîne alimentaire un certain nombre de tissus infectieux : les matériaux à risques spécifiés (MRS), ou susceptibles de l'être, provenant de carcasses de bovins et de petits ruminants (Arrêté, du 17 mars 1992). Un embargo sur la viande bovine fut également mis en place en France en 1990 (dont le maintien ajouta ultérieurement une dimension politique à la crise) puis au niveau communautaire en 1996. Au Royaume-Uni, le retrait pur et simple de la consommation des bovins de plus de trente mois fut décidé en 1996. Ces mesures ont permis de réduire très fortement l'exposition de l'homme, de l'animal et de l'environnement à l'agent infectieux responsable de l'ESB. Cependant, l'incertitude sur les conséquences épidémiologiques humaines (Ghani, Ferguson et al., 1998a; Ghani, Ferguson et al., 1998b) conduisit à une importante crise sociétale, politique et médiatique. Les mesures prises n'étaient pas en mesure de calmer les esprits puisque la longue période d'incubation de la maladie (ESB et vCJD) en différait les effets et que des cas continuaient à être détectés et ce d'autant plus que la surveillance s'était intensifiée. Différentes mesures furent prises pour rassurer les consommateurs comme l'abattage total des troupeaux infectés, la traçabilité accrue de la viande et des animaux, l'extension de la liste des MRS, l'interdiction totale des FVO.

Le développement de tests rapides de diagnostic de l'ESB a permis la mise en place de programmes de surveillance des EST animales à large échelle. Deux études, la première réalisée en 1999 en Suisse chez les bovins et la seconde menée en 2000 dans le grand Ouest en France, ont contribué à montrer la sous-estimation liée à la surveillance passive et la faisabilité de dépistage à grande échelle (Doherr, Oesch et al., 1999 ; Calavas, Ducrot et al., 2001). A partir de juillet 2001, un dépistage systématique a été mis en place au niveau communautaire chez les bovins de plus de 30 mois abattus, trouvés morts ou euthanasiés (European Commission, 2001) afin d'évaluer la prévalence de l'ESB, notamment pour conduire des analyses de risque. Ceci n'était pas une mesure de protection du consommateur mais contribuait toutefois à le rassurer (Scientific Steering Committee, 2001).

…Y compris chez les petits ruminants…

Parallèlement à la crise de l'ESB bovine, la menace d'une crise de l'ESB des petits ruminants se précisait. Dès 1993, la transmissibilité de l'ESB aux ovins par voie orale et intracérébrale fut démontrée expérimentalement (Foster, Hope et al., 1993). Progressivement, on a mis en évidence l'infectiosité des tissus périphériques après infection orale d'ovins par l'agent de l'ESB (Foster, Bruce et al., 1996 ; Foster, Parnham et al., 2001b). Cette diffusion large de l'infectiosité laissait craindre la possibilité d'une contagiosité de l'ESB chez les petits ruminants, à l'image de celle connue pour la tremblante (classique).

Entre le milieu des années 1980 et le milieu des années 1990, l'exposition des ovins à des FVO contaminées par l'agent de l'ESB est indéniable, mais en quantités largement inférieure à celle des bovins, la dose infectieuse pouvant de plus être supérieure du fait de la barrière d'espèce (Baylis, Houston et al., 2002). Différents modèles montrèrent la gravité potentielle pour l'homme d'une infection des petits ruminants par l'l'ESB en fonction de différentes hypothèses sur la transmissibilité naturelle de la maladie (Ferguson, Ghani et al., 2002; Kao, Gravenor et al., 2002). Des mesures de surveillance et de contrôle de la tremblante furent mises en place pour les petits ruminants dans les années 1990. Ces mesures reposaient sur trois volets : l'organisation d'une surveillance des EST chez les petits ruminants, l'éradication des foyers et la sélection génétique de la résistance à la tremblante chez les ovins, cette résistance ayant potentiellement un effet vis-à-vis de l'ESB (Hunter, 1997; Baylis, 2002).

La différenciation entre l'ESB et les autres souches d'EST chez les petits ruminants posait un réel problème en raison de la ressemblance des signes cliniques et des lésions histologiques et de l'incertitude sur l'aspect que prendrait l'ESB chez les petits ruminants après transmission naturelle (Butler, 1998; Foster, Parnham et al., 2001b). Le développement de techniques de typage de souches permit d'étudier de nombreux isolats d'EST en vue d'un diagnostic différentiel. Après une fausse alerte donnée au Royaume-Uni en 2001 (Balter, 2002), un cas d'EST détecté chez une chèvre en France en 2002 fut confirmé comme non distinguable de l'ESB en 2005, après la réalisation de l'ensemble des tests de discrimination possibles (Eloit, Adjou et al., 2005). Un résultat semblable à propos d'une chèvre détectée en 1990 en Ecosse (Dustan, Spencer et al., 2008) a été récemment confirmé (Thierry Baron, communication personnelle). D'autres isolats douteux détectés chez des ovins furent détectés et finalement rapprochés d'une souche particulière de tremblante, CH1641 (Baron and Biacabe, 2001; Jeffrey, González et al., 2006).

…A permis la découverte de la tremblante atypique…

A l'occasion des nombreuses analyses d'isolats d'EST réalisées chez les petits ruminants, une forme atypique de tremblante ovine, baptisée Nor98, a été détectée en 1998 en Norvège (Benestad, Sarradin et al., 2003). Cette forme présentait des particularités lésionnelles et moléculaires rendant le diagnostic difficile. Elle apparaissait sur des animaux âgés et génétiquement résistants à la forme classique. Les animaux appartenaient à des élevages sans relations épidémiologiques apparentes. Ses caractéristiques la rapprochaient du GSS chez l'homme dont l'origine est supposée non infectieuse. Des formes semblables furent détectées chez les ovins et les caprins dans de nombreux pays européens : en Belgique (De Bosschere, Roels et al., 2004), en France et en Allemagne (Buschmann, Biacabe et al., 2004; Buschmann, Lühken et al., 2004), en Irlande (Onnasch, Gunn et al., 2004), au Portugal (Orge, Galo et al., 2004), en Suède (Gavier-Widen, Nöremark et al., 2004),

en Espagne (Geijo MV., Garrido JM. et al., 2005), aux Falklands (Epstein, Pointing et al., 2005), en Grande Bretagne (Everest, Thorne et al., 2006 ; Konold, Davis et al., 2006) y compris en Ecosse (Dagleish, Rodger et al., 2008) et en Suisse (Nentwig, Oevermann et al., 2007 ; Seuberlich, Botteron et al., 2007). Ces formes étaient parfois qualifiées d'isolats discordants en référence aux résultats positifs ou négatifs obtenus selon les tests diagnostiques employés. La transmissibilité de la tremblante atypique fut effectivement démontrée chez la souris en 2005 (Le Dur, Béringue et al., 2005). Cependant, l'apparente rareté des cas secondaires dans les troupeaux atteints et la localisation de la PrP^{Sc}, suggéraient une maladie non contagieuse. En 2005, l'Agence européenne de sécurité alimentaire (AESA) classifia l'ensemble de ces formes sous la dénomination de tremblante atypique (EFSA, 2005) qui se distinguait de la forme classique de tremblante et de l'ESB ovine. En France, un peu plus de 400 cas furent ainsi détectés entre 2002 et 2007.

…Qui a soulevé de nouvelles questions…

La découverte de la tremblante atypique mettait en question la pertinence des programmes de lutte génétique contre la tremblante (Baylis and McIntyre, 2004). Au-delà, cette souche posait les questions de son étiologie, de sa physiopathologie, de sa fréquence, de sa contagiosité en conditions naturelles et de son éventuelle dangerosité pour l'homme.

Un projet de recherche (TREMBLATYPIC, ANR-05-PNRA-006) fut lancé en France dans le cadre du groupement d'intérêt scientifique « GIS prion » afin d'étudier la physiopathologie, le franchissement de la barrière d'espèce, la susceptibilité génétique et les méthodes diagnostiques. Le volet épidémiologique de ce projet fut écarté par le GIS prion.

L'objectif de la thèse, débutée en 2006, soit un an après la publication de la classification de l'AESA, était d'explorer les caractéristiques épidémiologiques de la tremblante atypique chez les ovins en France. Les caprins ont été exclus du champ d'étude en raison de l'encore plus grande rareté de la tremblante atypique chez ces animaux : seulement 14 cas détectés entre 2002 et 2007, ce qui limitait considérablement les possibilités de les étudier spécifiquement. Par ailleurs, les différences physiopathologiques en matière de tremblante classique et les spécificités zootechniques interdisent de les grouper avec les ovins. L'étude se limite à la France continentale en raison d'une moins bonne qualité des données provenant de Corse et dans les départements et territoires d'Outre-mer, notamment en termes de surveillance.

De nombreuses contraintes pèsent sur l'étude épidémiologique de la tremblante atypique : difficulté diagnostique, rareté de la maladie, durée d'incubation inconnue mais a priori longue, étiologie et physiopathologie inconnue, traçabilité et informations démographiques des espèces concernées médiocres, inadaptation des mesures de surveillance et de contrôle. L'enjeu de la thèse était la production de connaissances sur la tremblante atypique et l'acquisition d'outils épidémiologiques sans nécessairement de développement méthodologique. Par conséquent, nous avons cherché à diversifier les approches de la maladie. Compte tenu des contraintes précédentes et de la qualité des données, nous avons préféré privilégier des méthodes statistiques éprouvées. Dans la plupart des études, la modélisation de la distribution du nombre de cas de tremblante atypique ou classique s'est faite par une loi binomiale ou une loi de Poisson si l'échantillon était de taille suffisante pour que l'approximation soit valide. Nous avons toutefois vérifié que nous n'avions pas de sur-dispersion, due notamment à la contagiosité dans le cas de la tremblante

classique, ni de sous-dispersion pour les deux formes de tremblante, notamment en raison de facteurs de résistance génétique ou du manque de sensibilité des tests.

…Sur une partie desquelles porte cette thèse

Le premier chapitre présente des rappels bibliographiques ainsi que l'objet d'étude. La tremblante atypique est de découverte récente et les connaissances sont encore limitées. La partie bibliographique fait aussi appel à des connaissances plus générales sur les EST et sur la tremblante classique. Elle se prolonge par une description des dispositifs de surveillance et de contrôle des EST ovines qui constituent la principale source de données disponibles.

Les chapitres deux, trois et quatre reposent sur les six études menées dans le cadre de cette thèse et sont essentiellement constitués des articles publiés ou soumis à publication. Lorsque le format de l'article a imposé une présentation courte des méthodes, un développement spécifique de celles-ci précède l'article.

Le deuxième chapitre est consacré à une approche d'épidémiologie descriptive. A partir des données issues des programmes de surveillance active, nous avons décrit les paramètres démographiques disponibles pour les cas de tremblante atypique et estimé la prévalence de la tremblante atypique. Nous avons comparé nos résultats avec ceux obtenus pour la tremblante classique en France mais également dans un certain nombre de pays européens.

Le troisième chapitre porte sur l'exploration des facteurs de risque de la tremblante atypique. Deux études cas-témoins ont été réalisées. La principale étude portait sur les facteurs de risque associés aux pratiques d'élevage et prenait en compte le risque génétique. La seconde étude, portait uniquement sur les facteurs de risque génétique.

Le quatrième chapitre porte indirectement sur l'évaluation de la contagiosité de la maladie. Nous avons étudié l'agrégation des cas de tremblante atypique en considérant qu'une transmission naturelle de la maladie devrait aboutir à un regroupement de cas au niveau spatial et/ou au sein des élevages où un premier cas, qualifié de cas index, est détecté. Nous avons donc étudié la distribution géographique de la tremblante atypique et la prévalence au sein des animaux soumis à des mesures de contrôle. Nous avons comparé les résultats obtenus pour la tremblante atypique à ceux obtenus pour la tremblante classique dont la contagiosité est connue.

Le cinquième chapitre offre une discussion générale sur ce que suggèrent nos résultats à propos du schéma épidémiologique de la tremblante atypique, des limites imparties à nos études et des perspectives de ce travail, notamment en matière de mesures de contrôle à appliquer et de perspectives de recherche.

Chapitre 1 : La tremblante atypique ovine : caractéristiques et gestion sanitaire d'une EST méconnue

La tremblante atypique est une EST, dont les propriétés pourraient se rapprocher davantage des maladies humaines que de la tremblante classique.

1.1.L'origine controversée des EST

Sans reprendre la chronologie de l'étude des EST, un aperçu historique des grandes avancées sur la question de l'origine de ces maladies, semble nécessaire pour appréhender l'état actuel des connaissances et des incertitudes.

1.1.1. Par le passé : dualité entre origine héréditaire et acquise

Les archives disponibles (Comber and Morborne, 1772; Besnoit, 1898; Stockman, 1926) ainsi que la revue de plus de 200 références historiques, la plupart datant du XIXème siècle, publiée récemment par Schneider (Schneider, Fangerau et al., 2008), témoignent des questionnements qui entourent depuis toujours l'origine de la tremblante. Bien entendu, une certaine prudence doit accompagner l'interprétation d'observations essentiellement basées sur des suspicions cliniques qui n'ont pas pu être confirmées avec les méthodes actuellement disponibles. Il est cependant remarquable que, dès les premières descriptions, différentes formes cliniques aient été clairement identifiées et que les avis aient été partagés entre une maladie d'origine infectieuse et une maladie d'origine héréditaire, alors que quelques observateurs cités par Schneider considéraient que la tremblante était une maladie héréditaire pouvant être occasionnellement transmise. Il semble que ce débat se soit prolongé jusque dans les années 1930, où le caractère transmissible de la tremblante fut finalement démontré chez le mouton (*Ovis aries*) par Cuillé et Chelle (Cuillé and Chelle, 1936; Cuillé and Chelle, 1938) qui mirent également en évidence une longue durée d'incubation (deux ans) qui est à la fois une caractéristique de ces maladies et un frein à leur étude expérimentale et épidémiologique.

1.1.2. De l'hypothèse virale à la théorie du prion

Si la nature infectieuse des EST semblait démontrée de par leur transmissibilité, la nature de l'agent infectieux n'était pas encore connue, même si on avançait l'hypothèse d'un virus lent (Sigurdsson, 1954). Cependant, la nature purement infectieuse de la tremblante ne faisait pas l'unanimité. Ainsi, Parry considérait, à l'image de ses prédécesseurs du XIXème siècle, la possibilité d'une maladie génétique occasionnellement transmise (Parry, 1962).

La longue période d'incubation, l'absence de réaction immunitaire détectable, l'influence des facteurs génétiques, la petite taille de l'agent infectieux et la grande résistance aux procédés d'inactivation (chaleur, ultra-violets, formol, ammonium quaternaires, et enzymes comme ARNase et ADNase) faisaient suspecter des virus de nature particulière (Alper, Haig et al., 1966 ; Alper, Cramp et al., 1967; Gajdusek, 1972). L'agent infectieux semblait principalement composé de polypeptides basiques (Pattison and Jones, 1967) et Alper émis l'idée qu'il pouvait ne pas contenir d'acide nucléique (Alper, Cramp et al., 1967). En 1967, Griffith proposa un modèle étiologique original basé sur l'autoréplication d'un agent de nature uniquement protéique par dimérisation ; l'auteur soulignait que ce modèle était compatible avec une maladie d'origine contagieuse ou spontanée (Griffith, 1967).

Au début des années 1980, Prusiner, en se reposant, notamment, sur la corrélation entre l'infectiosité des tissus et la purification de la PrP-res (Bolton, McKinley et al., 1982), et sur les propriétés physico-chimiques de l'agent infectieux, réactualisa l'hypothèse de Griffith, sans la démontrer formellement. Il proposa que l'agent infectieux était uniquement de nature protéique et il suggéra de le dénommer prion, anagramme de « **pro**teinaceous **in**fectious particle » (Prusiner, 1982). Prusiner proposait que le prion soit principalement composé de PrP^{Sc} et n'excluait pas complètement la présence d'un oligonucléotide. Sa définition du prion était alors une particule infectieuse protéinique qui résiste aux traitements inactivant les acides nucléiques (Prusiner, 1982). Parallèlement à cette hypothèse, d'autres modèles étaient proposés, s'écartant plus ou moins de la structure classique des virus (pro-virus (Parry, 1962), virino (Kimberlin, 1982), holoprion (Weissmann, 1999)).

Grâce au séquençage de la protéine prion, il fut possible de mettre en évidence que le gène PRNP, codant pour la protéine prion, était présent chez tous les mammifères et qu'une production de prion existait dans des cellules d'organismes sains (Chesebro, Race et al., 1985). La protéine prion trouvée dans les cerveaux témoins (PrP^{C}) n'était pas résistante aux différents traitements dénaturant, contrairement à la protéine trouvée dans les cerveaux atteints de tremblante (PrP^{Sc}), et ne présentait pas de propriétés réfringentes, responsables des plaques amyloïdes ou les propriétés d'agrégation responsables des SAF (Oesch, Westaway et al., 1985). Des modèles de souris transgéniques n'exprimant pas le gène PRNP (knock-out) furent construits. Ces souris étaient viables, ce qui posait question sur le rôle de la PrP^{C}, et surtout résistantes à l'agent infectieux de la tremblante (Büeler, Aguzzi et al., 1993). De plus, il a également été montré *in vitro* que la PrP^{Sc} avait la capacité d'induire les changements de conformation permettant la transformation de PrP^{C} en une protéine ayant les mêmes propriétés physico-chimiques que la PrP^{Sc} (Kocisko, Come et al., 1994), mais en faible quantité et sans reproduction du pouvoir infectieux.

De façon simplifiée, la formation de la PrP^{Sc} résulterait de la transconformation de la PrP^{C} à partir d'une amorce représentée par la PrP^{Sc} et accompagnerait le développement des lésions selon un mécanisme inconnu, passant éventuellement par une étape intermédiaire instable et cytotoxique. La PrP^{Sc} initiale proviendrait soit d'une contamination notamment iatrogène ou alimentaire ou une autre cause contagieuse, soit d'une formation « spontanée » dans l'organisme et plus ou moins fortement conditionnée par le génotype PRNP. Une expérience déterminante en faveur de cette théorie fut la production spontanée de lésions comparables à celle du GSS chez des souris transgéniques sur-exprimant un grand nombre de fois un des allèles PRNP trouvé chez les patients atteints de GSS (Hsiao, Scott et al., 1990), bien que cet état ne fut pas transmissible par inoculation. Une expérience similaire fut conduite par Chiesa et al. en 1998 (Chiesa, Piccardo et al., 1998). La théorie de Prusiner fut récompensée par un prix Nobel de médecine et physiologie en 1997. Un an après, Prusiner définissait le prion comme une particule infectieuse d'origine protéique et dépourvue d'acide nucléique (Prusiner, 1998).

1.1.3. Vers une adoption de la théorie du prion ?

A la fin des années 1980, certains aspects des EST restaient mal expliqués par la théorie du prion, notamment le support moléculaire des souches et de la barrière d'espèce. Prusiner proposa que la conformation spatiale de la PrP^{Sc} constitue le support de cette diversité, en se basant sur le fait que

la PrP^{Sc} se liait préférentiellement à la PrP^{C} homologue (Prusiner, Scott et al., 1990; Prusiner, 1991).

Dans les années 2000, la manipulation in vitro de la PrP^{Sc}, la maîtrise accrue de la construction de souris transgéniques et la production de PrP par des levures ou des bactéries recombinantes, ont permis des avancées importantes. Deux études ont particulièrement crédité la théorie du prion. La première a été la production d'agent infectieux responsable d'EST en inoculant à des souris sur-exprimant la PrP^{C} des fibrilles de PrP^{Sc} homologues produites par un *E. coli* recombinant (Legname, Baskakov et al., 2004) et transconformée *in vitro* sans amorce de tissu infecté (Baskakov, Legname et al., 2002). La deuxième a été la mise au point d'un procédé d'amplification *in vitro* de la PrP^{Sc} à partir de PrP^{C}, nommé PMCA (pour protein misfolding cyclic amplification) (Saborio, Permanne et al., 2001). Grâce à lui, des EST ont pu être reproduites par inoculation d'échantillons de PrP^{Sc} formée in vitro à partir de PrP^{C} de synthèse et de PrP^{Sc} issue d'animaux malades mais à des dilutions 10^{8} à 10^{10} fois inférieures aux doses infectieuses, ce qui laisserait supposer l'absence d'infectiosité résiduelle (Castilla, Saa et al., 2005). De même, des éléments récents ont contribué à montrer que la variabilité phénotypique des souches était due à la variabilité de la conformation spatiale du prion (Peretz, Scott et al., 2001; Weissmann, 2005; Tanaka, Collins et al., 2006; Collinge and Clarke, 2007; Béringue, Vilotte et al., 2008).

Malgré les nombreux éléments et prises de position en faveur de la théorie du prion, aucune démonstration absolue n'a encore été apportée. Certains travaux ont continué à nourrir la controverse : la transconformation *in vitro* de PrP^{C} en PrP^{Sc} est améliorée par la présence de petits fragments d'ARN spécifiques (Deleault, Lucassen et al., 2003) et de nombreuses expériences récemment revues par Supattapone indiquent que certains fragments d'ARN se lient spécifiquement à la PrP^{Sc} y compris *in vivo* (Supattapone, 2004). Certaines équipes soutiennent l'hypothèse que l'agent responsable des EST est de nature virale en s'appuyant sur l'identification de particules virales de 25nm de diamètre (Manuelidis, Yu et al., 2007 ; Manuelidis, Liu et al., 2009) et en critiquant les principaux résultats soutenant la théorie du prion, sur la base d'une surinterprétation des résultats, d'un manque de transparence des résultats ou d'absence de reproductibilité des méthodes (Manuelidis, 2007).

1.1.4. Prise de position

Ces dernières années, les articles portant sur la biologie des EST se sont complexifiés avec le développement des modèles expérimentaux. L'implication biologique réelle des résultats ainsi obtenus, autrement dit, la lecture critique de ces études, fait appel à des connaissances approfondies en biologie moléculaire. Il semble donc plus prudent, sans prendre parti, de constater qu'au bout d'une vingtaine d'année, la grande majorité des spécialistes ont adopté la théorie du prion mais qu'une prudence, voire une défiance, vis-à-vis de cette théorie demeure de mise chez une petite minorité (Ledford, 2007). Par ailleurs, l'intervention de cofacteurs dans la formation de l'agent infectieux n'est pas improbable et n'est pas incompatible avec la théorie du prion (Caughey and Baron, 2006).

1.2.La protéine prion, biologie et relation avec l'agent infectieux

Quelle que soit la nature de l'agent infectieux responsable des EST, il est certain que la protéine prion joue un rôle fondamental dans la biologie de ces maladies. Pour de nombreux chercheurs, c'est en élucidant le rôle biologique de la protéine prion que l'on parviendra à comprendre et à prévenir le développement des EST. Bien que ces aspects se situent en marge du champ disciplinaire de nos travaux, les principaux éléments de connaissance sur la PrP^C sont nécessaires pour situer l'origine des hypothèses mobilisées dans l'investigation épidémiologique de la tremblante atypique.

1.2.1. Description de la protéine prion normale

La protéine PrP^C est une métalloprotéine transmembranaire constituée d'environ 250 acides aminés (AA), nombre variable en fonction des espèces, et d'un poids moléculaire d'environ 33-35 kilo-daltons (kd) (Oesch, Westaway et al., 1985). Chez les ovins, elle comprend 256 AA (Goldmann, Hunter et al., 1990). Elle est soluble dans les détergents, sensible à la protéinase K (PK) ainsi qu'aux différents traitements inactivant les protéines. La structure primaire de la PrP^C comporte différents domaines (Figure 1).

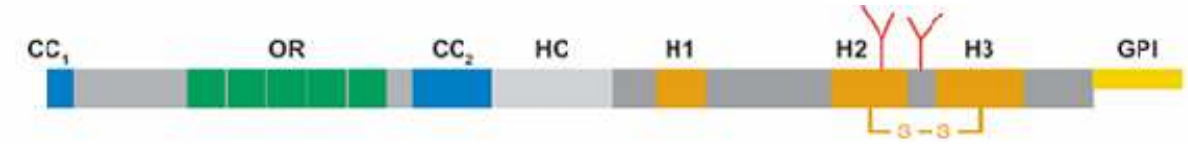


Figure 1 : Structure primaire de la protéine PrP^C humaine d'après (Aguzzi, Baumann et al., 2008)

De l'extrémité N terminale (à gauche) à l'extrémité C terminale (à droite) : CC1 et CC2 : agrégats d'acide aminés chargés positivement ; OR : répétition d'octapeptides impliquée dans la fixation de ligands métalliques ; HC : noyau hydrophobe ; H1, H2, H3 : hélices alpha ; S-S : pont di-sulfure entre résidus de cystéine en position 179 et 214 ; fourches rouges : sites de glycosylation en position 181 et 197 ; GPI : ancre glycosyl phosphatiddocupeddyl inositol

La structure spatiale de la PrP^C présente trois hélices alpha et un feuillet béta (Pan, Baldwin et al., 1993) (Figure 2).

La PrP^C présente deux sites de glycosylation aux positions 181 et 197. La protéine peut être trouvée à l'état non glycosylé, mono-glycosylé ou di-glycosylé. Les proportions et la nature de ces différents glycoformes ont des conséquences diagnostiques, qui seront évoquées plus loin, et probablement des implications sur le mécanisme physiopathologique (Ermonval, Mouillet-Richard et al., 2003). Par ailleurs, il semble que la glycosylation participe à la stabilisation de la structure spatiale de la PrP^C (Lehmann and Harris, 1997) et il a été proposé que la diversité fonctionnelle de la PrP^C soit en partie conditionnée par le schéma de glycosylation (Rudd, Merry et al., 2002; Ermonval, Mouillet-Richard et al., 2003).

La PrP^C comporte deux sites de fixation pour des cations métalliques issus de différents éléments : cuivre (Cu^{2+}), zinc (Zn^{2+}), manganèse (Mn^{2+}), cobalt (Co^{2+}), nickel (Ni^{2+}), fer (Fe^{2+} et Fe^{3+}), calcium (Ca^{2+}) et magnésium (Mg^{2+})(Hornshaw, McDermott et al., 1995). En raison d'une plus grande affinité pour ces ions, la PrP^C s'associe préférentiellement à Cu^{2+} (Hornshaw, McDermott et al., 1995).

Sur le plan quaternaire, la PrP^C est usuellement présente à l'état monomérique, cependant des oligomères sont également détectés dans le cytosol (Meyer, Lustig et al., 2000 ; Yuan, Xiao et al., 2006) montrant la capacité de la molécule à s'associer spontanément en dehors de tout contexte pathologique.

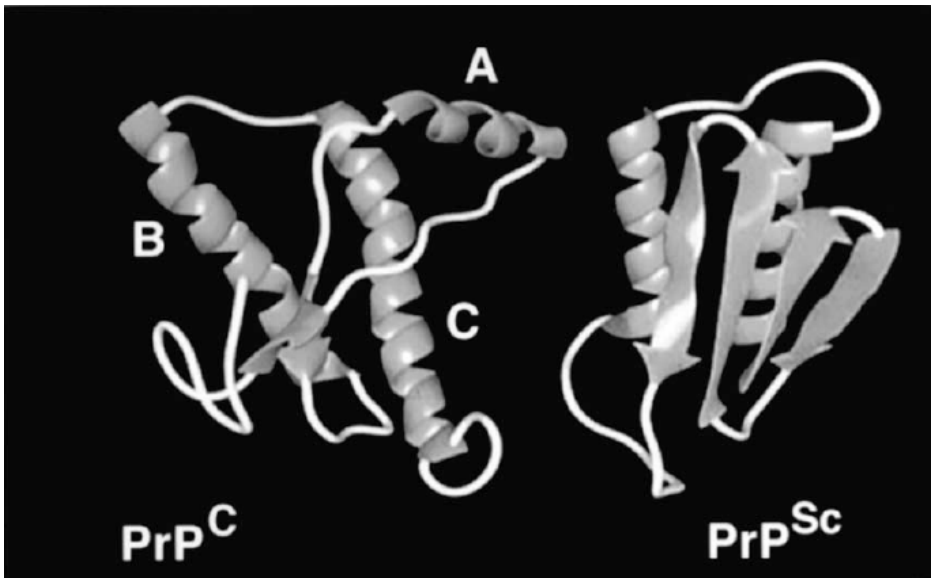


Figure 2 : Modèles de conformation de la PrP^C et de la PrP^{Sc}, d'après DeArmond, 2002 (DeArmond and Bouzamondo, 2002)

Les hélices alpha (A, B, C) représentent 42% de la PrP^C et seulement 30% de la PrP^{Sc}. Les feuillets béta représentent 3% de la PrP^C et 42% de la PrP^{Sc}.

La PrP^C est le plus souvent présente à la surface des cellules, associée à la membrane cellulaire par l'ancre GPI, au niveau des rafts lipidiques (Naslavsky, Stein et al., 1997). La présentation membranaire de la PrP^C est cependant variable et, l'ancre GPI ne permettant pas une position transmembranaire, il est vraisemblable que la PrP^C soit en interaction avec d'autres protéines membranaires permettant ainsi une relation fonctionnelle avec le cytosol (Rudd, Merry et al., 2002).

1.2.2. Production de la protéine prion

Le gène PRNP codant pour la PrP^C est présent chez tous les vertébrés (Rongyan, Xianglong et al., 2008). Chez les ovins, il a été mis en évidence par Goldmann et al. et il est porté par le chromosome 13 (Goldmann, Hunter et al., 1990).

L'expression de la PrP^C est la plus abondante dans le SNC au niveau des neurones (Kretzschmar, Prusiner et al., 1986) et des cellules gliales (Moser, Colello et al., 1995) mais également dans de nombreux autres tissus tels que la rate, les nœuds lymphatiques, les poumons, le cœur, les reins, les muscles squelettiques, l'utérus, les surrénales, l'intestin, le proventricule, l'abomasum et les glandes mammaires, mais pas au niveau du foie (Horiuchi, Yamazaki et al., 1995).

Plusieurs études ont montré que la concentration en cuivre était associée à la production de PrP^C (Toni, Massimino et al., 2005). Des travaux récents ont montré que la région promotrice du gène PRNP chez l'homme comportait différents sites potentiels de liaison de facteurs de transcription (SP1 , AP1, AP2, boite CCAAT) (Mahal, Asante et al., 2001). Le site SP1 peut notamment être la

cible du *facteur métal responsive transcription factor-1* (MTF1) qui entraîne l'activation de la transcription du gène PRNP en situation d'abondance de cuivre (Bellingham, Coleman et al., 2009).

1.2.3. Fonctions biologiques de la protéine prion

De nombreux éléments conduisent à penser que la PrP^C participe à l'homéostasie intracellulaire du cuivre (Brown, Qin et al., 1997; Pauly and Harris, 1998 ; Brown and Harris, 2003 ; Leclerc, Serban et al., 2006) et à la régulation de l'activité superoxyde dismutase (SOD) (Brown, Schulz-Schaeffer et al., 1997 ; Brown, Wong et al., 1999 ; Lehmann, 2002 ; Aguzzi, Baumann et al., 2008 ; Davies and Brown, 2008). Ces fonctions sont à mettre en relation avec le rôle neurotoxique et pro-oxydant des ions métalliques, en particulier du cuivre, que l'on retrouve dans de nombreuses maladies neurodégénératives (Zatta and Frank, 2007). Il a d'ailleurs été constaté dès les années 1970 que la cuprizone, un chélateur du cuivre, induisait des lésions similaires à celles de la tremblante chez la souris (Pattison and Jebbett, 1971). Les souris PRNP knock out ont également une moindre activité SOD et une sensibilité accrue aux facteurs de stress oxydatif (Brown, Qin et al., 1997; Brown, Schulz-Schaeffer et al., 1997; White, Collins et al., 1999; Wong, Brown et al., 2001; Wong, Liu et al., 2001) ce qui a aussi été observé chez des animaux atteints d'EST (Thackray, Knight et al., 2002).

La PrP^C a été également impliquée dans d'autres fonctions cellulaires. Elle aurait une fonction protectrice vis-à-vis de l'apoptose (revue par Aguzzi, Baumann et al., 2008) et elle interviendrait dans la signalisation de certaines voies métaboliques (Mouillet-Richard, Ermonval et al., 2000; Mouillet-Richard and Kellermann, 2001), elle pourrait potentialiser le développement de la maladie d'Alzheimer en interagissant avec la protéine amyloïde-ß dont l'accumulation caractérise cette maladie (Lauren, Gimbel et al., 2009), elle interviendrait également dans l'adhésion cellulaire notamment au niveau des dendrites et des axones, via une interaction entre PrP^C et certaines laminines (Graner, Mercadante et al., 2000a; Graner, Mercadante et al., 2000b).

1.2.4. Relations entre la PrP^C et la PrP^{Sc}

La PrP^{Sc} est un isoforme de la PrP^C et ne diffère pas chimiquement de la PrP^C qui lui est homologue (Barry and Prusiner, 1986). En revanche, la conformation de la PrP^{Sc} diffère de celle de la PrP^C, notamment par l'abondance de feuillet béta (42%) et la perte d'hélices alpha (30%) (Figure 2), les propriétés réfringentes des feuillets béta sont responsables de l'aspect des plaques amyloïdes (Bolton, McKinley et al., 1982 ; Pan, Baldwin et al., 1993).

La forme PrP^{Sc} est plus stable thermodynamiquement que la PrP^C et présente des agrégats insolubles dans les détergents. Elle se caractérise également par sa grande résistance aux procédés de désactivation et de désinfection. La résistance partielle de la PrP^{Sc} à la PK se traduit par la formation de produits de digestion, la PrP-res, clivés en partie N terminale et ayant un poids moléculaire de 27-30 kd (Meyer, McKinley et al., 1986). La technique de Western immunoblotting (Western Blot) représente une des méthodes du diagnostic de confirmation des EST (Katz, Pedersen et al., 1992).

La PrP^{Sc} a la capacité d'induire la transconformation de la PrP^C par interaction directe mais le mécanisme de conversion n'est pas connu. La transition entre la PrP^C et la PrP^{Sc} fait vraisemblablement intervenir de nombreux isoformes transitoires, comme cela a été montré in vitro avec de la PrP recombinante (Zhang, Stockel et al., 1997).

Les ions Cu^{2+}, Zn^{2+} et Mn^{2+} interviendraient également dans la formation de PrP^{Sc}, mais les mécanismes sont encore peu compris (Choi, Kanthasamy et al., 2006; Leach, Salman et al., 2006). Les répétitions surnuméraires des répétitions d'octapeptides (OR) (Figure 1) sont fréquemment retrouvés dans des EST humaines d'origine génétique (Owen, Poulter et al., 1989 ; DeArmond and Prusiner, 1995 ; Stevens, Walter et al., 2009). Des études de simulations moléculaires dynamiques récentes montrent également que la liaison entre le cuivre et la PrP^{C} pourrait induire la formation initiale de PrP^{Sc} (Pushie, Rauk et al., 2009) bien que selon d'autres, il s'agisse d'une PrP-res clairement distincte de la PrP^{Sc} (Quaglio, Chiesa et al., 2001).

La PrP^{C} est plus facilement convertie en PrP^{Sc} lorsqu'elle est non glycosylée ou monoglycosylée (Taraboulos, Rogers et al., 1990). Certains auteurs s'attendent à ce que l'énergie nécessaire pour la transconformation de la forme diglycosylée soit supérieure par rapport à la forme monoglycoylée ou non glycosylée, plus favorables au changement de conformation (Ermonval, Mouillet-Richard et al., 2003). Cependant, aucun résultat clair sur le rôle de la glycosylation dans la pathogénie des EST n'a encore été obtenu.

Selon la théorie du prion, les EST ont trois origines possibles différentes (génétique, infectieuse ou sporadique), et selon chacune, il est vraisemblable que les mécanismes diffèrent. Ainsi, dans les cas infectieux, une PrP^{Sc} exogène pourrait interagir avec la PrP^{C} endogène suivant la voie de contamination. Dans les cas d'EST génétique, il est supposé qu'en raison d'une mutation de la séquence de la PrP^{C} de l'hôte, la probabilité d'une formation spontanée de la PrP^{Sc} augmente fortement. Dans les cas d'EST sporadiques, l'accumulation de PrP^{Sc} pourrait traduire l'occurrence, très peu probable, d'une rupture d'équilibre entre PrP^{C} et PrP^{Sc}. Cela impliquerait l'existence de PrP^{Sc} dans les organismes sains en l'absence de mutation génétique ce qui a été partiellement acrédité par la présence d'agrégats insolubles de PrP résistants à la PK trouvés en petite quantité dans des cerveaux sains d'humains (Yuan, Xiao et al., 2006) et par des études *in vitro* montrant le rôle essentiel des oligomères de PrP dans le développement des EST et leur diversité phénotypique (Eghiaian, Daubenfeld et al., 2007).

1.3. Les souches d'EST ovines

La notion de souches d'EST est apparue avec les expériences d'inoculation de Pattison qui montra chez la chèvre (*Capra hircus*) que la diversité des présentations cliniques de tremblante (scratching et drowsy) étaient reproduites lors de la transmission de l'agent, conduisant à la notion de souches différentes et stables comme celles décrites en virologie (Pattison and Millson, 1961). Cependant, lorsque la souche était transmise à une nouvelle espèce, la durée d'incubation était plus longue et le taux de réussite des expériences de contamination était plus faible. La notion de barrière d'espèce correspond à la difficulté à transmettre une souche donnée à une nouvelle espèce (Zlotnik and Rennie, 1965). Avec des passages successifs dans la même espèce, une souche d'EST exotique semble s'adapter de façon durable (Zlotnik and Rennie, 1965).

1.3.1. Caractérisation des souches

Le premier élément essentiel dans la caractérisation des souches est la constance de la période d'incubation. La variabilité de la période d'incubation d'une souche donnée inoculée à des souris de même génotype est inférieure à 2% de la valeur moyenne de la période d'incubation (Bruce,

McConnell et al., 1991). Toutefois, des différences marquées sont observées lorsque les génotypes diffèrent (Dickinson and Meikle, 1971; Bruce, McConnell et al., 1991).

Le deuxième élément est la reproductibilité des profils lésionnels associés aux souches (Fraser, 1993). Le profil lésionnel repose sur la notation standardisée et semi-quantitative de la sévérité de la vacuolisation sur un panel de 12 sections du SNC. Il s'avère caractéristique de la combinaison de la souche et du génotype (Bruce, McConnell et al., 1991). Ces caractéristiques sont par ailleurs variables par nature, certaines souches affectent préférentiellement certains groupes de neurones, d'autres ne semblent pas présenter de préférence cellulaire mais diffèrent par les zones du SNC touchées, la production de plaques amyloïdes semble aussi liée aux caractéristiques de souches (Bruce, 2003).

D'autres caractéristiques permettent de différencier les souches. Les tableaux cliniques sont particulièrement utilisés chez l'humain (Budka, Aguzzi et al., 1995). Par ailleurs, les produits de dégradation par la PK, les profils de glycosylation et de sédimentation sont des outils accessibles pour l'exploration diagnostique (voir p. 46). Ils ne sont cependant pas toujours suffisants, par exemple pour différencier certaines souches de tremblante de l'ESB (Baron, Crozet et al., 2004). Cela impose des expériences d'inoculation à la souris pour mesurer le temps d'incubation et établir le profil lésionnel (Bruce, McConnell et al., 1991; Thackray, Klein et al., 2003 ; Legname, Nguyen et al., 2005 ; Morales, Abid et al., 2007). De plus, certaines souches présentent des difficultés diagnostiques, par exemple, la transmission de l'ESB à la souris (non transgénique) aboutit à la production de deux souches dont l'une n'est pas résistante à la PK (Lasmézas, Deslys et al., 1997).

Les mécanismes moléculaires associés à la notion de souche ne sont pas complètement connus mais il semble désormais admis que la conformation spatiale de la PrPSc, elle-même sous l'influence de nombreux facteurs comme la glycosylation ou la liaison avec le cuivre, soit le principal support de cette diversité (Bessen, Kocisko et al., 1995 ; Collinge, Sidle et al., 1996 ; Somerville, Birkett et al., 1997 ; Caughey, Raymond et al., 1998 ; Rubenstein, Gray et al., 1998; Safar, Wille et al., 1998 ; Aucouturier, Kascsak et al., 1999 ; Bellon, Seyfert-Brandt et al., 2003 ; Jones and Surewicz, 2005 ; Collinge and Clarke, 2007 ; Morales, Abid et al., 2007).

1.3.2. Définition des trois familles de souches d'EST ovines

Les souches d'EST ovines sont communes à tous les petits ruminants. Depuis 2005, trois souches d'EST des petits ruminants sont reconnues par l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (AESA) : l'ESB, la tremblante classique et la tremblante atypique (Tableau 2) (European Food Safety Autority, 2005a). Cette classification est basée sur des critères phénotypiques qui seront revus dans la partie diagnostic. Les études effectuées avant la détection de la tremblante atypique se réfèrent simplement à la tremblante et il est vraisemblable qu'elles correspondent majoritairement à la tremblante classique.

La tremblante classique regroupe également une grande variété de souches, au moins une vingtaine isolées chez la souris (Bruce, Boyle et al., 2002). Cependant, le profil lésionnel chez le mouton est d'un intérêt limité pour les différencier (Wood, McGill et al., 1997). Les principales souches décrites sont SSBP/1 (Dickinson, Stamp et al., 1968) et CH1641 (Foster and Dickinson, 1988). Cette dernière a présenté un intérêt particulier en raison de certaines ressemblances avec l'ESB (Baron and Biacabe, 2001; Jeffrey, González et al., 2006), de nombreuses autres souches ont

cependant été identifiées chez la souris (Béringue, Vilotte et al., 2008) mais leur signification épidémiologique est inconnue.

La tremblante atypique regroupe la souche Nor98 détectée en 1998 en Norvège par Sylvie Benestad et publiée en 2003 (Benestad, Sarradin et al., 2003) et les isolats de tremblante atypique détectés dans les autres pays. Aucune différence n'a été constatée à ce jour entre ces différents cas (European Food Safety Autority, 2005a), y compris au terme d'une étude plus poussée portant sur la comparaison des cas français et norvégiens (Arsac, Andréoletti et al., 2007). La PrPSc associée aux cas de tremblante atypique est moins stable que celle associée à la tremblante classique, notamment vis-à-vis de la digestion par la PK, d'où un résultat d'analyse négatif lors de traitement fort à la PK (Tableau 2) (Benestad, Sarradin et al., 2003; European Food Safety Autority, 2005a; Simmons, Konold et al., 2007). Deux articles synthétiques de vulgarisation décrivant la tremblante atypique, dont je suis premier auteur, sont reportés en annexe (Tremblante atypique acquis et interrogations, p. 285 et Chemin vers une caractérisation, tableau épidémiologique et contrôle, p. 291).

L'ESB chez les petits ruminants a été démontrée expérimentalement par inoculation intracérébrale et exposition orale (Foster, Hope et al., 1993; Foster, Parnham et al., 2001b). Toutefois, son existence en conditions naturelles semble être extrêmement limitée, aucun cas ovin et au plus seuls deux cas caprins (une chèvre en France (Eloit, Adjou et al., 2005) et une chèvre en Ecosse (Dustan, Spencer et al., 2008)) auront été confirmés en Europe parmi les millions d'animaux testés. L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) a d'ailleurs estimé qu'une prévalence nulle était la valeur la plus probable de l'ESB chez les ovins (AFSSA, 2007c).

Tableau 2 : Critères de classification des souches d'EST chez les petits ruminants d'après l'AESA 2005 (European Food Safety Autority, 2005a)

EST	Tests rapides de dépistage approuvés (UE/AESA)	Western Blot avec traitement PK fort	Western blot avec traitement PK modéré	Immunohistochimie et histopathologie	Commentaire
Tremblante classique (TC)	Positifs	Profil à 3 bandes comprises entre 15kDa et 30kDa où la forme diglycosylée prédomine et la forme non-glycosylée est minoritaire. Les trois bandes sont immunoréactives aux anticorps monoclonaux spécifiques en partie N terminale et en région centrale. Occasionnellement, négativité ou moins de trois bandes en fonction de la concentration en PrP^{-res}. Avec un traitement à la PK modéré, les cas négatifs sont plus rares et les trois bandes sont toujours visibles.		Vacuolisation de la matière grise habituellement présente. Immunomarquage dans la *medulla oblongata* impliquant le noyau moteur dorsal du nerf vague (NMDNV)	Il n'existe pas de typologie pour les différentes souches de tremblante classique basée sur ces critères
Tremblante atypique (TA)	Tests BioRad[1] et Idexx[2] positifs ; Prionics Check LIA Small Ruminant négatif Autres tests[3] positifs sur échantillons de cervelet	Négatif ou bandes incompatibles avec la TC et l'ESB (dépendent des anticorps utilisés) Masse moléculaire comprise entre (10kDa et 35kDa).	Positif [en partie N terminale ou centrale], Avec des profils différents de l'ESB et de la TC avec une bande reconnaissable d'un poids inférieur à 15kDa. Signal plus fort sur des prélèvements de cervelet mais concordant avec les observations faites sur le tronc cérébral.	Vacuolisation de la matière grise inconstante. Immunomarquage et lésions plus marqués et plus fréquents dans le cervelet que dans le tronc cérébral (surtout obex). Dans la *medulla oblongata,* immunomarquage absent du NMDNV mais présent dans noyau du tractus spinal du nerf trigéminé. Structure lymphoïdes négatives.	Les souches Nor98 et les isolats de tremblante atypiques français ne diffèrent pas sur la base de ces critères
ESB	Positifs	Profil à 3 bandes comprises où la forme diglycosylée prédomine avec des anticorps dirigés sur la partie centrale et absente ou moins intense avec des anticorps dirigés sur la partie N terminale ; bande non-glycosylée de poids moléculaire inférieur à celle observée en TC.		Vacuolisation de la matière grise habituellement présente. Immunomarquage dans la *medulla oblongata* impliquant le NMDNV.	La confirmation définitive de l'ESB chez les petits ruminants se fait par inoculation à des souris.

[1] BioRad TeSeE / Platelia et BioRad TeSeE Sheep and Goats

[2] IDEXX HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit, EIA

[3] Prionics Western Blot Small Ruminants, Institut Pourquier Scrapie Test, Enfer TSE Test v 2.0, InPro CDI-5

1.3.3. Souches et polymorphisme du gène PRNP

Dickinson et ses collègues identifièrent un gène régulant le temps d'incubation de la tremblante chez la souris, nommé *Sinc* pour **S**crapie **inc**ubation period (Dickinson, Meikle et al., 1968) et qui exerçait un effet superposé à celui des souches (Dickinson, Stamp et al., 1968). L'identité du gène *Sinc* et du gène *PRNP* fut montrée ultérieurement (Hunter, Dann et al., 1992). Cependant, d'autres gènes pourraient intervenir dans la durée d'incubation de la tremblante (Diaz, Vitezica et al., 2005; Moreno, Cosseddu et al., 2008). Bruce confirma la relation entre souche et polymorphisme PRNP (Bruce, 1993). La différence de PRNP entre animal donneur et receveur lors de transmission intra-spécifique induit des allongements de la période d'incubation rappelant le franchissement de la barrière d'espèce et pouvant aboutir à la production de nouvelles souches caractérisées par des profils lésionnels différents (Bruce, 1993).

Pour la tremblante classique, les principaux polymorphismes associés aux codons 136 (Valine – V ou Alanine - A), 154 (Arginine – R ou Histidine – H) et 171 (Arginine – R, Histidine – H ou Glutamine – Q) influencent la survenue de la maladie dans les conditions naturelles et expérimentales (Hunter, Foster et al., 1992 ; Laplanche, Chatelain et al., 1993 ; Hunter, Moore et al., 1997). D'autres mutations sont rapportées mais elles ne semblent pas jouer un rôle significatif. L'allèle $A_{136}R_{154}Q_{171}$ (noté ARQ) est supposé être l'allèle ancestral et, en pratique, on ne trouve que des allèles présentant une seule mutation par rapport à ARQ. Les allèles définis par ces mutations peuvent être classés par susceptibilité croissante à la tremblante classique dans l'ordre suivant : ARR<<AHQ<ARQ ≈ ARH<<VRQ, (Dubois, Sabatier et al., 2002; Palhière, François et al., 2002; Baylis, Chihota et al., 2004; Saunders, Cawthraw et al., 2006; Tongue, Wilesmith et al., 2008). Il n'y a pas vraiment de phénomène de dominance et les allèles semblent avoir un effet multiplicatif sur le risque de développer la maladie (Dubois, Sabatier et al., 2002). La résistance conférée par l'allèle ARR est très forte. Des cas de tremblante classique sur des animaux homozygotes ARR/ARR ont été détectés mais uniquement de façon exceptionnelle (Groschup, Lacroux et al., 2007) voire incertaine (Ikeda, Horiuchi et al., 1995). Des différences de profils lésionnels sont détectées en fonction de la souche, de la race et du génotype des animaux (Goldmann, Hunter et al., 1994; Ryder, Spencer et al., 2001 ; González, Martin et al., 2002). Ainsi, certaines souches semblent se manifester différemment en fonction de la race. Aussi, on a pu observer des souches adaptées au génotype VRQ/VRQ en race Cheviot et d'autres adaptées au génotype ARQ/ARQ en race Suffolk (Hunter, Foster et al., 1996). Dans les races où le génotype VRQ/VRQ est rare, il semble que les souches soient adaptées aux porteurs d'ARQ (Dawson, Hoinville et al., 1998). Pour information, chez les caprins, l'association entre polymorphisme génétique et sensibilité à la tremblante classique est moins marquée que chez les ovins, des marqueurs de résistance ont été récemment reconnus mais doivent encore être confirmés à large échelle (Billinis, Panagiotidis et al., 2002 ; Vaccari, Di Bari et al., 2006; Konold, Davis et al., 2007; Barillet, Mariat et al., 2009).

Dans le cas de la tremblante atypique, une mutation au codon 141, résultant en un remplacement de Leucine –L par Phénylalanine – F, et trouvé exclusivement chez les animaux ARQ, est associé à une plus forte probabilité de la maladie (Moum, Olsaker et al., 2005). Les allèles doivent donc être définis par rapport à quatre codons au lieu de trois en tremblante classique. Les allèles ALHQ et AFRQ sont nettement plus susceptibles que les allèles VLRQ, ALRQ (l'allèle ancestral), ALRH et ALRR (Moum, Olsaker et al., 2005 ; EFSA, 2006; Moreno, Moazami-Goudarzi et al., 2007). Des cas ALRR/ALRR ont été diagnostiqués, mais pas de cas VLRQ/VLRQ ni de cas ALRQ/ALRQ

(Buschmann, Lühken et al., 2004; Saunders, Cawthraw et al., 2006 ; Lühken, Buschmann et al., 2007). Cependant, ces études ont porté sur un nombre limité de cas et la différence de susceptibilité des différents allèles ALRR, ALRQ, ALRH et VLRQ, ainsi que l'effet associé aux génotypes, n'a pas été complètement élucidé. A ce stade, la plus ou moins grande susceptibilité génétique n'a pas eu d'interprétation physiopathologique. Cependant, en terme biochimique, il semble que la PrP^C codée par les génotypes les plus sensibles aient une moindre stabilité thermodynamique (Fitzmaurice, Burke et al., 2008).

Dans le cas de l'ESB chez les ovins, la sensibilité est caractérisée pour les trois codons définis pour la tremblante classique. On a pu montrer que les animaux de génotype AHQ/AHQ, AHQ/ARQ et ARQ/ARQ (Foster, Parnham et al., 2001b ; Houston, Goldmann et al., 2003 ; Goldmann, Houston et al., 2006) sont les plus sensibles avec des périodes d'incubation de deux à quatre ans. Cependant les animaux ARR/ARR sont également sensibles avec une période d'incubation supérieure à cinq ans (Andréoletti, Morel et al., 2006).

1.3.4. Souches et franchissement de la barrière d'espèce

La capacité de franchissement de la barrière d'espèce est différente en fonction des souches. Cela pourrait être en partie dû aux différences entre la PrP^C des espèces d'origine et celle des espèces hôtes (Collinge and Clarke, 2007). Cependant, certaines souches sont plus facilement transmises que d'autres. Ainsi, l'agent responsable de l'ESB a été retrouvé chez de nombreuses espèces dont l'homme (Tableau 1) et a été transmis expérimentalement à un nombre encore plus grand d'espèces (Bruce, Chree et al., 1994; Hill, Desbruslais et al., 1997).

Lors du franchissement de la barrière d'espèce, il n'est pas rare que les caractéristiques des souches évoluent après quelque passage dans la nouvelle espèce cible. Soit parce qu'une souche est sélectionnée parmi un mélange préexistant, soit parce que de nouvelles souches se constituent (Bartz, Bessen et al., 2000 ; Schoch, Seeger et al., 2006 ; Collinge and Clarke, 2007 ; Béringue, Vilotte et al., 2008).

La tremblante classique peut être transmise expérimentalement à un certain nombre d'espèces de rongeurs (Chandler, 1963 ; Zlotnik and Rennie, 1965), aux bovins (Gibbs, Safar et al., 1990 ; Cutlip, Miller et al., 1994) mais aussi au macaque crabier (*Macaca fascicularis*) (Gibbs and Gajdusek, 1972). Jusqu'à présent, aucun lien n'a été établi entre une EST humaine et la tremblante classique malgré de nombreuses suspicions qu'un tel lien puisse exister (Alter, Frank et al., 1975; Chatelain, Cathala et al., 1981; Brown, Cathala et al., 1987; Chatelain and Dautheville-Guibal, 1988; Korczyn, 1991; Wientjens, Davanipour et al., 1996). Le passage de la tremblante ovine aux bovins a longtemps été suspectée comme étant à l'origine de l'ESB (Wilesmith, Wells et al., 1988) mais cela n'a pas été démontré et il semble que les bovins soient peu réceptifs à l'agent de la tremblante et que la maladie induite soit phénotypiquement différente (Gibbs, Safar et al., 1990 ; Cutlip, Miller et al., 1994; Cutlip, Miller et al., 2001). On a récemment découvert des souches d'ESB atypiques (différenciées par leurs profils moléculaires en type H et type L) qui présentent des caractéristiques lésionnelles évoquant, comme pour la tremblante atypique, une origine spontanée (Biacabe, Laplanche et al., 2004; Baron, Biacabe et al., 2007). Or, il a été montré chez la souris transgénique de type bovin que le passage de l'ESB atypique de type L produisait une souche non distinguable de l'ESB (classique) au bout de plusieurs passages (Capobianco, Casalone et al.,

2007). L'ESB aurait alors plutôt comme origine une souche d'ESB atypique que la tremblante classique.

La tremblante atypique a été détectée récemment, des expériences sur le franchissement de la barrière d'espèce ont été lancées sur des modèles de souris transgéniques. A ce jour, seule une communication orale a fait état d'un franchissement possible de la barrière d'espèce par l'agent de la tremblante atypique (Andréoletti, Herva et al., 2008). Il s'agit d'une transmission depuis des ovins infectés expérimentalement (souche PS152) vers une lignée de souris transgénique exprimant la PRNP porcine (Tg Po). Etonnamment, parmi 12 souches d'EST inoculées par voie intracérébrale, seules l'ESB ovine expérimentale, l'ESB bovine et la tremblante atypique étaient transmises à la Tg Po. Après le second passage, le temps d'incubation, le profil lésionnel et le profil biochimique de PrPres de l'ESB ovine, bovine et de la tremblante atypique étaient stabilisés et non différenciables, cette adaptation étant irréversible.

Le passage de l'ESB chez les ovins est possible comme évoqué précédemment et la barrière d'espèce semble assez limitée (Foster, Hope et al., 1993; Foster, Parnham et al., 2001a ; Baylis, Houston et al., 2002). L'étude d'inoculation expérimentale d'ESB à des petits ruminants montre que les caractéristiques de la PrP^{Sc} sont proches mais différentiables pour les deux maladies. De plus, la présentation phénotypique de l'ESB chez les petits ruminants pourrait être différente de celle observée chez les bovins.

L'inoculation de différentes souches à un même individu entraîne une compétition entre les souches. De fait, lors d'inoculation par voie périphérique chez la souris (souche RIII), la période d'incubation correspondant à une souche (22C) associée à une courte incubation (230 jours) se trouve allongée (à 550 jours) par une seconde inoculation 100 à 300 jours après, d'une souche (22A) associée à une période d'incubation longue (550 jours) (Dickinson, Fraser et al., 1975). Cette expérience a été renouvelée pour d'autres souches et d'autres espèces (Morales, Abid et al., 2007). L'implication épidémiologique de ce type de données est cependant à considérer au cas par cas compte tenu de la rareté de ces maladies, surtout si l'on considère des expositions indépendantes. Chez la souris, en cas de coïnfection expérimentale par la tremblante et l'ESB, l'ESB est masquée par la tremblante (Baron and Biacabe, 2001). Chez des ovins coinfectés expérimentalement par l'ESB et la tremblante, la tremblante masquait l'ESB dans le SNC mais pas dans les tissus périphériques (Lantier, 2008). Aucune information n'est connue en cas de coinfection par la tremblante atypique et d'autres souches.

1.4. Pathologie des souches de tremblante ovine

1.4.1. Symptômes cliniques

Tremblante classique

L'âge à l'apparition des signes cliniques de la tremblante classique se situe habituellement entre deux et cinq ans avec un pic à trois ans et demi (âge médian) mais des cas sont décrits chez des animaux de un à sept ans (Parry, 1962 ; Clark and Moar, 1992; Wineland, Detwiler et al., 1998 ; Baylis, Goldmann et al., 2002 ; O'Doherty, Healy et al., 2002 ; Tongue, Wilesmith et al., 2004 ; Cockcroft and Clark, 2006). L'âge d'apparition des signes cliniques varie avec le génotype : les

animaux les plus sensibles déclarent la maladie plus jeunes (Figure 3). La durée d'incubation va de quelques mois chez les animaux VRQ/VRQ à quelques années chez les animaux ARR/ARQ, en général, les animaux les plus sensibles ont la période d'incubation la plus courte (Woolhouse, Stringer et al., 1998 ; Elsen, Amigues et al., 1999; Kao, Gravenor et al., 2002 ; Baylis, Chihota et al., 2004), mais des observations divergentes pourraient être obtenues en raison des différences de souches (O'Doherty, Healy et al., 2002 ; Corbière, Barillet et al., 2007). Par ailleurs la question de l'existence de porteurs asymptomatiques a été soulevée, notamment chez les animaux résistants (Race and Chesbro, 1998; Race, Raines et al., 2001). De fait, il est possible que la longue période d'incubation excède la durée de vie de l'animal malade résultant en porteurs asymptomatiques ou en animaux mourant d'une autre cause à l'état pré-symptomatique ou en phase prodromique et potentiellement infectieux (Hill and Collinge, 2003a; Hill and Collinge, 2003b; Georgsson, Adolfsdottir et al., 2008).

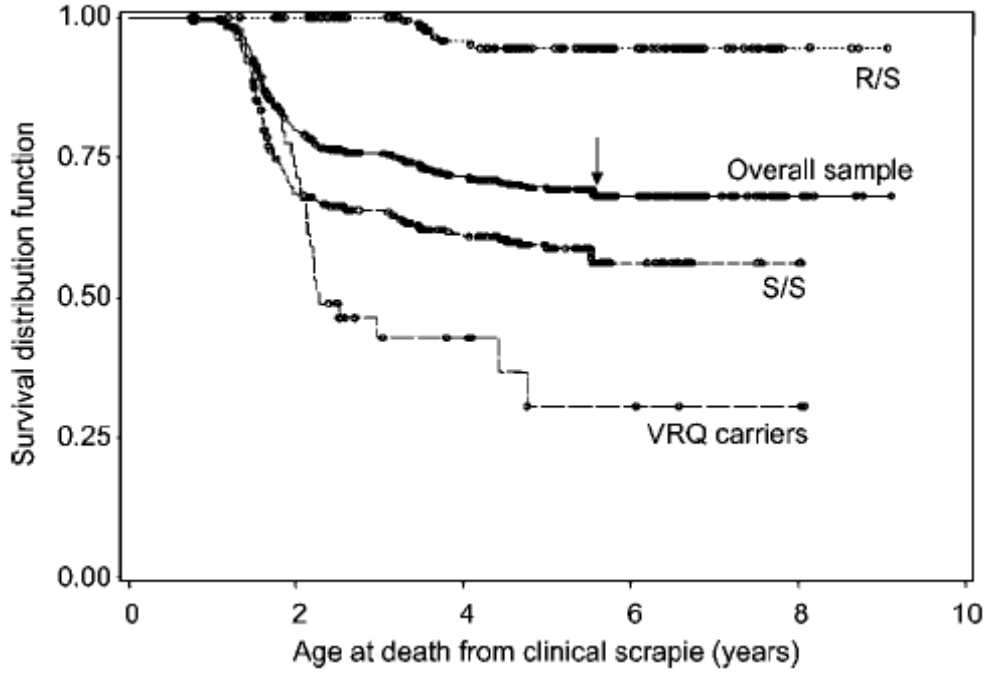


Figure 3 : Courbe de survie de type Kaplan-Meier des animaux morts de tremblante dans une étude de cohorte de six troupeaux de race Manech tête rousse (Corbière, Barillet et al., 2007)

En ordonnées : fonction de distribution de la probabilité de survie, en abscisses : âge de mort clinique de tremblante. Overall sample : courbe pour les 604 animaux incus dans l'étude, R/S : 212 animaux de génotype ARR/ARQ, ARR/AHQ ou ARR/VRQ, S/S 343 animaux de génoptype ARQ/ARQ ou AHQ/ARQ, VRQ carriers : 49 animaux de génotype ARQ/VRQ, AHQ/VRQ ou VRQ/VRQ. Les animaux perdus de vue sont marqués par un cercle vide, le dernier cas clinique observé (5,54 ans) est indiqué par une flèche.

La phase clinique dure habituellement entre quatre et six mois (Parry, 1983; Detwiler and Baylis, 2003). Les manifestations cliniques sont nombreuses et variables, notamment en fonction des souches et du génotype de l'animal affecté. Il n'y a pas de signes pathognomoniques, cependant, l'association des différents signes est assez évocatrice (Cockcroft and Clark, 2006). Les symptômes sont par ordre de fréquence décroissante (D'Angelo, Maurella et al., 2007) : de l'amaigrissement, un déficit proprioceptif, de l'ataxie, le grincements de dents, de la rigidité, des modifications

comportementales fréquemment des signes d'anxiété, parfois d'agressivité, du ptyalisme, un prurit intense accompagné de pertes de laine et de plaies d'automutilation, des tremblements, une parésie, une paralysie, de l'hypermétrie.

Tremblante atypique

L'âge d'apparition des symptômes cliniques des cas en tremblante atypique est moins bien décrit que pour la tremblante classique car la plupart des cas ont été détectés par la surveillance active et beaucoup plus rarement par la surveillance clinique. Cependant, dans ces conditions de détection, les cas de tremblante atypique sont en moyenne plus âgés que les cas de tremblante classique (Figure 4). La moyenne semble se situer vers six ans et demi (Benestad, Arsac et al., 2008) et, dans une étude, 16 cas sur 60 avaient plus de 10 ans (Lühken, Buschmann et al., 2007). Il est vraisemblable qu'une part importante des cas potentiels sont tués ou meurent d'une autre cause avant l'apparition des signes cliniques.

Les expériences d'inoculation ont indiqué une durée d'incubation particulièrement longue par rapport à la tremblante classique, 314 jours chez le mouton (n=1) et entre 200 et 300 jours chez la souris transgénique ovinisée (souche tg338) (Le Dur, Béringue et al., 2005 ; Simmons, Konold et al., 2007 ; Andréoletti, Herva et al., 2008), ce qui est à rapprocher de l'âge élevé des cas en conditions naturelles.

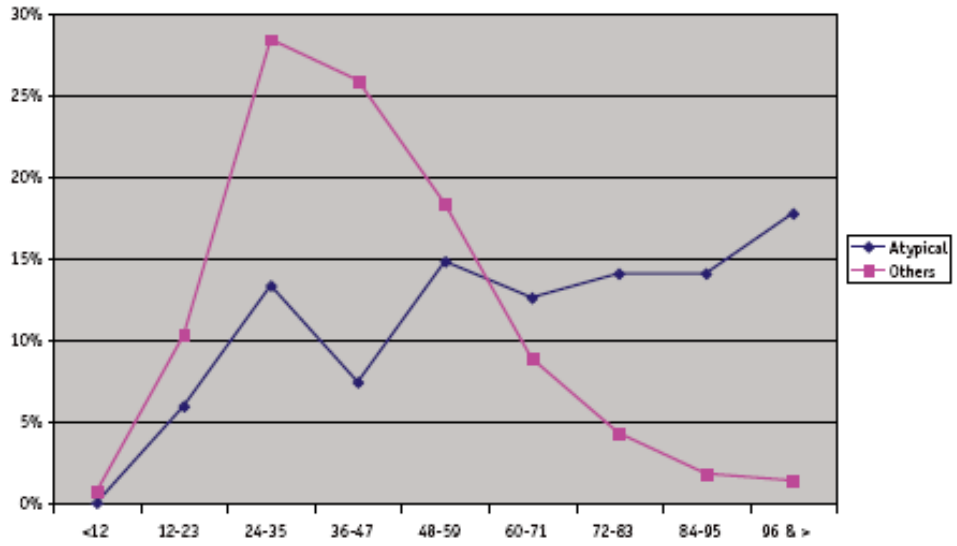


Figure 4 : Distribution de l'âge des cas de tremblante détectés par la surveillance active en 2005 dans l'Union Européenne (European Commission, 2006b)

En ordonnées proportion de cas, en abscisses : âge des cas en mois. En bleu cas de tremblante atypique, en violet : autre type de tremblante (tremblante classique)

Dans certaines circonstances, des manifestations cliniques de tremblante atypique ont pu être observées (Benestad, Sarradin et al., 2003; Onnasch, Gunn et al., 2004; Epstein, Pointing et al., 2005 ; Konold, Davis et al., 2007; Simmons, Konold et al., 2007 ; Simmons, Simmons et al., 2009) et même filmées (Konold, Davis et al., 2007 ; Simmons, Konold et al., 2007). Les symptômes les plus fréquemment rapportés sont des changements de comportement, de l'amaigrissement, de l'ataxie et une marche en cercle. Le prurit et les tremblements ne sont généralement pas observés ou alors

de façon discrète. L'examen approfondi de deux cas a également permis de mettre en évidence un déficit proprioceptif, notamment une perte du réflexe palpébral (Konold, Davis et al., 2007). L'influence du génotype sur les manifestations cliniques ou la période d'incubation n'est pas documentée.

1.4.2. Physiopathologie

Tremblante classique

Les principales connaissances en physiopathologie de la tremblante ont été acquises pour la tremblante classique et reposent sur des études expérimentales chez des ovins (Pattison, 1974; Andréoletti, Berthon et al., 2000; van Keulen, Schreuder et al., 2000 ; Andréoletti, Lacroux et al., 2002; Andréoletti, Simon et al., 2004 ; Konold, Moore et al., 2008 ; Lacroux, Simon et al., 2008) et chez des rongeurs (Kimberlin and Walker, 1979 ; Kimberlin and Walker, 1989 ; Beekes, Baldauf et al., 1996 ; Baldauf, Beekes et al., 1997 ; McBride, Schulz-Schaeffer et al., 2001 ; Bartz, Kincaid et al., 2003; Bartz, Dejoia et al., 2005 ; Beekes and McBride, 2007).

La voie orale est considérée comme la porte d'entrée essentielle de l'agent infectieux (Pattison, 1974; van Keulen, Schreuder et al., 2000 ; van Keulen, Bossers et al., 2008) même si d'autres voies d'infection ont été décrites comme la voie sous cutanée (Dickinson, 1976) et conjonctive (Scott, Foster et al., 1993) ou sont suspectées comme la voie intra-nasale (Corona, Porcario et al., 2009). La voie verticale *sensus stricto,* longtemps suspectée en raison de l'infectiosité du placenta, ne semble plus considérée comme importante (Foster, Hope et al., 1993; Foster, Hunter et al., 1996; Foster, McKenzie et al., 2006b; van Keulen, Bossers et al., 2008).

Typiquement, chez les ovins les plus sensibles, de génotype VRQ/VRQ, après ingestion d'aliments contaminés, l'agent infectieux pénètre dans l'organisme au niveau des formations lymphoïdes du tractus digestif, le Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT) essentiellement les plaques de Peyer, mais aussi secondairement des amygdales. Le rôle des formations lymphoïdes dans la réplication de l'agent infectieux n'est pas encore complètement compris, les nœuds lymphatiques associés au GALT et aux amygdales et la rate pourrait avoir un rôle (Kimberlin and Walker, 1979). La contamination a lieu généralement durant les premiers mois de vie des animaux et semble corrélée au développement des tissus lymphoïdes (St Rose, Hunter et al., 2006). La réplication dans ces tissus est assez précoce, l'infectiosité est retrouvée fréquemment dès trois mois après contamination néonatale dans les amygdales et le GALT (Andréoletti, Berthon et al., 2000; van Keulen, Schreuder et al., 2000). Des méthodes de diagnostic précoce reposent sur la mise en évidence de PrP^{Sc} dans les amygdales, la muqueuse rectale et la membrane nictitante (troisième paupière) (Schreuder, van Keulen et al., 1996 ; Jeffrey, Begara-McGorum et al., 2002)

Dans un second temps, la neuro-invasion se fait depuis les tissus nerveux périphériques vers le SNC. L'invasion du SNC à partir du système nerveux entérique peut se faire par voie parasympathique ou orthosympathique. Le nerf vague joue fréquemment, mais pas systématiquement (Baldauf, Beekes et al., 1997), un rôle de porte d'entrée dans le SNC, ce qui se traduit pas une atteinte précoce des noyaux moteurs dorsaux du nerf vague situés dans le tronc cérébral, dans la région de l'obex. Dans d'autre circonstances, la neuro-invasion suit le nerf splanchnique, aboutit aux ganglions cœliaques et mésentériques et pénètre le SNC en zone thoracique par la moelle épinière (Kimberlin and Walker, 1982 ; van Keulen, Schreuder et al.,

1996; van Keulen, Schreuder et al., 1999; van Keulen, Schreuder et al., 2000; McBride, Schulz-Schaeffer et al., 2001 ; van Keulen, Vromans et al., 2002). L'invasion du SNC survient généralement à partir de neuf à dix mois et l'obex est la région du SNC où le diagnostic peut être établi le plus précocement (van Keulen, Schreudrer et al., 1995 ; Wood, McGill et al., 1997).

A partir du SNC, on assiste à une dissémination centrifuge vers de nombreux tissus périphériques, notamment, par ordre de titre infectieux croissant : le sang, (Houston, Foster et al., 2000; Hunter, Foster et al., 2002), les muscles (Andréoletti, Simon et al., 2004), le lait (Konold, Moore et al., 2008; Lacroux, Simon et al., 2008), le placenta (Pattison, Hoare et al., 1972 ; Pattison, Hoare et al., 1974; Andréoletti, Lacroux et al., 2002). Concernant le placenta, il est intéressant de constater que l'infectiosité dépend du génotype du fœtus et de la mère (Lacroux, Corbière et al., 2007), le placenta associé à une brebis ARR/VRQ n'est pas infectieux. Les autres tissus dans lesquels de la PrP^{Sc} ont été détectés incluent les glandes salivaires (Vascellari, Nonno et al., 2007), la mamelle en condition d'infiltration lymphocytaire (mammite, maladie Maedi-Visna) (Ligios, Sigurdson et al., 2005), le rein (Siso, Gonzalez et al., 2006), la muqueuse nasale (Corona, Porcario et al., 2009) et la peau (Thomzig, Schulz-Schaeffer et al., 2007).

Il existe d'importantes variations de la localisation de la PrP^{Sc} en fonction du génotype des animaux (González, Martin et al., 2002; Jeffrey and González, 2007). Par exemple, chez les animaux ARR/VRQ on n'observe pas de phase d'invasion lymphocytaire (van Keulen, Bossers et al., 2008). L'extension de la PrP^{Sc} dans l'organisme diminue quand la résistance génétique augmente. Les rares observations de PrP^{Sc} chez les animaux porteurs d'allèle ARR ou AHQ suggèrent que celle-ci est absente ou présente à des niveaux se situant sous le seuil de détectabilité.

Les expériences d'inoculation d'ESB à des ovins ont montré que la physiopathologie et le développement de lésions différaient peu de ce qui a été observé pour la tremblante classique (Foster, Parnham et al., 2001a; Foster, Parnham et al., 2001b ; Bruce, Boyle et al., 2002; Foster, Goldmann et al., 2004; Andréoletti, Morel et al., 2006; Jeffrey, González et al., 2006). La transmission horizontale de l'ESB chez les ovins a été documentée dans un troupeau expérimental (Bellworthy, Dexter et al., 2005) et la transmission verticale semble limitée (Foster, Goldmann et al., 2004).

Tremblante atypique

La physiopathologie de la tremblante atypique est très peu connue (Benestad, Arsac et al., 2008). Les infections expérimentales ont eu lieu par inoculation intracérébrale (Le Dur, Béringue et al., 2005 ; Simmons, Konold et al., 2007 ; Andréoletti, Herva et al., 2008) et peu de cas naturels ont pu avoir d'autres tissus que le tronc cérébral examinés (Benestad, Sarradin et al., 2003; Onnasch, Gunn et al., 2004 ; Orge, Galo et al., 2004 ; Konold, Davis et al., 2007 ; Nentwig, Oevermann et al., 2007; Seuberlich, Botteron et al., 2007; Benestad, Arsac et al., 2008 ; Dagleish, Rodger et al., 2008; Foster, Toovey et al., 2008; Sofianidis, Psychas et al., 2008; Simmons, Simmons et al., 2009). Le noyau dorsal moteur du nerf vague est intact et aucune présence de PrP^{Sc} n'a été rapportée en dehors du SNC. Au niveau du SNC, la PrP^{Sc} et les lésions sont principalement présentes au niveau du cervelet et de façon inconstante dans le tronc cérébral et dans le cerveau. La localisation des lésions évoque celle retrouvée dans le GSS (Benestad, Sarradin et al., 2003) mise à part la communication orale faisant état d'un marquage du nerf sciatique observé en phase terminale sur un ovin infecté par inoculation intracérébrale (Andréoletti, Herva et al., 2008). De façon plus

surprenante cette même expérience a permis de détecter de l'infectiosité dans un nœud lymphatique pré-scapulaire sans détection de PrP^{Sc} (Andréoletti, Herva et al., 2008). Le manque de corrélation entre infectiosité et détection de PrP^{Sc} avait également été souligné par l'excellent taux de transmission obtenu à partir de tissus nerveux avec un faible marquage par la PrP^{Sc} (Le Dur, Béringue et al., 2005 ; Simmons, Konold et al., 2007). Cela pourrait s'interpréter par la difficulté à détecter la PrP^{Sc} dans la tremblante atypique ou par le fait que la fraction infectieuse est corrélée à des formes de PrP difficiles à mettre en évidence. Dans les deux cas, cette présence d'infectiosité ou de PrP^{Sc} dans des tissus périphériques correspond à une diffusion centrifuge de l'agent.

1.4.3. Etiologie

Tremblante classique

Aujourd'hui, il est communément admis que le développement de la tremblante classique requiert l'exposition à un agent infectieux (Detwiler and Baylis, 2003). La voie de contamination et le mode de transmission sont intimement liés et dépendent des matières virulentes et de l'exposition à l'agent infectieux.

La transmission verticale par voie paternelle semble improbable, compte tenu de l'apparente absence d'infectiosité du sperme (Palmer, 1959; Wrathall, 1997 ; Sarradin, Melo et al., 2008).

La transmission verticale par voie maternelle *sensu stricto,* c'est-à-dire *in utero* ou via les ovocytes, est incertaine (Wrathall, Holyoak et al., 2008). Cette voie était fortement suspectée du fait de l'infectiosité du placenta (Race, Jenny et al., 1998; Andréoletti, Lacroux et al., 2002) mais les connaissances sur la localisation histologique exacte de l'infectiosité du placenta indiquent que la contamination se produirait plutôt à la naissance (Lacroux, Corbière et al., 2007). Les expériences de transferts d'embryons ont donné des résultats contradictoires, certains montrant l'absence de contamination *in utero* (Foote, Call et al., 1986; Wang, Foote et al., 2001), d'autres obtenant des fœtus contaminés (Foster, McKelvey et al., 1992 ; Foster, Hunter et al., 1996) mais peut être en raison de failles dans les protocoles (Wrathall, Holyoak et al., 2008).

La transmission horizontale est la voie de transmission la plus importante sur le plan épidémiologique (Stringer, Hunter et al., 1998 ; Detwiler and Baylis, 2003 ; Touzeau, Chase-Topping et al., 2006). De nombreuses études épidémiologiques ont montré le caractère contagieux de la maladie. Les introductions d'animaux, les contacts entre troupeaux sont d'ailleurs des facteurs de risque bien établis (Wilson, 1951 ; Pattison, 1964 ; Hoinville, 1996 ; Hopp, Ulvund et al., 2001 ; Healy, Hannon et al., 2004 ; Philippe, Ducrot et al., 2005 ; Green, Del Rio Vilas et al., 2007).

Il semble que la plupart du temps, la contamination a lieu durant les premiers mois de vie des animaux (Andréoletti, Berthon et al., 2000 ; Heggebo, Press et al., 2000) et que leur susceptibilité décroisse avec l'âge (Hunter, Foster et al., 1996 ; Elsen, Amigues et al., 1999 ; Baylis, Chihota et al., 2004). Ceci peut être expliqué par la maturation du système lymphocytaire (St Rose, Hunter et al., 2006) ou l'évolution de la physiologie du tube digestif, notamment des conditions du rumen (Scherbel, Pichner et al., 2006). Cependant, des contaminations d'adultes ont également été rapportées (Dickinson, Stamp et al., 1974 ; Ryder, Dexter et al., 2004 ; Foster, McKenzie et al., 2006a).

La voie de contamination orale est la plus importante et peut impliquer différentes sources de matières virulentes.

Le placenta joue un rôle important dans la diffusion de la maladie au sein d'un troupeau (Hopp, Ulvund et al., 2001; Healy, Hannon et al., 2004) par transmission pseudo-verticale ou par transmission horizontale via un comportement de léchage ou via un environnement contaminé.

Le lait pourrait également être un facteur de contamination orale, principalement pseudo-verticale ou éventuellement via l'utilisation de laits de substitution (Konold, Moore et al., 2008; Lacroux, Simon et al., 2008). Il y a peu d'indication sur son importance épidémiologique, une étude cas-témoins a trouvé une association entre la distribution de lactoremplaceurs, plus particulièrement en provenance d'un certain fabricant, et le risque de tremblante classique (Philippe, Ducrot et al., 2005). Cependant les compléments alimentaires issus de ce fabricant étaient également à risque et les auteurs considéraient qu'il était difficile de différencier l'effet complément de l'effet lactoremplaceur.

Le recyclage de carcasses d'animaux infectés via les farines animales et principalement les FVO, a constitué par le passé une voie possible pour la contamination orale. Ce mode de contamination a été mis en évidence pour l'agent de l'ESB dans les populations bovines (Wilesmith, Wells et al., 1988; Wilesmith, Ryan et al., 1991; Wilesmith, Ryan et al., 1992). Il est vraisemblable, vu les propriétés similaires de l'agent de l'ESB et de l'agent de la tremblante, qu'une exposition alimentaire des ovins par l'agent de la tremblante et de l'ESB ait eu lieu. Une étude épidémiologique française a montré un lien entre la survenue de tremblante et l'approvisionnement en concentrés alimentaires du commerce (Philippe, Ducrot et al., 2005). Consécutivement aux différentes vagues d'interdiction des farines animales dans l'alimentation des ruminants, cette source aura dû diminuer progressivement pour atteindre un niveau nul à partir de la fin de l'année 2001, le temps que les mesures d'interdiction totale de l'usage des farines animales soient effectives.

Compte tenu de la grande résistance de l'agent responsable de la tremblante classique, l'environnement peut jouer le rôle de réservoir. Des études expérimentales ont montré que des tissus infectieux étaient toujours virulents après plusieurs années d'enfouissement dans la terre (Brown and Gajdusek, 1991; Johnson, Phillips et al., 2006 ; Seidel, Thomzig et al., 2007). De plus, des études épidémiologiques ont indiqué des liens possibles entre la structure du sol et la prévalence de la tremblante (Imrie, Korre et al., 2008) et en Islande, une étude a suspecté la résurgence de tremblante à partir de l'environnement au bout de 16 ans (Georgsson, Sigurdarson et al., 2006). La contamination du sol peut se faire par les nombreuses matières virulentes potentielles évoquées précédemment, les fèces pourraient être infectieuses comme montré chez le hamster (Safar, Lessard et al., 2008; Kruger, Thomzig et al., 2009) et les carcasses éventuelles d'animaux mort à un stade clinique et laissées à l'abandon. Il est également possible que l'épandage de fumier contaminé constitue un mode de diffusion supplémentaire de l'agent infectieux dans l'environnement.

La contamination latérale directe a été mise en évidence à plusieurs reprises (Pattison, 1964; Ryder, Dexter et al., 2004; Foster, McKenzie et al., 2006a; Konold, Moore et al., 2008). Les

modalités de contamination n'ont pas été déterminées, mais compte tenu de la large diffusion périphérique de la PrP^{Sc} en fin d'incubation, de nombreuses matières pourraient être virulentes. La pénétration de l'agent infectieux pourrait se faire par la voie orale, la voie olfactive (Doty, 2008; Corona, Porcario et al., 2009) ou par la voie iatrogène. La contamination iatrogène est possible notamment par inoculation sous cutanée (Stamp, Brotherston et al., 1959 ; Glaysher and Mabbott, 2007) et a plusieurs reprises des épisodes de tremblante ont été provoqués par l'utilisation de lots de vaccins contaminés (Greig, 1950; Mechelli and Mantovani, 1988). La contamination de plaies accidentelles ou chirurgicales par des vecteurs biologiques ou inanimés pourrait également constituer un mode de transmission, plus anecdotique (Detwiler and Baylis, 2003).

Tremblante atypique

Contrairement à la tremblante classique, il n'est pas certain que le développement de la tremblante atypique nécessite l'exposition à un agent infectieux.

Les cas ne semblent pas partager de liens épidémiologiques évidents (Benestad, Sarradin et al., 2003; Green, Del Rio Vilas et al., 2007; Lühken, Buschmann et al., 2007) et des cas sont apparus dans un troupeau d'animaux destinés à un programme de recherche et présumés indemnes sans qu'aucun source de contamination soit identifiée (Simmons, Simmons et al., 2009). Les cas secondaires, c'est-à-dire ceux détectés dans un troupeau à la suite d'un cas index, semblent également assez rares (Benestad, Sarradin et al., 2003; Onnasch, Gunn et al., 2004; Konold, Davis et al., 2007; Lühken, Buschmann et al., 2007). Préalablement à ces travaux, deux études épidémiologiques ont porté sur la tremblante atypique et n'ont pas trouvé de facteur de risque associés à une origine contagieuse (Hopp, Omer et al., 2006; Green, Del Rio Vilas et al., 2007).

Ces données, ainsi que les éléments de physiopathologie, suggèrent que la maladie aurait une origine endogène. Le développement serait alors influencé par la génétique et éventuellement par d'autres facteurs de risque (Benestad, Sarradin et al., 2003 ; Benestad, Arsac et al., 2008). Une enquête étiologique, réalisée sur une quarantaine de cas en Norvège, a trouvé que l'alimentation minérale et vitaminique était un facteur de risque ce qui a été interprété comme un effet propre des minéraux ou des vitamines plus qu'un risque de contamination par un agent infectieux compte tenu du contexte épidémiologique et réglementaire de la Norvège (Hopp, Omer et al., 2006). Dans cette étude, le retrait du placenta était une mesure protectrice mais l'identification de la présence de chien comme facteur de risque indiquait vraisemblablement la présence d'associations purement dues au hasard.

1.5. Diagnostic de la tremblante

Compte tenu du caractère protéiforme des symptômes de la tremblante, le diagnostic différentiel inclue de nombreuses maladies et l'examen clinique ne permet que d'émettre une suspicion. Cela est encore plus vrai dans le cas de tremblante atypique pour laquelle les symptômes sont assez frustes.

Le diagnostic de confirmation des différentes formes de tremblante passe par l'examen de laboratoire. En l'absence de réaction immunologique humorale, il n'y a pas la possibilité de rechercher des anticorps. Actuellement, plusieurs approches diagnostiques sont utilisables.

Certaines méthodes sont quasiment abandonnées, comme la mise en évidence des SAF par microscopie électronique (Merz, Rohwer et al., 1984), méthode spécifique mais peu sensible (Rubenstein, Merz et al., 1987) et trop lourde pour être utilisée en routine. Elle présente cependant un intérêt pour les échantillons en mauvais état de conservation (Chaplin, Aldrich et al., 1998).

D'autres méthodes sont en cours de développement comme les techniques d'amplification de la PrP^{Sc} par PMCA à partir de prélèvements sanguins mais ces méthodes prometteuses ne sont pas encore utilisables en routine (Supattapone, 2004; Grassi, Maillet et al., 2008). Actuellement, la plupart des méthodes reposent sur un diagnostic post-mortem de la maladie à un stade clinique ou préclinique.

1.5.1. Prélèvements et souche de tremblante

Quelle que soit la technique employée, l'issue du diagnostic est très liée à la nature du prélèvement dont la positivité dépend de la souche, du stade de la maladie et de la génétique de l'hôte (Ligios, Jeffrey et al., 2002).

Pour la tremblante classique, des lésions sont toujours retrouvées dans le tronc cérébral, en particulier au niveau de l'obex et plus précisément du noyau moteur dorsal du nerf vague, de façon assez précoce par rapport aux autres régions du SNC (van Keulen, Schreudrer et al., 1995 ; González, Martin et al., 2002). La positivité des prélèvements de cervelet, de cortex frontal et occipital est inconstante (Chaplin, Barlow et al., 2002). Les prélèvements de formations lymphoïdes secondaires comme les amygdales, la muqueuse rectale, la membrane nictitante ou les nœuds lymphatiques rétro pharyngiens permettent un diagnostic pour la tremblante classique et pour l'ESB (van Keulen, Schreuder et al., 1996 ; Schreuder, Van Keulen et al., 1998; O'Rourke, Baszler et al., 2000 ; González, Jeffrey et al., 2005 ; Langeveld, Jacobs et al., 2006). Certains de ces tissus, plus accessibles que le SNC, peuvent être prélevés du vivant de l'animal et ils permettent un diagnostic de la tremblante classique précoce et souvent plus sensible que celui obtenu par examen du tronc cérébral (González, Dagleish et al., 2006; Reckzeh, Hoffmann et al., 2007 ; Georgsson, Adolfsdottir et al., 2008).

Pour la tremblante atypique, les données sont moins complètes que pour la tremblante classique ou l'ESB, mais les différences sont notoires. Vidal et al. ont représenté la positivité de prélèvements provenant de deux cas de tremblante classique et d'un cas de tremblante atypique (Figure 5)(Vidal, Tortosa et al., 2007). Ce diagramme illustre bien la différence entre les deux types de tremblante, mais il ne suffit pas à montrer la diversité des situations rencontrées en tremblante atypique. Au niveau du tronc cérébral, la positivité est inconstante, l'obex est souvent négatif, le noyau moteur dorsal du nerf vague est toujours négatif et le noyau du tractus spinal du nerf trigéminé est occasionnellement atteint (Benestad, Sarradin et al., 2003 ; Buschmann, Biacabe et al., 2004; Buschmann, Lühken et al., 2004 ; Gavier-Widen, Nöremark et al., 2004; Onnasch, Gunn et al., 2004 ; Konold, Davis et al., 2007; Simmons, Simmons et al., 2009). Contrairement à la tremblante classique, le cervelet est le plus souvent atteint (Benestad, Sarradin et al., 2003 ;

Gavier-Widen, Nöremark et al., 2004; Onnasch, Gunn et al., 2004 ; Orge, Galo et al., 2004; Konold, Davis et al., 2007 ; Vidal, Tortosa et al., 2007 ; Simmons, Simmons et al., 2009) mais pas systématiquement (Nentwig, Oevermann et al., 2007). Le cortex cérébral est fréquemment positif avec des variations entre individus, a priori sans relation avec le génotype (Benestad, Sarradin et al., 2003 ; Gavier-Widen, Nöremark et al., 2004; Onnasch, Gunn et al., 2004 ; Nentwig, Oevermann et al., 2007; Simmons, Konold et al., 2007 ; Andréoletti, Herva et al., 2008 ; Simmons, Simmons et al., 2009). Le meilleur prélèvement pour la tremblante atypique pourrait être le cervelet (European Food Safety Autority, 2005b; European Food Safety Autority, 2005c; European Food Safety Autority, 2005a).

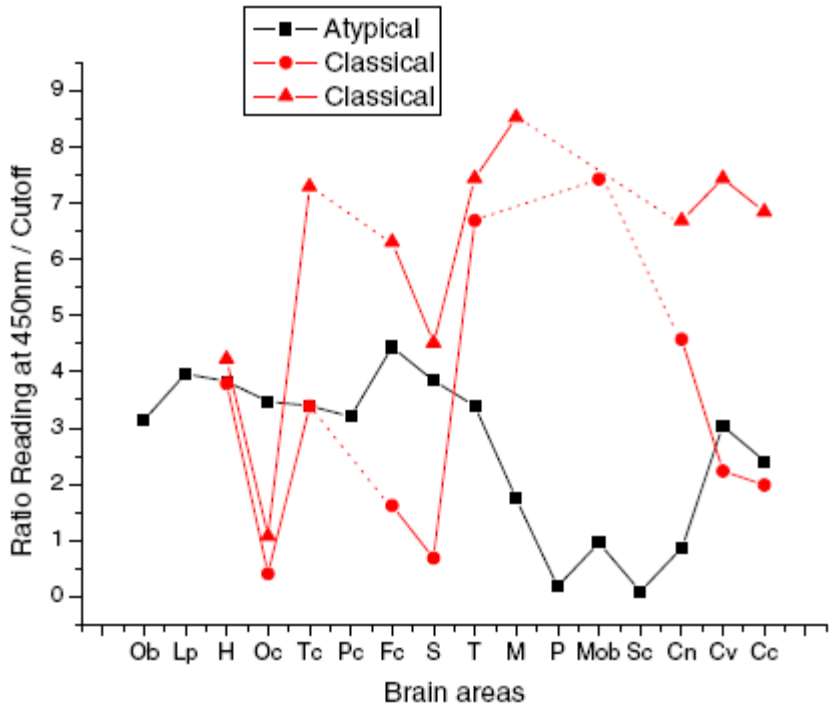


Figure 5 : Prélèvements de cerveau et positivité à la tremblante atypique et classique, d'après Vidal 2007 (Vidal, Tortosa et al., 2007)

En noir : tremblante atypique (n=1), en rouge : tremblante classique (n=2).En ordonnées : ratio entre densité optique et seuil de positivité du test ELISA utilisé pour le diagnostic, en abscisses : zone de prélèvement.

Ob : bulbe olfactif, Lp : lobe piriforme, H : hippocampe, Fc : cortex frontal, Tc : cortex temporal, Pc : cortex pariétal, Oc : cortex occipital, S : striatum avec noyaux caudés et lenticulaires, T : thalamus, M : mésencéphale, P : pont, Mob : medulla oblongata, Sc : Moelle épinière (moelle spinale), Cv : vermis cérébelleux , Cm : Substance blanche cérébelleuse, Cc : hémisphères cérébelleux. La zone du tronc cérébral est la moins positive pour la tremblante atypique.

Les organes lymphoïdes périphériques n'ont été trouvés positifs dans aucune étude (Benestad, Sarradin et al., 2003 ; Konold, Davis et al., 2007 ; Nentwig, Oevermann et al., 2007 ; Simmons, Konold et al., 2007 ; Vidal, Tortosa et al., 2007 ; Simmons, Simmons et al., 2009). Une seule communication orale, évoquée précédemment, a fait état de la présence de prélèvements positifs dans le nerf sciatique et au niveau du ganglion prescapulaire chez des animaux infectés par inoculation intracérébrale (Andréoletti, Herva et al., 2008). Les tissus périphériques ne constituent donc pas un bon prélèvement pour le dépistage de la tremblante atypique.

Par ailleurs, l'évolution de la sensibilité des différents prélèvements, en fonction du développement de la maladie ou du génotype, est inconnue.

1.5.2. Histologie et immuno-histochimie

L'observation au microscope des lésions caractéristiques a été très utilisée pour le diagnostic de confirmation de la tremblante (Besnoit, 1898; Stockman, 1926 ; Delez, Gustafson et al., 1957). La vacuolisation des neurones et éventuellement des cellules gliales sont des lésions caractéristiques des EST. Elles sont accompagnées de mort neuronale, de prolifération des astrocytes et de façon inconstante d'accumulation de plaques amyloïdes.

Il n'y a pas toujours de corrélation entre l'intensité des lésions et la sévérité clinique (Fraser, 1976 ; Miller, Jenny et al., 1993) et celles-ci peuvent être particulièrement discrètes en début de phase clinique.

L'histologie est une technique longue pour un diagnostic de routine, de plus le résultat peut être faussé par des artefacts de préparation et manquer de sensibilité en fonction du stade de développement de la maladie (Hamir, Miller et al., 2001) et de la souche considérée (European Food Safety Autority, 2005a).

Grâce au développement d'anticorps monoclonaux visant spécifiquement certains épitopes de la PrP^{Sc}, il a été possible de faire évoluer le diagnostic histologique vers un diagnostic immuno-histochimique (IHC) (Bruce, Mc Bride et al., 1989 ; Diedrich, Bendheim et al., 1991 ; Miller, Jenny et al., 1993). L'IHC est une technique très spécifique mais sa sensibilité dépend fortement des prélèvements.

Le diagnostic par IHC met en évidence les dépôts de PrP^{Sc} sur des préparations tissulaires ce qui permet un diagnostic spécifique et plus précoce que l'histopathologie. L'IHC peut également être utilisée sur des prélèvements partiellement lysés (Miller, Jenny et al., 1993 ; Chaplin, Barlow et al., 2002). Cependant, l'IHC est une technique lourde à mettre en place, nécessitant un important niveau d'expertise technique, qui est réservée à la confirmation des cas difficiles et à la recherche.

La conservation de l'intégrité des tissus permet d'établir le profil lésionnel utile à la caractérisation des souches (Bruce, Mc Bride et al., 1989). Pour établir correctement le profil lésionnel, il convient de disposer de coupes du SNC en plusieurs emplacements standardisés et ce qui implique que la zone prélevée soit importante, ce qui n'est pas le cas dans les conditions de surveillance active.

Tous les anticorps utilisables en IHC pour le diagnostic de la tremblante classique sont également utilisables pour la tremblante atypique (Gretzschel, Buschmann et al., 2006).

1.5.3. Western blot

La technique de Western Blot est une des méthodes de référence pour l'Office International des Epizooties (OIE), sa spécificité est excellente mais sa sensibilité varie en fonction des prélèvements (OIE, 2004). L'échantillon est broyé, soumis à un traitement détergent pour purifier la PrP^{Sc} puis centrifugé pour concentrer la PrP^{Sc}, et soumis à une digestion par la PK pour ne laisser que le mélange de protéines constituant la PrP-res. Ces différents constituants sont séparés sur gel par

électrophorèse et révélés au moyen d'anticorps spécifiques (Rubenstein, Merz et al., 1987 ; Race, Ernst et al., 1992).

En raison de la plus grande sensibilité à la PK de la PrP^{Sc} associée à la tremblante atypique, le Western Blot, dans les conditions recommandées par l'OIE, ne permet pas le diagnostic de la tremblante atypique. En effet, la PrP^{Sc} est entièrement dégradée et le résultat d'analyse est négatif (Benestad, Sarradin et al., 2003 ; Buschmann, Biacabe et al., 2004; Buschmann, Lühken et al., 2004 ; European Food Safety Autority, 2005a). Pour le diagnostic de la tremblante atypique par Western Blot il convient donc d'utiliser un protocole modifié avec un traitement à la PK modéré (European Food Safety Autority, 2005b).

Lors du diagnostic d'EST par Western-Blot, le profil de migration de la PrP-res permet la différenciation de certaines souches d'EST, en particulier selon : i) le poids moléculaire de sa forme non-glycosylée, ii) la répartition entre ses différents glycoformes et iii) l'immunoréactivité différentielle obtenue avec différents anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes séquentiels distincts.
D'après ce principe, l'étude du profil de la PrP-res permet la distinction entre l'ESB transmise expérimentalement et la tremblante classique, dont l'isolat CH1641 qui présente des caractéristiques proches de l'ESB (Baron, Madec et al., 2000 ; Stack, Chaplin et al., 2002 ; Baron, Crozet et al., 2004 ; Baron, Biacabe et al., 2007), ces trois souches présentant des profils à trois bandes (27, 24 et 19 kd). Pour la tremblante atypique, on observe un profil caractéristique à 5 bandes avec la présence de bandes à 31, 27, 21, 17 et 11 kDa (Figure 6) (Benestad, Sarradin et al., 2003 ; Buschmann, Biacabe et al., 2004; Buschmann, Lühken et al., 2004 ; European Food Safety Autority, 2005c ; Arsac, Andréoletti et al., 2007).

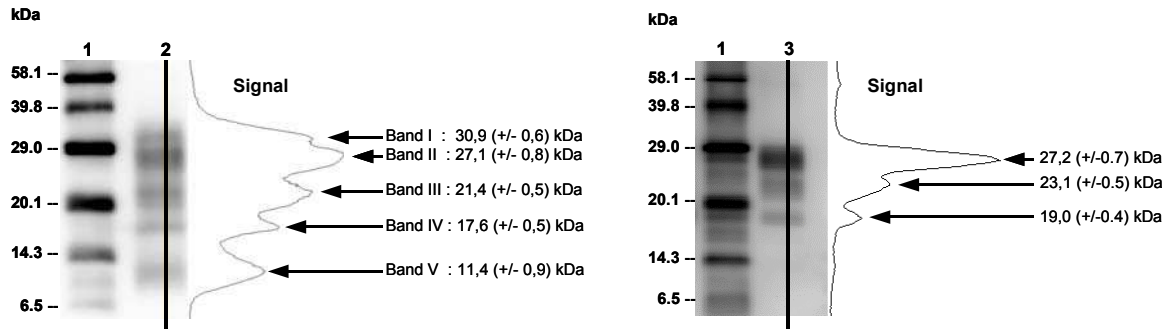


Figure 6 : Profil électrophorétique de PrP^{Sc} résolu par WesterBlot (Arsac, Andréoletti et al., 2007)

Bande 1 : poids moléculaires de références en kd, 2 : Tremblante atypique, 3 : Tremblante classique, Signal : densité optique des différentes bandes, proportionnel à leur abondance respective

Toutefois, cette méthode ne permet pas toujours de différencier certaines souches de tremblante classique de l'ESB (Baron, Crozet et al., 2004 ; Baron, Biacabe et al., 2007). Dans ce cas, des inoculations sur souris transgéniques sont utilisées pour différencier les souches, en se basant sur les différences de périodes d'incubation, de profil lésionnels et les caractéristiques biochimiques de la PrP^{Sc}. L'inoculation est la méthode la plus sensible mais le temps d'incubation est long, entre 170 et 700 jours et 408 jours en moyenne pour l'ESB chez les souris RIII (revue par Gavier-Widen,

Stack et al., 2005), entre 200 et 300 jours chez la souris transgénique ovinisée (souche tg338) (Le Dur, Béringue et al., 2005 ; Simmons, Konold et al., 2007).

1.5.4. Tests rapides

Les méthodes d'IHC ou de Western Blot ne sont pas utilisables en routine car trop lourdes à mettre en œuvre. En se basant sur la mise en évidence de la PrP^{Sc}, des tests rapides, utilisables en routine, ont été développés à l'échelle commerciale pour le dépistage de l'ESB chez les bovins (Moynagh and Schimmel, 1999; Deslys and Grassi, 2005).

Les tests rapides utilisés actuellement reposent sur différents principes :

- l'Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) direct ou indirect associé à une digestion par la PK pour les tests suivants : Enfer TSE Test, version 1.0 et version 2.0 Technology Ltd ; les tests BioRad TeSeE également appelé Platelia BioRad et le test BioRad TeSeE sheep/goat, développés par le Commissariat à l'énergie atomique (CEA) et commercialisés par la société BioRad ; le test Prionics Check LIA SR (small ruminants) ;
- un test immunologique ELISA sans digestion par la PK pour le test Idexx HerdCheck BSE-Scrapie Test commercialisé par la société Idexx ;
- le Western Blot automatisé pour les tests Prionics Check Western et Prionics Check Western SR commercialisés par la société Prionics ;
- un immunodosage automatisé dépendant de la conformation, qui compare la réactivité d'un anticorps de détection aux formes de PrP^{Sc} sensibles et résistantes à la protéase et à la PrP^{C} pour le test InPro CDI-5 commercialisé par Beckman Coulter.

Ces tests sont assez peu sensibles à la lyse des prélèvements à analyser (Grassi, Créminion et al., 2000; Grassi, Comoy et al., 2001), de plus ils sont faciles à mettre en œuvre et leur coût est réduit. La sensibilité et la spécificité de ces différents tests rapides ont été initialement évaluées pour l'analyse de prélèvements d'obex puisque c'est le tissu qui permet le diagnostic le plus précoce de l'ESB chez les bovins. Lorsque les programmes de surveillance ont été élargis aux petits ruminants, les validations de ces tests pour les ovins et les caprins n'étaient pas disponibles et les tests validés pour les bovins ont donc été utilisés sur échantillon d'obex pour le dépistage des EST ovines (Scientific Steering Committee, 2002 ; European Food Safety Autority, 2005a). Les tests sont extrêments spécifiques et leur sensibilité pour la tremblante classique et l'ESB est généralement très bonne (Tableau 3). Toutefois, du fait des particularités de la PrP^{Sc} associée à la tremblante atypique, la capacité de ces tests à détecter la tremblante atypique est inégale.

En 2005, l'AESA a publié deux rapports d'évaluation pour respectivement neuf et trois tests rapides pour le dépistage des EST ovines à partir de différents essais indépendants (European Food Safety Autority, 2005b; European Food Safety Autority, 2005c). Ces rapports d'évaluation ont porté sur la détection de trois cas tremblante atypique (Nor98) à partir de prélèvements de cerveau ou de cervelets, la détection de trois cas d'ESB expérimentale à partir d'échantillons de tronc cérébraux et la détection de cas cliniques de tremblante classique à partir de plusieurs prélèvements de tronc cérébral, de nœuds lymphatiques mésentériques et de rate (Tableau 3).

A partir de ces résultats, l'AESA a validé tous les tests sauf le Fujirebio FRELISA pour la détection de la tremblante classique et de l'ESB à partir du tronc cérébral, en notant toutefois une meilleure sensibilité des tests BioRad. Concernant la tremblante atypique, l'AESA a considéré que tous les

tests sauf Prionics Check LIA SR et Fujirebio FRELISA pouvaient détecter cette souche mais que seul les tests BioRad et Idexx pouvaient être recommandés pour la détection de la tremblante atypique à partir d'échantillons de tronc cérébral (European Food Safety Autority, 2005a; European Food Safety Autority, 2005b).

Ces évaluations sont quelque peu sommaires, par exemple, même si des animaux de différents âge et génotypes ont été intégrés au panel de cas de tremblante classique, l'effet du génotype et de l'âge de l'animal prélevé n'ont pas été étudiés en tant que tels. Une étude en Grande Bretagne a d'ailleurs suspecté une moins bonne sensibilité des tests BioRad sur les échantillons de tremblante classique provenant d'animaux de génotype VRQ/VRQ (Tongue, Wilesmith et al., 2008) mais cela n'a pas été confirmé par ailleurs. Pour la tremblante atypique, les incertitudes sont encore plus grandes. On ne dispose donc pas de valeurs chiffrées de sensibilité et de spécificité pour les différentes méthodes diagnostiques vis-à-vis de la tremblante atypique et les différences entre tests peuvent engendrer des biais. Par ailleurs, on ne sait pas non plus dans quelle mesure la lyse des prélèvements influence la sensibilité des tests. En pratique, les prélèvements sont ciblés sur la région de l'obex. La lyse partielle des tissus nerveux peut alors s'accompagner d'effets contradictoires : soit la diminution de la sensibilité, liée à des modifications de la PrP^{Sc}, qui peuvent être attendues dans la mesure où la PrP^{Sc} associée à la tremblante atypique est moins résistante, soit une amélioration de la sensibilité via une moins bonne spécificité histologique du prélèvement et l'inclusion d'une partie du cervelet où la PrP^{Sc} semble plus abondante.

Des essais de tests rapides permettant la différenciation entre différentes souches d'EST sont en cours mais n'ont pas encore d'application courante (Grassi, Maillet et al., 2008). A ce stade, les résultats obtenus par les tests rapides doivent encore être confirmés et éventuellement typés par une méthode de référence : Western Blot , IHC ou histopathologie, mise en évidence des SAF par microscopie électronique ou inoculation à la souris (OIE, 2004).

Tableau 3 : Rapport d'évaluation des tests rapides (d'après European Food Safety Autority, 2005b; European Food Safety Autority, 2005c))
N: nombre de cas testés, entre parenthèse dans les colonnes spécificité et sensibilité : intervalle de confiance à 95%, entre parenthèse dans les colonnes tremblante atypique et ESB : nombre de cas correspondant

	Tremblante classique						**Tremblante atypique**	**ESB**
	Tronc cérébral n= 242		Nœuds lymphatiques n= 232		Rate n =229		Cerveau n = 3	Tronc cérébral n=3
Test rapide	spécificité	sensibilité	spécificité	sensibilité	spécificité	sensibilité	Seuil de détection (dilution maximum)	Seuil de détection (dilution maximum)
BioRad TeSeE	100 (99,7-100)	99,6 (98,1 - 100)	100 (99,7-100)	78,9 (71,9 - 84,6)	100 (99,7 - 100)	85,1 (79,0 - 89,7)	1:50 (1) 1 :500 (2)	1:10 (1) 1:25 (1) 1:50 (1)
BioRad TeSeE sheep/goat	99,8 (99,4 - 100)	100 (98,8 -100)	100 (99,7 - 100)	94,2 (91,3 - 97,6)	100 (99,7 - 100)	92,9 (90,1 - 96,3)	1:50 (1) 1;500 (2)	1:100 (3)
Enfer TSE Test v 2.0	100 (99,7 - 100)	100 (98,8 - 100)	ND	ND	ND	ND	1:1 (3)	1:1 (2) 1:5 (1)
Institut Pourquier Scrapie Test	99,9 (99,5 - 100)	100 (98,8 - 100)	97,8 (96,3 - 98,4)	93,8 (88,9 - 96,2)	ND	ND	1:1 (1) 1:5 (2)	1:25 (2) 1: 50 (1)
Prionics Check LIA Small Ruminant	100 (99,8 - 100)	100 (98,8 - 100)	ND	ND	ND	ND	Non détecté	1:5 (2) 1:10 (1)
Prionics Check WB Small Ruminant	100 (99,8 - 100)	100 (99,8 - 100)	100 (99,7 - 100)	83,1 (76,8 - 88,0)	ND	ND	1:1 (3)	1:50 (3)
Fujirebio FRELISA	100 (99,7 - 100)	97,6 (95,2 - 100)	ND	ND	ND	ND	Non détecté	1:10 (2) 1:50 (1)
Idexx HerdChek	100 (99,7 - 100)	100 (98,8 - 100)	99,2 (98,4 - 99,7)	94,2 (90,1 - 96,9)	99,5 (98,8 - 99,8)	94,2 (90,1 - 96,9)	1:1 (1) 1:200 (1) 1:500 (1)	1:500 (2)
InPro CDI-5	99,9 (99,5 - 100)	100 (98,8 - 100)	ND	ND	ND	ND	1:1 (1) 1:25 (2)	1:25 (1) 1:50 (1)

1.6. Surveillance des EST chez les ovins

1.6.1. La population ovine

La population sur laquelle a porté nos études est constituée des ovins adultes de France et, dans une moindre mesure d'Europe.

Effectifs

La population ovine européenne (Union Européenne plus Islande, Norvège et Suisse) était estimée en 2005 à environ 110 millions d'animaux répartis de façon très hétérogène entre les pays (Figure 7) mais également dans les pays. Depuis plusieurs années, cette population est en baisse en raison des contraintes économiques, structurales, réglementaires et sanitaires qui pèsent sur la filière : le coût de l'alimentation des animaux, le différentiel élevé entre le prix payé au producteur et le prix de la viande à la consommation, la dévalorisation économique de la laine et du cuir, le manque de subventions en comparaison à d'autres secteurs, les épizooties de fièvre aphteuse et de fièvre catarrhale ovine ou encore la sécheresse de 2003 (Bailly and Fortassin, 2008).

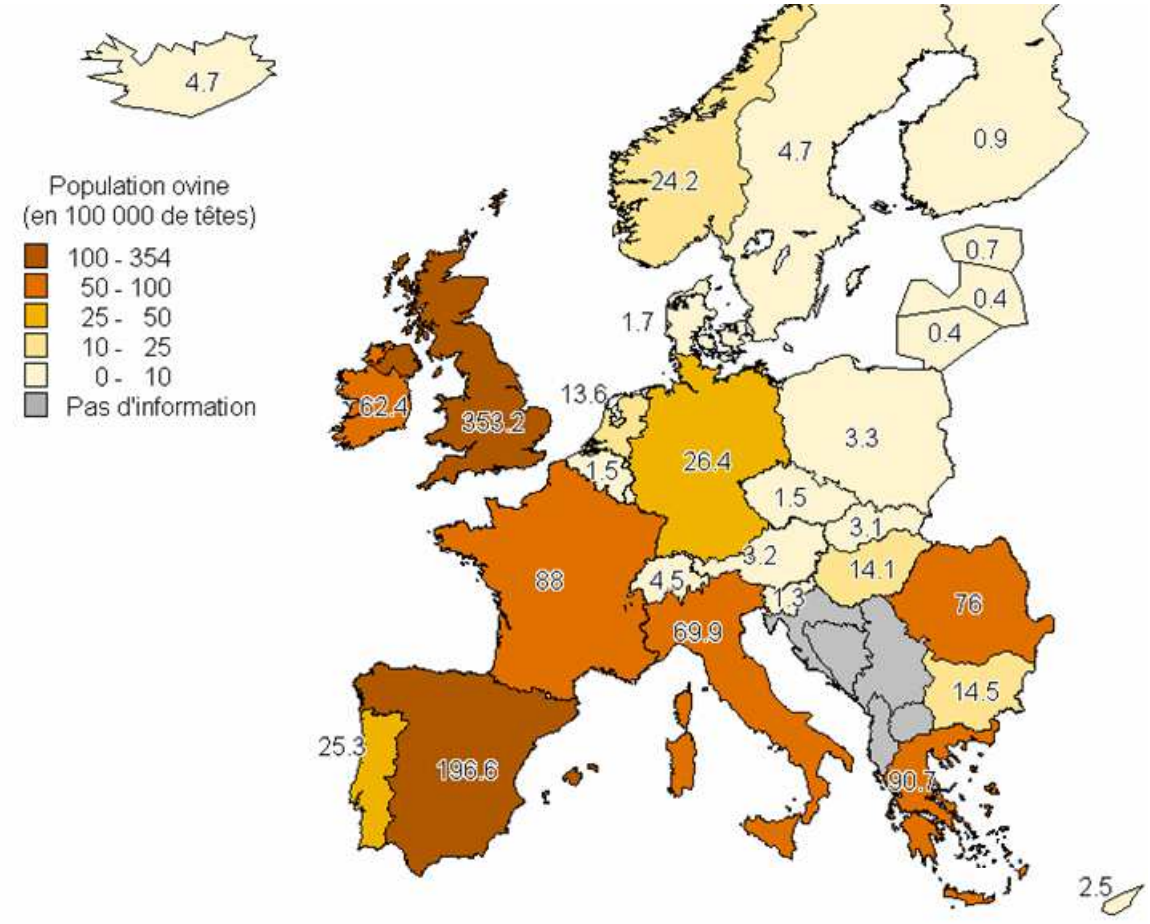


Figure 7 : Population ovine européenne en 2005 (source : Eurostat, 2009)

La population ovine française connait les même contraintes et entre 1996 et 2006 le cheptel a reculé de 16% (Bailly and Fortassin, 2008). D'après les données Agreste, elle était estimée en 2005 à 8 800 000 d'animaux répartis dans près de 73 000 élevages (Figure 8)(Agreste - Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2006). Les données sur la population ovine sont cependant peu fiables.

En fonction des départements et des communes, les indicateurs statistiques peuvent porter sur des catégories d'animaux différentes comme les brebis reproductrices, le nombre total d'ovins, de même en fonction des zones les détenteurs de petits cheptels ne sont pas comptabilisés de la même façon. Le recensement des exploitations par le ministère de l'Agriculture est incomplet. A partir de 2005, dans le cadre de la réforme de l'identification des petits ruminants, la DGAl a mis en place un recensement obligatoire et annuel des élevages ovins et caprins. Malgré le caractère obligatoire de ce recensement, de nombreux élevages n'y ont pas répondu. Le taux de réponse a augmenté d'environ 30% entre 2005 et 2007. Le taux de non réponse est probablement plus fort dans certaines régions (Corse et Provence-Alpes-Côte-D'azur (PACA)).

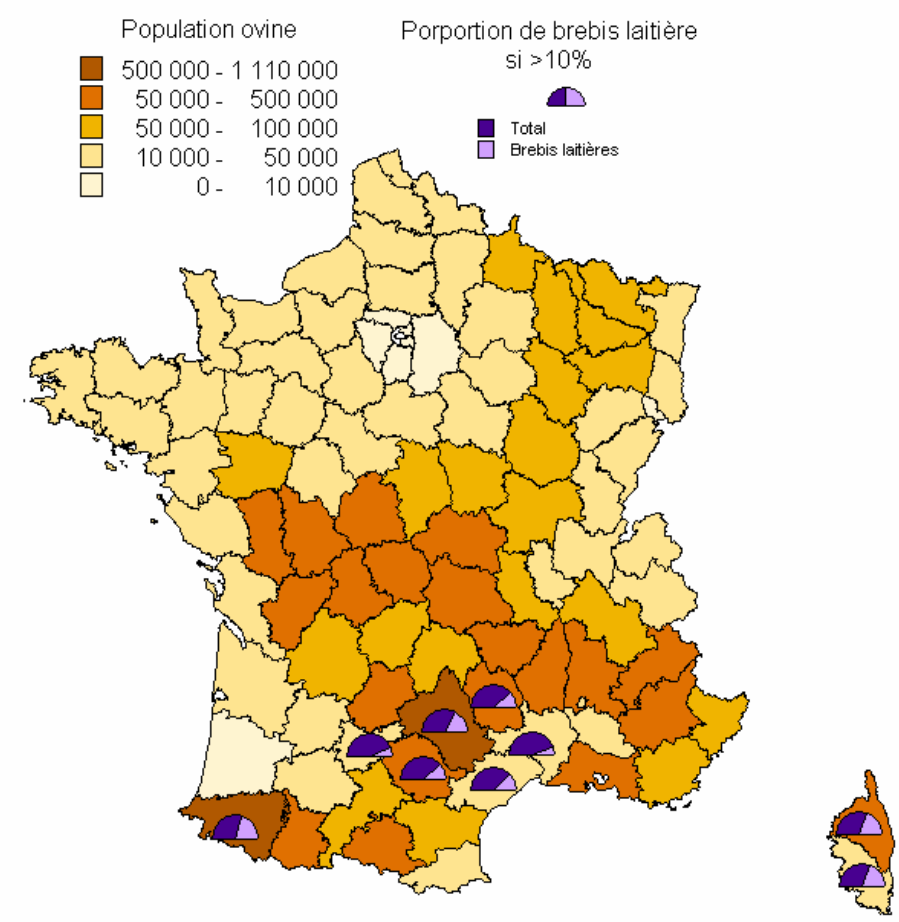


Figure 8 : Population ovine française en 2005 d'après Agreste (Agreste - Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2006)

Mode de production

Les systèmes de production ovins en Europe sont très variés et principalement orientés vers la production bouchère. En France, la production ovine est consacrée à deux types de production : la viande et les produits laitiers. Le cheptel laitier représente 15% de la population ovine et 7,5% des cheptels, il s'agit d'une production hautement spécialisée. Les brebis laitières correspondent à des régions et des races bien déterminées : Manech à tête rousse, Manech à tête noire et Basco-béarnaise dans les Pyrénées-Atlantiques, Lacaune dans le bassin de Roquefort et race Corse en Corse. Ces trois zones regroupent 95% de la production laitière ovine, il existe également une

production laitière en marge de la région de Roquefort, dans la région PACA et en développement en Auvergne, en Bourgogne et en Bretagne (Anonyme, 2005a).

En France continentale, les élevages laitiers sont en général d'un niveau technique supérieur à celui des élevages allaitants (Anonyme, 2005a). Dans le bassin de Roquefort, la production est plus intensive, ce qui se traduit par des troupeaux d'assez grande taille, plus de 300 brebis laitières en moyenne, des apports conséquents de concentrés, une utilisation régulière de l'insémination artificielle (IA) (65% du nombre total d'IA en France en 2004). Certains élevages associent une activité d'engraissement ou un troupeau allaitant. Dans les Pyrénées-Atlantiques, les élevages sont plus diversifiés, allant d'élevages très traditionnels et transhumants à des installations très modernes comme dans le bassin de Roquefort (Anonyme, 2005a). En Corse, la production est très traditionnelle et les élevages de petite taille, moins de 125 brebis en moyenne.

Les élevages allaitants français sont extrêmement diversifiés (Anonyme, 2006) selon les races et les systèmes de production. Environ 70% de la population est constituée de différents mélanges raciaux. On recense plus de 25 races mais les 10 races les plus fréquentes représentent 95% des effectifs en race pure : Blanc du massif central (16%), Lacaune (14%), Texel (13%), Mouton charolais (12%), Ile de France (10%), Suffolk (7%), Tarasconnaise (7%), Rouge de l'Ouest (5%), Causses du Lot (5%), Moutons vendéens (5%), INRA401 (2%), Berrichon du Cher (2%), Noir du Velay (1%), Grivette (1%) (Babo, 2000). Toutes les régions d'élevage sont concernées par la production ovine et particulièrement les zones de pâturages pauvres ou humides, mieux valorisées par les ovins que par les bovins, notamment dans le Nord Est et le Nord Ouest. Certaines régions ont une production particulièrement importante comme le bassin du Poitou, la région PACA, le Limousin, l'Auvergne, la Bourgogne et le Midi Pyrénées. Dans la région Poitou, les élevages sont très intensifs avec une technicité importante et des ateliers d'engraissement hors sol. A l'inverse, dans les régions PACA et Midi Pyrénées, la production ovine est très extensive avec de grandes transhumances et des cheptels de plus de mille brebis. Les régions du centre de la France ont des systèmes de production intermédiaires souvent en poly-élevage-poly-culture et parfois de petites transhumances sont réalisées.

Paramètres démographiques

Contrairement à la situation chez les bovins, les paramètres démographiques chez les ovins sont assez mal connus. Des réformes réglementaires sont actuellement en cours au niveau européen pour remédier à cette situation. Les principales modifications sont une réforme de l'identification, devenue pérenne pour les animaux nés à partir de juillet 2005, et la mise en œuvre d'une base nationale d'identification prévue à l'horizon 2011 qui permettra une bonne traçabilité des animaux et la connaissance précise de l'âge, du sexe, du type de production et de la race. La grande majorité des animaux inclus dans nos études sont nés avant la réforme de l'identification et ont pu connaître des défauts d'identification.

Le sexe ratio en élevage ovin est d'environ un mâle pour 30 à 40 femelles, mais ce ratio peut être inférieur en élevage laitier compte tenu de l'utilisation massive d'IA. Dans tous les cas, la population ovine adulte est essentiellement féminine.

Pour l'ensemble des productions ovines, les causes de mortalité sont assez peu précisément connues, les complications à la mise-bas représentent la première cause (environ 30%). Les

courbes de survie des animaux en fonction des systèmes de production ne sont connues que pour certains troupeaux en suivi de production dont la représentativité est incertaine. De plus même ces données ne sont pas facilement disponibles. La période de réforme dépend du calendrier de reproduction et de prime et correspond souvent au début de l'été. En général, 10% des brebis sont éliminées la première année, 40 à 50% l'année suivante puis les animaux satisfaisants sont conservés pour une durée variable en fonction du mode de production.

En système allaitant, l'âge à la réforme se situe généralement entre six et huit ans (Lasseur and Landais, 1992) (Figure 9). Le taux de renouvellement annuel varie de 17 à 20%, le taux de mortalité des adultes est estimé en moyenne à 3% (Anonyme, 2005b) mais il peut varier fortement en fonction des élevages.

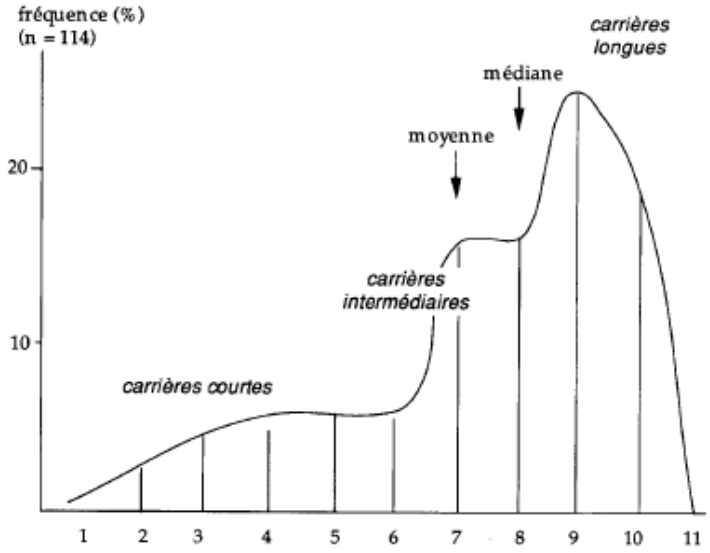


Figure 9 : Distribution de l'âge à la dernière mise bas dans un troupeau allaitant en région PACA de 1977 à 1989 (Lasseur and Landais, 1992)

En système laitier, les brebis sont conservées moins longtemps, environ quatre à six ans mais les animaux ayant « fait leur preuve » peuvent être conservés au-delà de 10 ans.
Le taux de renouvellement est d'environ 26% dans le bassin de Roquefort et de 20% dans les Pyrénées-Atlantiques (Anonyme, 2005a). Le taux de mortalité des adultes est estimé en moyenne à 3%, mais là encore, les variations sont vraisemblablement importantes (Anonyme, 2005b).

1.6.2. Surveillance clinique

La surveillance clinique ou surveillance passive peut prendre différentes formes. Jusqu'aux années 1990, la plupart des pays n'avaient pas de système organisé de collecte de données sur la tremblante. Toutefois, des études ponctuelles ou la notification régulière des cas a permis de documenter la présence de la maladie sur une base essentiellement clinique.

Cette activité clinique a permis d'établir la présence de la tremblante classique en Europe depuis le XVIIIème siècle (Schneider, Fangerau et al., 2008) et sa diffusion, sans doute à partir du Royaume-Uni (Parry, 1962), dans la plupart des pays d'élevage de petits ruminants où elle est actuellement établie hormis en Nouvelle-Zélande et en Australie qui semblent l'avoir éradiquée (revue par Klingsporn, Hourrigan et al., 1969; Detwiler and Baylis, 2003) (Figure 10). Dans de nombreux

pays, les systèmes de surveillance de la tremblante sont inexistants ou insuffisants et rien ne peut être déduit de l'apparente absence de cas.

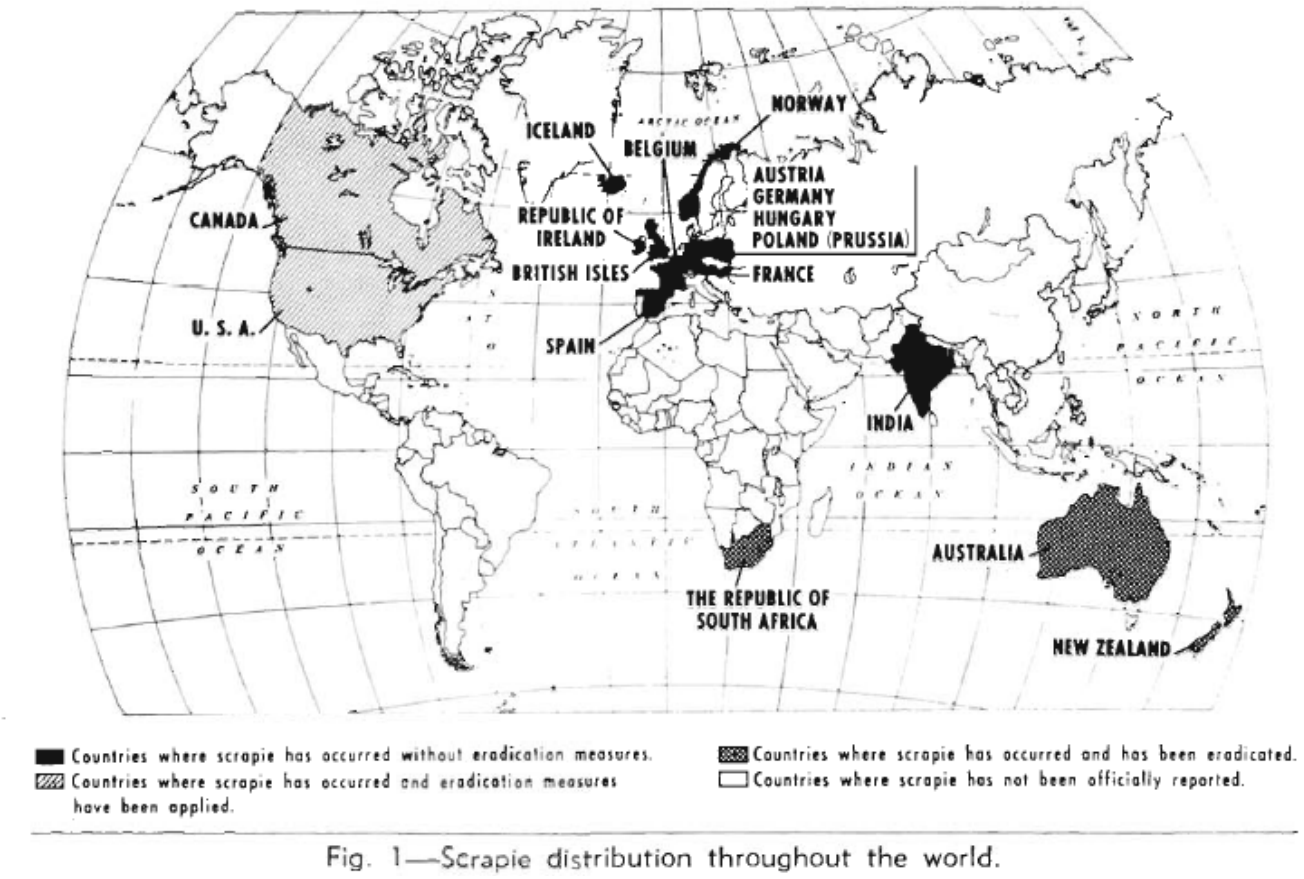


Figure 10: Distribution mondiale de la tremblante (classique) en 1969 (Klingsporn, Hourrigan et al., 1969)

En noir : pays où la tremblante a été reportée et où il n'y a pas de mesures d'éradication, en hachuré : pays la tremblante a été reportée et où il y a des mesures d'éradication, en treillis : pays où la tremblante a été reportée et a été éradiquée, en blanc : pays où la tremblante n'a pas été officiellement reportée

A partir des années 1990, la surveillance clinique a été organisée dans un nombre croissant de pays en réseaux d'épidémiosurveillance bien formalisés, souvent basés sur l'obligation réglementaire pour l'éleveur de notifier les suspicions à une autorité sanitaire. L'identification de différents acteurs du réseaux et le niveau d'information dont ils devaient disposer a permis de rendre assez efficace certains de ces programmes. Cependant, de nombreux biais peuvent contribuer à une sous estimation de la tremblante par la surveillance clinique :

- la longue durée d'incubation pouvant se traduire par l'existence de cas dont la clinique est fruste ou tardive, notamment pour la tremblante atypique ;
- la méconnaissance des signes cliniques par l'éleveur (Morgan, Nicholas et al., 1990; Clark and Moar, 1992; Ducrot, Dorr et al., 1999; D'Angelo, Maurella et al., 2007; Kuncheva, del Rio Vilas et al., 2007) ;
- le nombre limité de cas par élevage en fonction de la structure génétique du troupeau, de l'ancienneté de la maladie et de la souche de tremblante ;

- le fait que la tremblante puisse avoir une connotation de maladie 'honteuse' d'où la crainte du regard du voisinage si la suspicion venait à être connue (Schneider, Fangerau et al., 2008) ;
- la crainte de mesures de police sanitaire entraînant la perte d'animaux plus ou moins bien compensée et des entraves commerciales (Hoinville, Hoek et al., 2000; Del Rio Vilas, Guitian et al., 2006).

En France, l'intérêt épidémiologique pour la tremblante semble avoir été assez limité avant l'avènement de l'ESB. Une étude basée sur la surveillance clinique de la tremblante a tenté de recenser les cas survenus en France continentale entre 1968 et 1979 (Chatelain, Cathala et al., 1981). Compte tenu des nombreux biais possibles de cette étude, peu de crédit peut être attaché aux estimations de prévalence mais cette enquête a tout de même le mérite d'établir une carte de distribution *a minima* des cas de tremblante clinique avant la mise en place de réseau formels de surveillance (Figure 11). La tremblante (classique) semblait alors très présente dans le sud de la France et particulièrement dans l'important bassin de production de l'Aveyron mais des foyers étaient également recensés dans le Nord-Ouest et l'Est.

Figure 11 : Distribution de cas de tremblante clinique rapportés en France entre 1968 et 1979 (Chatelain, Cathala et al., 1981)

Carrés blancs : cas confirmés par histopathologie (n=10) ; carrés noirs : diagnostic clinique, troupeau ovin (n=141) ; cercles noirs : diagnostic clinique, troupeau caprin (n=4)

A partir de 1991, un réseau volontaire de surveillance clinique, Action Tremblante Grand Sud, a fonctionné à l'échelle interrégionale jusqu'en 1996 (Russo, Ducrot et al., 1996). Ce réseau a permis de mettre en évidence 94 cas de tremblante répartis dans 82 élevages, principalement dans les Pyrénées-Atlantiques et 54% des suspicions avaient été confirmées.

En 1996, la tremblante des ovins et des caprins a été ajoutée à la liste des MRC (décret 96-528 du 14 juin 1996) en France (Décret, du 14 juin 1996). Un réseau de surveillance clinique national a été défini l'année suivante, mobilisant les éleveurs, les vétérinaires, les laboratoires et les services vétérinaires selon un schéma similaire à celui déjà mis en place pour les bovins et l'ESB (Calavas, Philippe et al., 1999). Le taux de confirmation des suspicions était de 80%, ce qui est supérieur au réseau Grand Sud, sans doute grâce aux efforts de formation et d'animation du réseau. Cependant, cette grande spécificité indique probablement un défaut de sensibilité du réseau. En cinq ans, ce réseau a permis de mettre en évidence la tremblante dans 339 élevages, dont 282 élevages ovins, pour moitié situés dans les Pyrénées-Atlantiques (Figure 12)(Ducrot and Calavas, 2002). L'hétérogénéité géographique de la distribution des cas était assez marquée mais peu interprétable du fait de la nature passive de la remontée d'information et de la rareté de la maladie (Calavas, Philippe et al., 1999). Faute de méthode appropriée, il n'y avait pas de distinction entre les différentes souches d'EST et tout cas confirmé était, de fait, assimilé à un cas de tremblante classique.

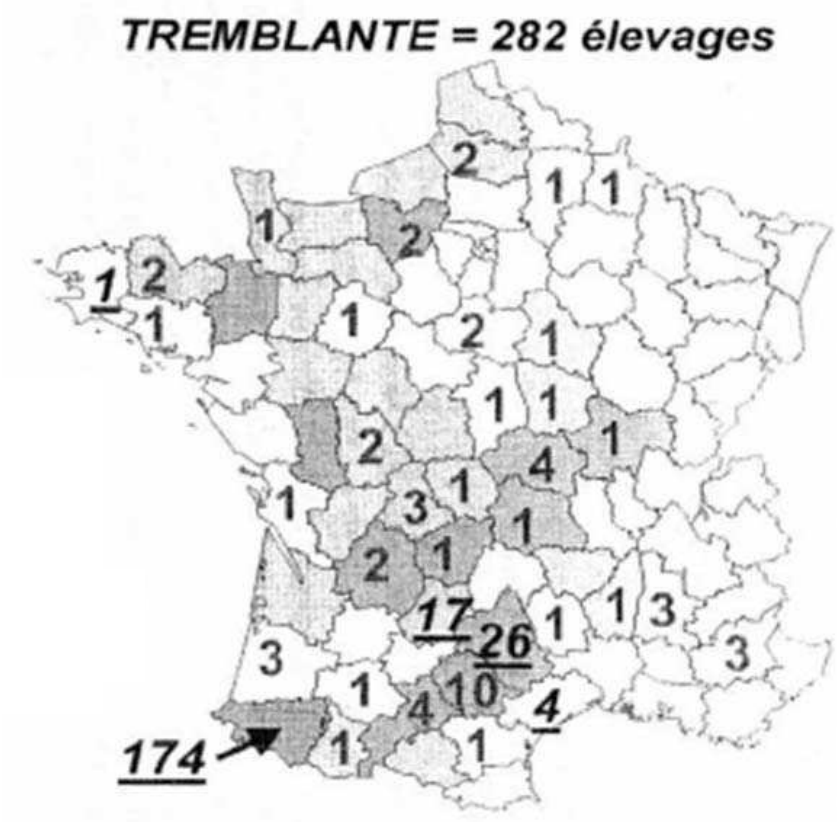


Figure 12 : Distribution de la tremblante (classique) en France entre 1997 et 2001 (Ducrot and Calavas, 2002)

Les départements sont grisés en fonction du nombre de cheptels ovins recensés, du plus clair au plus foncé : moins de 250 élevages ; de 250 à 500 élevages ; de 500 à 1000 élevages ; de 1000 à 2000 élevages ; plus de 2000 élevages

Une étude menée par voie postale au Royaume-Uni en 1998 a montré que seulement 13% des éleveurs rapportaient les suspicions cliniques de tremblante malgré l'obligation réglementaire (Hoinville, Hoek et al., 2000) et qu'environ 2,7% (Intervalle de confiance à 95% (IC95%) = 2,3 – 3,2) des élevages avaient été concernés par un cas de tremblante au cours de l'année écoulée alors

que pendant la même période, une enquête en abattoir estimait la prévalence à 10/2798 = 0,4% (IC95% = 0.2% – 0.7%), toutes catégories d'âge confondues (Simmons, Ryder et al., 2000).

Quelque cas de tremblante atypique ont été diagnostiqués en France sur la base de suspicion clinique (n=4) et à l'étranger des cas cliniques ont été rapportés en Norvège (Benestad, Sarradin et al., 2003), en Irlande (Onnasch, Gunn et al., 2004), aux Iles Falkland (Epstein, Pointing et al., 2005) et au Royaume-Uni (Konold, Davis et al., 2007), y compris un cas diagnostiqué de façon rétrospective au Royaume-Uni et datant de 1989 (Bruce, Nonno et al., 2007). Toutefois, du fait de l'âge des cas, voisin de l'espérance de vie des animaux, et de la discrétion des signes cliniques, ce type de surveillance est peu adapté à la tremblante atypique. Ainsi entre 2002 et 2007 la tremblante atypique représentait environ 5% des cas cliniques confirmés par la surveillance clinique alors qu'elle représentait 41% des cas diagnostiqués par la surveillance active.

1.6.3. Surveillance active

A la suite de la mise en place de la surveillance active des bovins en 2001, la Commission européenne décida un programme européen de surveillance active des EST des petits ruminants (règlement CE/999/2001 du 22 mai 2001 modifié) (European Commission, 2001). Le programme a commencé en avril 2002 et s'est progressivement substitué à la surveillance clinique. Ce programme avait comme objectif principal de fournir une estimation moins biaisée de la prévalence des EST chez les petits ruminants et de détecter, le cas échéant, la présence d'ESB (Scientific Steering Committee, 2001; Scientific Steering Committee, 2002).

Ce programme de surveillance pluriannuelle, pour la période allant d'avril 2002 à décembre 2007, constitue la source de données de plusieurs études effectuées dans le cadre de cette thèse. Le programme est décrit plus en détail dans le chapitre suivant, ici figure uniquement son schéma global de fonctionnement (Figure 13).

Le programme est basé sur des enquêtes statistiques visant à échantillonner de façon aléatoire différentes sous-populations ovines et caprines à l'abattoir et à l'équarrissage. La population testée est constituée des animaux, mâles ou femelles, de plus de 18 mois. L'âge est évalué via la dentition : les animaux de plus de 18 mois présentent au moins 2 incisives définitives (ID). Le plan d'échantillonnage à l'équarrissage concerne les animaux morts en ferme, euthanasiés ou morts en cours de transport. Ce plan vise une population à risque d'EST et constituait la cible première du programme de surveillance. En raison des biais possible liés à l'absence de collecte des cadavres dans certaines zones ou à la dissimulation éventuelle de cadavres suspects, une surveillance à l'abattoir a également été mise en place. Le plan d'échantillonnage à l'abattoir concernait les animaux de réformes abattus pour la consommation humaine. Compte tenu de la présence d'une inspection ante mortem, les animaux présentant des signes cliniques de tremblante étaient théoriquement dépistés dans le cadre de la surveillance clinique toujours en vigueur. Cependant, dans certains abattoirs les animaux suspects, surtout les animaux maigres, ont pu être testés de façon privilégiée mais dans le plan de surveillance abattoir.

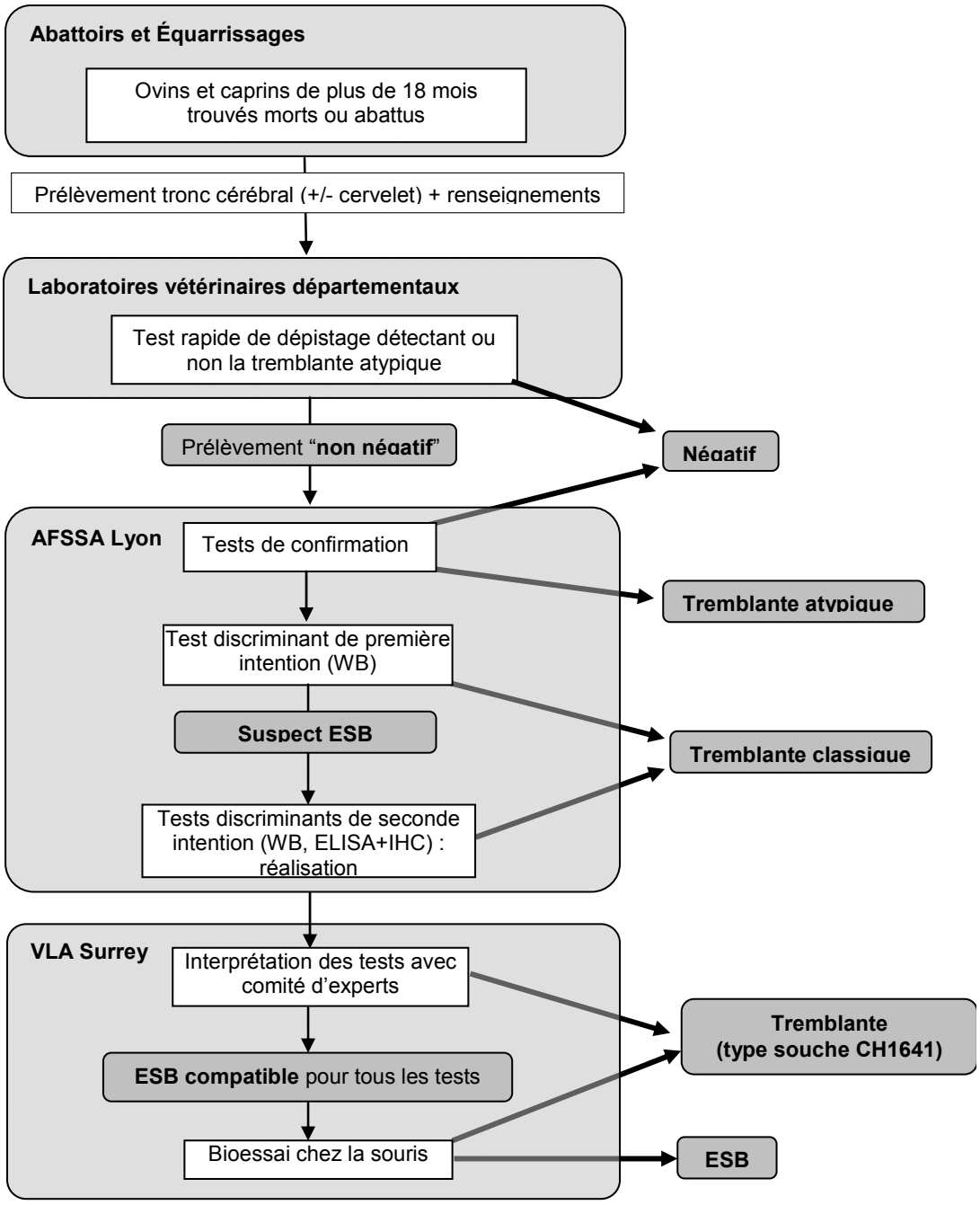


Figure 13 : Organisation de la surveillance active des EST (issu de Fediaevsky, Bélichon et al., 2007)

Chaque année, un quota de tests à l'abattoir et à l'équarrissage a été fixé par la DGAl au niveau national, sur les bases des minimums requis par la réglementation européenne (European Commission, 2001) et décliné sous forme d'objectifs pour chaque département. Au niveau départemental, les directions départementales des services vétérinaires (DDSV) ont été chargées de la mise en œuvre du programme. Ils étaient également responsables de la consigne et de la libération des carcasses des animaux testés à l'abattoir, les carcasses des animaux positifs devant être détruites et celles des animaux douteux ou non analysables ayant été consommées jusqu'en 2004 et détruites ensuite. Les animaux devaient être sélectionnés aléatoirement sur le site de prélèvement (abattoir ou équarrissage) et faire l'objet d'un prélèvement de tronc cérébral ciblé

sur l'obex, à l'aide d'une cuillère conçue à cet effet, à partir du trou occipital. Le prélèvement, accompagné d'une fiche d'information, devait être acheminé vers un laboratoire départemental d'analyse (LDA) pour être testé au moyen d'un des kits de diagnostic rapide validés par l'autorité européenne. De 2002 à 2005, les tests rapides utilisés étaient les tests validés pour les bovins (Scientific Steering Committee, 2002): BioRad TeSeE, Enfer Test, InPro CDI-5, Prionics Check Lia and Prionics Check Western (European Commission, 2001). Ces tests avaient été validés pour un prélèvement de tronc cérébral centré sur l'obex chez les bovins pour lesquels ce tissu permet le diagnostic le plus précoce, raison pour laquelle il fut recommandé d'utiliser le même prélèvement pour les petits ruminants (Scientific Steering Committee, 2002). En 2005, l'AESA publia deux rapports d'évaluation de tests rapides pour les petits ruminants qui validèrent l'utilisation des tests suivants : BioRad TeSeE, BioRad TeSeE sheep/goat, Enfer TSE Test v 2.0, Institut Pourquier Scrapie Test, Prionics Check LIA Small Ruminant, Prionics Check WB Small Ruminant, Idexx HerdCheck et InPro CDI-5 (European Food Safety Autority, 2005b; European Food Safety Autority, 2005c). Parmi ceux-ci, seuls les tests BioRad TeSeE, BioRad TeSeE sheep/goat et Idexx HerdCheck étaient recommandés pour détecter la tremblante atypique à partir du tronc cérébral. La Commission européenne imposa en 2005 le prélèvement d'un fragment de cervelet en plus du tronc cérébral pour la détection des cas de tremblante atypique mais n'imposa pas son analyse (European Commission, 2006b). En France, l'inclusion du cervelet n'a en pratique pas été suivie.

Quoi qu'il en soit, en cas de résultat non négatif, l'échantillon testé devait être transmis au laboratoire national de référence (LNR) de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) à Lyon et l'élevage d'origine placé sous surveillance (voir p. 64). A l'AFSSA Lyon l'échantillon était réanalysé au moyen de méthodes de confirmation incluant un test rapide et un Western Blot permettant de distinguer les isolats de tremblante atypique des autres EST. Si l'échantillon s'avérait positif pour une autre EST que la tremblante atypique, une discrimination biochimique entre tremblante classique et ESB était mise en œuvre. Si à l'issue de celle-ci l'ESB ne pouvait être exclue, l'isolat était envoyé au laboratoire communautaire de référence, le Veterinary Laboratory Agency (VLA) au Royaume-Uni, qui organisait une expertise collective et, au besoin, des inoculations à la souris (bio-essais). Les commémoratifs accompagnants les prélèvements incluaient l'identification de l'animal, l'espèce, la race, la dentition, le sexe, le plan de surveillance, la date, le lieu et l'état du prélèvement, la date d'analyse, le test utilisé, le laboratoire d'analyse et le résultat. Ces informations ont été transmises par le laboratoire d'analyse à la base de données nationale des EST (BNEST).

En complément au dépistage des EST, une proportion limitée (0,1% à 3% en fonction des années) des ovins prélevés a fait l'objet d'un génotypage du gène PrP codant pour la protéine prion afin de surveiller l'évolution de la structure génétique de la population ovine. Les analyses, effectuées à partir d'échantillon d'oreille ou de muscle, portaient sur les codons 136, 154 et 171. La méthode (sondes Taqman) mise en œuvre par le laboratoire national de référence pour le génotypage, Labogena à Jouy en Josas, ne permettait pas de faire la distinction entre les phénotypes H et Q en position 171.

1.7.Lutte contre la tremblante ovine

La lutte contre la tremblante ovine s'est faite sans discrimination du type de tremblante. Les références historiques préconisaient au XIXème siècle d'abattre l'intégralité du troupeau ou de changer de bélier, ce qui constitue les prémices d'une lutte génétique (Schneider, Fangerau et al., 2008). Il a également été montré que le protocole mis en place pour la lutte contre le Maedi-Visna était efficace contre la tremblante (Calavas, Lepetitcolin et al., 1999). Cela sans doute grâce à la séparation des agneaux à la naissance permettant de réduire l'exposition au placenta ou à du lait infectieux. Les pouvoirs publics de la plupart des états occidentalisés n'ont mis en place une lutte rationnelle contre la tremblante ovine que suite à la crise de l'ESB. Il convient toutefois de mentionner quelques exceptions notables : l'Islande qui a mis en place un programme drastique de lutte contre la tremblante dans les années 1950 basé sur des mesures très rigoureuses de dépopulation totale de certaines zones par les ovins (Palsson, 1979; Sigurdarson, 1991) et l'Australie et la Nouvelle-Zélande qui parvinrent à éradiquer la maladie dans les années 1960. Les Etats–Unis tentèrent également un programme d'éradication mais sans succès (Klingsporn, Hourrigan et al., 1969 ; Lynn, Grannis et al., 2007).

Actuellement, la lutte contre la tremblante repose sur deux grands volets : un volet sanitaire visant à éradiquer les foyers et un volet préventif visant à sécuriser les élevages y compris par voie de résistance génétique.

1.7.1. Police sanitaire

Sur le plan européen, le cadre législatif est précis et particulièrement contraignant puisqu'il s'agit d'un des rares règlements adoptés par la Commission en matière de contrôle d'une maladie animale (European Commission, 2001), la seule exception étant à ce jour la fièvre catarrhale ovine (les autres mesures sont des directives ce qui règlementairement parlant est moins contraignant). Sur le plan national, les mesures initialement prévues par le législateur (Arrêté, du 28 mars 1997) ont été remplacées par une réglementation conforme avec le niveau européen en 2003 (Arrêté, du 27 janvier 2003).

Jusqu'en juillet 2007, aucune mesure spécifique n'était prévue pour les cas de tremblante atypique.

Détection des foyers

Le point de départ de toute police sanitaire est l'identification des foyers d'infection.

En tant que MRC, toute suspicion de tremblante doit faire l'objet d'une déclaration suivie de l'euthanasie de l'animal suspect en vue de la réalisation d'un prélèvement et d'un diagnostic de confirmation au laboratoire (Décret, du 14 juin 1996 ; Arrêté, du 27 janvier 2003; Arrêté, du 28 mars 1997). Le système de surveillance par notification obligatoire est très influencé par les possibles incitations à rapporter les suspicions ou au contraire l'existence de contraintes réglementaires, des mesures de police moins coercitives pouvant encourager une meilleure notification (Del Rio Vilas, Guitian et al., 2006).

La surveillance active constitue actuellement le principal moyen de détecter des troupeaux infectés. A l'époque où elle a été mise en œuvre, il semble que le lien entre surveillance et police sanitaire découlait d'une volonté politique puisque des programmes de surveillance auraient pu être conçus pour estimer la prévalence de la population en préservant l'anonymat des détenteurs

des cas positifs. A l'heure actuelle, l'article L201-2 du code rural (Loi, du 23 février 2005), imposant la communication des résultats d'analyses portant sur une maladie réglementée aux autorités vétérinaires, rendrait délicat sur le plan réglementaire le montage d'une telle surveillance. Cependant, l'assainissement de la population ne constitue qu'un objectif secondaire ou une conséquence de la surveillance. Il convient à ce propos de souligner que le protocole de la surveillance active n'est pas conçu dans le but de détecter le maximum de foyers. Une étude par simulation a montré qu'en Norvège la surveillance active devrait permettre de détecter au mieux 9% des troupeaux infectés par la tremblante classique (Hopp, Webb et al., 2003), en France ce taux doit être du même ordre de grandeur (AFSSA, 2004).

Suite à la suspicion d'EST, la réglementation prévoit que le troupeau d'origine de l'animal suspect, ou les troupeaux, au cas où ce dernier a transité par différentes exploitations, soi(en)t placé(s) sous un arrêté préfectoral de mise sous surveillance (APMS). L'APMS prévoit essentiellement le blocage de l'exploitation le temps que la suspicion soit levée ou confirmée par les examens pratiqués au LNR. L'ensemble des troupeaux faisant l'objet de mesures de contrôle suite à la découverte d'un même cas index correspond à un foyer unique, identifié par un numéro.

Lorsque la suspicion est confirmée, deux situations peuvent se présenter selon que le cas était sédentaire ou « nomade ».

Abattage sanitaire

L'abattage sanitaire est appliqué lorsque le cas est considéré comme sédentaire, c'est-à-dire qu'il a quitté son exploitation de naissance depuis moins de six mois et y a séjourné toute sa vie. L'exploitation de naissance est placée sous arrêté préfectoral portant déclaration d'infection (APDI). L'APDI prévoit les mesures principales suivantes (Arrêté, du 27 janvier 2003) :

- l'interdiction de mouvement des animaux appartenant aux espèces sensibles,
- le recensement, le marquage et le génotypage des ovins aux trois codons 136,154 et 171 du gène PRNP,
- l'abattage dans un délai d'un mois des animaux sensibles au sens de la réglementation, à savoir :
    - pour les mâles, tous les génotypes sauf ARR/ARR,
    - pour les femelles, les génotypes VRQ/VRQ, VRQ/ARQ, VRQ/ARH, VRQ/AHQ, VRQ/ARR, ARQ/ARQ, ARH/ARH, AHQ/AHQ, ARQ/AHQ, ARQ/ARH
- une dérogation peut être obtenue pour différer d'au maximum deux campagnes d'agnelage l'abattage des femelles non porteuses d'allèle VRQ,
- l'obligation de repeupler avec des animaux ARR/ARR pendant une durée d'un an après la levée de l'APDI.

La levée de l'APDI est conditionnée à l'application de mesures de nettoyage et de désinfection des locaux, cependant aucun protocole n'est recommandé. L'agent infectieux de la tremblante est sensible à un traitement d'une heure à la soude molaire ou un traitement à l'eau de javel à 2,5% pendant une heure (Taylor, 2000; Taylor, 2004) mais de tels procédés sont difficilement applicables en pratique.

Par ailleurs l'APDI s'accompagne d'une part de la recherche des animaux appartenant à la cohorte de naissance du cas, c'est-à-dire ayant côtoyé celui-ci lorsqu'il était âgé de moins d'un an et qu'ils

étaient eux-mêmes âgés de moins d'un an et, d'autre part, des animaux issus du cas si celui-ci était une femelle. Les élevages détenant des animaux appartenant à ces deux catégories sont placés sous APMS. Cet APMS prévoit que ces animaux potentiellement exposés soient génotypés et que les animaux sensibles soient euthanasiés et testés. En cas de résultat positif confirmé, l'élevage détenteur est placé sous APDI, sinon l'APMS est levé.

Surveillance renforcée

La surveillance renforcée est appliquée lorsque le cas est considéré comme nomade, c'est à dire s'il a quitté l'exploitation de naissance depuis plus de six mois. Dans ce cas, l'exploitation de naissance et toutes les exploitations dans lesquelles il a mis bas sont placées sous APMS de suivi. L'APMS prévoit les mesures principales suivantes (Arrêté, du 27 janvier 2003) :

- la déclaration de mouvements des animaux appartenant aux espèces sensibles ;
- le dépistage EST systématique des animaux abattus ou trouvés morts ;
- la levée de l'APMS au bout de trois ans si aucun cas supplémentaire n'a été confirmé ;
- si un cas supplémentaire est dépisté, un nouvel APMS est pris ou l'élevage est placé sous APDI selon l'origine du cas.

Il est à noter que ces dispositions ne sont pas prévues par la réglementation européenne.

Police sanitaire en cas de tremblante atypique

En 2006, la DGAl a saisi l'AFSSA au sujet des mesures de police sanitaire à mettre en œuvre en cas de détection de la tremblante atypique dans un élevage. En substance, et malgré un manque de consensus entre les experts, la position majoritaire de l'avis de l'AFSSA suggérait de mettre en place un suivi des troupeaux où un cas positif était détecté pendant une durée de cinq ans, de tester les animaux avec un test recommandé pour la détection de tremblante atypique à partir de tronc cérébral, que le génotype du gène PRNP des animaux du troupeau soit déterminé pour les quatre codons 136, 141, 154 et 171 et que la vente de reproducteurs soit limitée aux élevages de même statut (AFSSA, 2007a).

Depuis mars 2007, la DGAl a donné par note de service (ce qui n'a pas de valeur juridique), la possibilité aux élevages ayant un cas index de tremblante atypique confirmé et devant être placé sous APDI, de déroger partiellement aux mesures de police sanitaire par report de l'application des mesures réglementaires. Dans ce cas, les animaux sont génotypés et testés au fur et à mesure de leur sortie de l'exploitation pour l'abattoir et tous les animaux équarris sont testés. En pratique, il semble que très peu d'élevages soient concernés par cette mesure et en tout état de cause aucun parmi ceux étudiés dans nos travaux.

La réglementation européenne a prévu la possibilité, à partir de juillet 2007, de placer les élevages ayant un cas index de tremblante atypique sous surveillance renforcée pour une durée de deux ans (European Commission, 2007). Cette surveillance consiste en un dépistage systématique des ovins de plus de 18 mois abattus pour la consommation humaine, trouvés morts ou euthanasiés. La France n'a pour l'instant pas mis en place ces mesures.

Dépistage des cas secondaires

Le déroulement du dépistage dans le cadre de la police sanitaire est comparable à celui décrit pour la surveillance active. Toutefois, le typage de souche (différentiation entre tremblante atypique,

tremblante classique et ESB) n'a été réalisé de façon systématique que depuis mars 2007. Avant cette date, seule une faible proportion des cas secondaires issus de foyers avec un cas index de tremblante classique ont été typés (environ 1%) mais l'intégralité des cas secondaires issus de foyers avec un cas index de tremblante atypique a été typée.

Lors de l'abattage des animaux sensibles prévu par APDI, depuis juillet 2004, les animaux de plus de 12 mois sont testés pour le dépistage d'EST selon les taux de sondage du Tableau 4, avant le dépistage était exhaustif.

Tableau 4 : Taux de sondage des animaux testés en application de la police sanitaire

Nombre d'animaux de plus de 12 mois à éliminer	Tests à réaliser a minima sur
0-120	Tous les animaux
121-200	75% des animaux
201-300	50% animaux
Supérieur à 301	150 animaux

Les animaux testés sont identifiés par le numéro de foyer. Les analyses sont également indexées par un code de surveillance spécifique mais dont l'attribution a pu être erronée en début de programme (année 2002) conduisant notamment à l'affiliation de nombreux tests effectués dans le cadre de la police sanitaire à de la surveillance à l'équarrissage (Morignat, Cazeau et al., 2006).

Les informations relatives au dépistage et au génotypage ont été stockées dans la BNEST et les informations relatives à la gestion des foyers ont été gérées dans un fichier Excel par la DGAl. La gestion des données de police sanitaire n'a pas toujours été optimale, en particulier il n'y a pas eu de suivi rigoureux des animaux testés négatifs ni de rapprochement systématique du génotype des animaux établis dans le cadre des APDI et du résultat des tests de dépistage.

1.7.2. Mesures prophylactiques

Le volet préventif de lutte contre les EST animales comprend les mesures permettant de diminuer l'exposition des espèces sensibles et de l'environnement aux matières infectieuses via la destruction des MRS et l'interdiction des FVO déjà évoquées préalablement.

De façon plus spécifique, deux types de programmes ont été mis en place l'un pour augmenter la résistance génétique de la population ovine à la tremblante et l'autre pour le suivi de troupeau en vu de leur certification.

Programmes de sélection génétique

La sélection génétique a été utilisée de longue date pour lutter contre la tremblante, y compris avant l'identification du gène PRNP (Parry, 1962 ; Parry, 1979 ; Schneider, Fangerau et al., 2008). L'identification du gène PRNP et l'estimation de l'effet des différents allèles sur la susceptibilité ont permis de proposer des programmes de sélection à grande échelle (Belt, Muilheman et al., 1995 ; Hunter, 1997 ; Dawson, Hoinville et al., 1998). Le principe de la sélection est de promouvoir les animaux porteurs d'allèle de résistance ARR et d'éliminer les animaux porteurs d'allèle de sensibilité VRQ.

L'une des principales motivations de ce programme résidait dans l'espoir de diminuer la susceptibilité de la population ovine à l'ESB (Scientific Steering Committee, 1999).

En France, aux Pays-Bas et au Royaume-Uni des programmes de sélection ont été mis en place localement pour certaines races. En France, les recherches ont été initiées dès 1993 dans les Pyrénées-Atlantiques (Barillet, Palhière et al., 2004) et ont permis en 1995 de mettre en place un typage des béliers utilisés pour l'IA des races laitières (Elsen, Barillet et al., 1997; Barillet, Palhière et al., 2004). Entre 2001 et en 2002, les programmes de sélection à grande échelle se sont généralisés dans différents pays européens dont la France sous la forme du Programme national d'amélioration génétique pour la résistance à la tremblante (PNARGT). Entre 2002 et 2009, le coût du programme a été partiellement pris en charge par le ministère de l'Agriculture (Arrêté, du 30 août 2002) et par la Commission européenne (European Commission, 2003a). La mise en place d'un tel programme a été également incitée par la police sanitaire qui créait une demande forte en animaux de renouvellement résistants.

Les Unités de promotion des races animales (UPRA) ont joué un rôle essentiel via les centres d'IA et les stations de sélection de reproducteurs où sont identifiés les animaux améliorateurs de chaque race. En fonction de la situation initiale des races (Tableau 5), soit les seuls béliers ARR/ARR ont été acceptés pour l'entrée en centre de sélection, soit les béliers porteurs de VRQ ont été exclus de l'entrée en centre de sélection et la production de béliers améliorateurs et porteurs d'ARR a été promue. Le programme s'est adressé en priorité aux éleveurs du noyau de sélection et s'est concentré sur la voie mâle afin d'optimiser les coûts. Par conséquent, la diffusion de la résistance a été plus limitée chez les femelles des sélectionneurs, elle a été globalement lente chez les éleveurs 'tout-venants' et a été accélérée par l'utilisation de l'IA (Palhière, Brochard et al., 2008). Pour la population générale, un programme de typage des béliers a été proposé via les groupements de défense sanitaire (GDS) grâce à un cofinancement des conseils généraux et de la Commission européenne mais ce programme n'a eu qu'un succès mitigé.

Le degré de sélection désirable n'est pas nécessairement l'obtention d'une population homozygote ARR/ARR car il peut suffire de baisser le taux de reproduction de la maladie, R, sous la valeur un, pour stopper le maintien de la maladie même si la persistance environnementale de l'agent infectieux ne permet pas d'exclure le risque de résurgence (Schreuder, van Keulen et al., 1997). Cependant, il semble qu'en pratique, la plupart des UPRA se soient mobilisées pour éliminer complètement l'allèle VRQ et ne produire que des béliers ARR. En 2008, 90% des béliers confirmés pour la reproduction de 19 des 22 races bouchères les plus fréquentes étaient ARR/ARR et cette proportion atteignait 99% dans neuf races. En race laitière, ce pourcentage était de 100% pour les races Lacaune et Manech tête rousse, de 53% pour la race Manech tête noire, 77% pour la race Basco-Béarnaise et de 30% pour la race Corse (Carole Moreno, communication personnelle).

Le succès des programmes de sélection génétique repose sur les hypothèses i) de la résistance à la tremblante a un caractère universel vis-à-vis des différentes souches, ii) de l'absence d'animaux génétiquement résistants mais potentiellement excréteurs silencieux de l'agent infectieux et iii) de l'absence de liens entre le gène PRNP et d'autres caractères faisant l'objet d'une sélection (Elsen, Barillet et al., 1997). Si les deux derniers aspects semblent confirmés (Barillet, Palhière et al., 2004), le premier a en revanché été partiellement contredit par la transmission de l'ESB à des

animaux ARR/ARR et l'apparente susceptibilité génétique à la tremblante atypique des ovins résistants à la tremblante classique qui a été évoquée précédemment.

Tableau 5 : Fréquences alléliques des principales races françaises en 1999 (Palhière, François et al., 2002)

Breed : race, Purpose : utilisation laitière (Milk) ou bouchère (Meat), n : effectif d'animaux testés

Breed	Purpose	n*	*PrP* alleles			
			ARR	AHQ	ARQ	VRQ
Basco-Béarnaise	Milk	149	0.399	-	0.601	-
Berrichon du Cher	Meat	95	0.805	0.063	0.105	0.026
Bizet	Meat	53	0.632	0.019	0.349	-
Blanc du Massif Central	Meat	120	0.250	0.050	0.621	0.079
Bleu du Maine	Meat	100	0.700	-	0.050	0.250
Caussenarde du Lot	Meat	106	0.151	0.174	0.604	0.071
Charmoise	Meat	99	0.313	0.030	0.495	0.162
Corse	Milk	152	0.470	0.039	0.487	0.003
Est à laine Mérinos	Meat	91	0.159	0.066	0.774	-
Grivette	Meat	68	0.441	-	0.544	0.015
Hampshire	Meat	103	0.602	0.005	0.379	0.015
Ile de France	Meat	99	0.687	-	0.146	0.167
Inra401	Meat	310	0.360	0.071	0.458	0.111
Lacaune, OviTest strain	Meat	100	0.400	0.030	0.505	0.065
Lacaune, Gebro strain	Meat	99	0.566	0.010	0.278	0.146
Lacaune, milk strain	Milk	561	0.545	0.016	0.427	0.012
Limousine	Meat	90	0.406	-	0.594	-
Manech blond faced	Milk	315	0.167	0.008	0.806	0.019
Manech black faced	Milk	122	0.496	0.012	0.488	0.004
Martinik	Meat	99	0.133	0.053	0.793	0.021
Mérinos d'Arles	Meat	99	0.359	0.025	0.591	0.025
Noire du Velay	Meat	55	0.227	-	0.736	0.036
Préalpes du Sud	Meat	101	0.441	-	0.559	-
Rava	Meat	71	0.430	0.007	0.528	0.035
Rouge de l'ouest	Meat	96	0.667	-	0.250	0.083
Suffolk	Meat	98	0.704	-	0.281	0.015
Tarasconnais	Meat	97	0.325	0.010	0.660	0.005
Texel	Meat	100	0.270	0.050	0.590	0.090
Vendéen	Meat	101	0.163	-	0.822	0.015

Contrôle sanitaire officiel

Parallèlement à la sélection de la résistance génétique, une voie de certification a été mise en place sous forme d'un contrôle sanitaire officiel (CSO) (Arrêté, du 1er juillet 2004; Arrêté, du 3 avril 1998).

Le CSO est un programme basé sur le volontariat qui répond aux exigences communautaires pour les animaux destinés à l'exportation ou aux échanges intra-communautaires (European Commission, 2001). De nombreuses UPRA ont également imposé à leurs adhérents de participer au CSO. Les élevages concernés sont donc essentiellement les sélectionneurs et/ou les élevages ayant un débouché commercial pour la vente de reproducteurs à l'étranger.

Le principe du programme est d'exercer une surveillance privilégiée dans les troupeaux adhérents tout en garantissant un certain nombre de mesures de biosécurité visant à limiter le risque d'exposition à la tremblante :

- l'absence de signe clinique de tremblante dans le troupeau attestée par une inspection annuelle du troupeau par un vétérinaire sanitaire ;
- le dépistage EST sur 1% des femelles de réformes de 1998 à 2005 et systématiquement à l'équarrissage à partir de 2006 ;
- l'introduction uniquement d'animaux ARR/ARR ou issus de cheptels adhérant au CSO.

Le troupeau bénéficie de la certification au bout de trois ans d'inscription et tant qu'il maintient les mesures décrites. En cas d'apparition d'un cas de tremblante, classique ou atypique, la qualification du troupeau est suspendue.

Il est à noter que la DGAl ne dispose pas de la liste exhaustive des adhérents au CSO et que les résultats des tests de dépistage n'ont pas toujours été correctement identifiés comme correspondant au CSO dans la BNEST.

La tremblante atypique est une EST assez peu connue, découverte au laboratoire et pour laquelle la plupart des données ont été collectées de façon fortuite via les systèmes de surveillance et les mesures de contrôles qui sont communes à la tremblante classique. Les dispositifs d'études et les connaissances physiopathologiques étant conditionnés par ceux de la tremblante classique, nous nous appuierons fréquemment sur une comparaison entre ces deux maladies.

Chapitre 2 : Détection de la tremblante atypique via la surveillance active

2.1. Présentation des études

Le chapitre précédent a montré que les connaissances sur la tremblante atypique étaient limitées sur le plan physiopathologique, diagnostic et épidémiologique mais qu'elles sont suffisantes pour la distinguer de la tremblante classique et susciter un certain nombre de questions. Quelle est la prévalence de la tremblante atypique ? Varie-t-elle en fonction du temps et des canaux de surveillance ? Comment se situe-t-elle par rapport à la tremblante classique ?

L'objectif de cette partie est d'établir une estimation de la prévalence de la tremblante atypique ovine en fonction des années et des canaux de surveillance active ainsi que de décrire l'âge et le génotype des cas et les comparer à ceux estimés pour la tremblante classique.

La prévalence estimée à partir des programmes de surveillance active s'adresse à la population ovine adulte des animaux réformés ou trouvés morts à l'équarrissage. Il ne s'agit donc pas véritablement d'une estimation de la prévalence de la population générale adulte, puisque la grande majorité des animaux de cette population ne sont pas représentés. Toutefois, elle constitue une estimation dans une population plutôt plus à risque que la population générale et l'on peut en tirer des enseignements en la comparant entre différents groupes.
Pour estimer la prévalence de la tremblante atypique, seuls les échantillons analysés avec un des tests rapides recommandés pour la détection de la tremblante atypique sont comptabilisés dans le dénominateur.

Le type 'tremblante atypique' a été défini comme un profil Western Blot caractéristique à cinq bandes ou comme un échantillon dont la positivité par test rapide BioRad ou Idexx est répétable, mais qui fournit un résultat négatif en Western Blot. Cette dernière définition correspond à quelques rares cas (n=7) de tremblante atypique pour lesquels le profil à cinq bandes ne peut être obtenu en raison d'une trop faible quantité de PrP^{Sc} (Jean-Noël Arsac, communication personnelle). Ces deux définitions de la tremblante atypique ont été confondues en raison de l'absence, à ce jour, d'éléments évoquant une diversité phénotypique de la tremblante atypique (Arsac, Andréoletti et al., 2007).

La première partie de ce chapitre repose sur l'analyse du programme de surveillance pour la période 2002-2006 en France. Cette analyse, effectuée avec l'aide de Géraldine Cazeau, chargée de l'exploitation des données de surveillance des EST des petits ruminants à l'AFSSA Lyon, a été une des premières étapes de la thèse. L'analyse a été exploitée par le groupe de travail épidémiologie du Comité d'Experts Spécialisés pour les ESST de l'AFSSA (CES ESST) (AFSSA, 2007b) et a fait l'objet d'une publication dans la Revue de médecine vétérinaire, dont je suis second auteur, et qui comprend également des données sur les caprins (Cazeau, Fediaevsky et al., 2008) (Prévalence des formes classique et atypique de tremblante chez les petits ruminants en France entre 2002 et 2006, p.303). Cette étude a aussi été le support d'une communication orale au congrès de la SNGTV en avril 2007 (Fediaevsky, Ducrot et al., 2007) (Tremblante atypique acquis et interrogations, p. 285).

Cette étude a été réactualisée en grande partie lors de la rédaction du manuscrit, de sorte à inclure les données issues des années 2007 et 2008 ainsi que les données sur l'âge des cas en fonction du génotype bien que ces données n'aient pas été disponibles au moment où les études descriptives ont été réalisées.

L'analyse des données a permis de mettre en évidence les défauts du programme liés à la qualité des données ou aux différents biais ayant pu survenir en fonction des années. La prévalence de la tremblante classique était nettement supérieure à l'équarrissage ($6{,}9.10^{-4}$) qu'à l'abattoir ($1{,}6.10^{-4}$) et la différence était bien moindre pour la tremblante atypique ($5{,}8.10^{-4}$ à l'abattoir et $7{,}3.10^{-4}$ à l'équarrissage). Il apparaît également que la prévalence de la tremblante classique chez les ovins a décru au cours du temps alors que la prévalence de la tremblante atypique est restée globalement stable sur la période 2002-2008. A partir de l'échantillon analysé, les fréquences alléliques apparaissent stables au cours du temps. La réactualisation de l'étude a conduit à modifier légèrement nos conclusions puisque la différence de prévalence de la tremblante atypique à l'abattoir et à l'équarrissage qui n'était pas significative entre 2002 et 2006 l'était pour la période 2002-2008, les deux valeurs restant très proches.

La seconde partie de ce chapitre repose sur l'article 1, publié dans la revue *BMC Veterinary Research* en tant que *Research article* (Fediaevsky, Tongue et al., 2008) et qui a fait l'objet d'une communication orale au congrès Neuroprion 2007 (Fediaevsky, Tongue et al., 2007). Cette étude résulte d'une collaboration entre différents pays européens dans le cadre du groupe de travail *Risk and Control Programme* dépendant du réseau d'excellence Neuroprion. En mai 2006, lors d'une réunion de ce groupe de travail à laquelle j'avais pu participer, deux épidémiologistes, Maria Nöremark (Suède) et Petter Hopp (Norvège), ont présenté une étude portant sur l'estimation de la prévalence de la tremblante atypique dans 13 pays européens. Cette étude montrait que la détection de la tremblante atypique était très liée à l'utilisation de tests BioRad et que la prévalence de la tremblante atypique semblait similaire entre les pays. Cependant l'étude ne permettait pas de distinguer les différents canaux de surveillance ni de comparer la prévalence observée à celle de la tremblante classique. Il fut donc décidé de renouveler l'enquête en incluant cette fois les deux formes de tremblante et en différenciant la surveillance à l'abattoir et à l'équarrissage.

L'information relative aux tests rapides n'étant pas disponible dans les statistiques européennes, nous avons collecté directement auprès des pays les résultats détaillés des plans de surveillance active pour estimer et comparer la prévalence de la tremblante atypique et de la tremblante classique chez les ovins, stratifiées par pays, par canal de surveillance et par année.

Sur les 20 pays participants, la tremblante atypique avait été détectée dans tous les pays où les tests appropriés avaient été utilisés en nombre assez important. Dans la plupart des pays, la prévalence de la tremblante atypique et de la tremblante classique étaient faibles. La prévalence de la tremblante classique présentait une variabilité supérieure à celle de la tremblante atypique qui apparaissait remarquablement homogène entre les différents pays, les canaux de surveillance et au cours du temps. Les caractéristiques d'âge et de génotype des cas étaient conformes aux données de la littérature. Cette étude a montré que la tremblante atypique n'est pas rare par rapport à la tremblante classique. L'homogénéité de la prévalence de la tremblante atypique entre pays, entre canaux de surveillance et au cours du temps contrastait avec la situation de la tremblante classique, ce qui suggérait différentes étiologies pour ces deux maladies.

2.2. Analyse du programme de surveillance active des EST chez les petits ruminants en France continentale pour la période 2002-2008

2.2.1. Qualité des données

Les données issues du programme de surveillance des EST des petits ruminants ont été enregistrées dans la BNESST prévue initialement pour gérer les données issues du programme de surveillance de l'ESB chez les bovins.

Hétérogénéité des données

Les informations concernant les tests de dépistage ont été renseignées par les LDA qui avaient en charge l'analyse des prélèvements et les informations concernant les tests de confirmation ont été renseignées par le LNR. En raison de l'hétérogénéité de la gestion de l'interface entre les Laboratory Information Management System (LIMS) des LDA et la BNESST, la qualité des informations enregistrées diffère en fonction des laboratoires, en particulier pour l'identification des animaux et le programme de détection lorsque celui-ci n'est pas explicitement prévu dans la base (CSO tremblante, APMS de suivi).

Par ailleurs en 2006, le passage au dépistage exhaustif a été souvent réalisé dans des conditions de travail difficiles ce qui pourrait avoir entraîné une baisse de la qualité des informations accompagnant les prélèvements (dentition, race, sexe…).

Doublons sur les identifiants

Des doublons portant sur le numéro de prélèvement ont été identifiés et les analyses correspondantes ont été supprimées ou dédoublonnées suivant qu'il s'agissait de doublons vrais ou d'analyses correspondant à différents animaux.

Age des animaux prélevés

L'âge des animaux a été estimé à partir de leur dentition : nombre d'incisives de laits (IL) ou d'incisives définitives (ID). Les extractions de la BNESST que nous recevions ne fournissaient que la date de naissance obtenue par un algorithme de conversion de la dentition en une date de naissance fictive (Tableau 6).

Tableau 6 : Algorithme de calcul de l'âge en fonction de la dentition

Nombre d'incisives	Règle de calcul de la date de naissance	Age théorique
moins de 8 IL	Date de prélèvement - 60 jours	Moins de 2 mois
8 IL	Date de prélèvement - 180 jours	2 à 6 mois
1 ID	Date de prélèvement - 360 jours	6 mois à 1 an et demi
2 à 4 ID	Date de prélèvement - 540 jours	1 an et demi à 2 ans
5 à 8 ID	Date de prélèvement - 720 jours	2 ans à 4 ans
8 ID	Date de prélèvement - 1440 jours	4 ans et plus
« non renseigné »	01/01/1950	

Les animaux devant être testés à partir de 2 à 4 ID. La date de naissance fictive était peu interprétable et nous avons préféré utiliser la dentition obtenue par calcul inverse à partir de la date de naissance. En raison des durées variables des différents mois de l'année, le taux d'erreur du calcul est de l'ordre de 2 %.

Il est à noter que les services vétérinaires ont mené des investigations dans les élevages de naissance des cas afin d'essayer de déterminer leur campagne de naissance. Ces données n'ont pas été saisies dans la BNESST mais dans le fichier de suivi des foyers, par ailleurs, elles ne différenciaient pas l'âge déterminé par enquête, de l'âge déterminé par la dentition lorsque l'enquête n'avait pas permis de déterminer un âge précis. En exploitant les fiches d'enquêtes transmises par les services vétérinaires à la DGAl, il a été possible de consolider en partie le fichier de l'âge des cas.

Sexage des animaux prélevés

La base de données ne prévoyait pas que le genre puisse être indéterminé et la valeur par défaut était « femelle ». Dans la BNESST, le sexe ratio était de 2 mâles pour 100 femelles ce qui est sans doute trop bas par rapport à la réalité, cette variable n'était donc pas fiable.

Détermination de la race

Environ 80% des animaux ont été attribués à une race indéterminée ou à un croisement indéterminé, ce qui reflète en grande partie la réalité de l'élevage ovin en France. La race pure la plus représentée était la race Lacaune (environ 5%). L'identification de la race a été faite visuellement par l'agent en charge du prélèvement et le plus souvent uniquement à partir de la tête. Si dans quelques départements, comme les Pyrénées-Atlantiques et l'Aveyron, les types raciaux des ovins sont suffisamment majoritaires et/ou marqués pour permettre une reconnaissance fiable, dans de nombreuses régions d'élevage peu ou pas spécialisées, la diagnose de l'âge est plus incertaine. D'autant que dans ces départements, il est vraisemblable que l'agent préleveur ait moins de connaissances sur les races ovines. Cette variable est donc peu exploitable.

Programme de dépistage

Certains prélèvements effectués, notamment en 2002, dans le cadre de la police sanitaire, n'ont pas toujours été enregistrés dans le type de programme prévu. Certains LDA ont envoyé les fichiers de police sanitaire en indiquant qu'il s'agissait de tests faits dans le cadre du programme d'équarrissage. Avant 2007, les descripteurs des programmes de dépistage n'étaient pas complets et ne prévoyaient pas de modalité spécifique pour les programmes CSO et pour la surveillance renforcée à l'abattoir et à l'équarrissage (APMS AB et APMS EQ). A partir de 2007, une nouvelle version du LIMS distribué par la DGAl a permis ces distinctions mais tous les laboratoires ne l'ont pas utilisée. Pour un certain nombre de laboratoire, il a été possible de corriger les données historiques en utilisant les informations consignées en commentaires, et un reclassement des tests de police sanitaire a été effectué à l'occasion de l'étude sur les cas secondaires (voir l'article 5, p. 195) pour les animaux impliqués dans des cheptels faisant l'objet de mesures de contrôle.

Qualité des prélèvements

Les échantillons étaient constitués d'un prélèvement de tronc cérébral devant comprendre la zone de l'obex et, dans la mesure du possible à partir de 2005, un échantillon de cervelet. Ce dernier n'ayant cependant pas vocation à être analysé, il était absent dans la grande majorité des

prélèvements. Pour la surveillance à l'équarrissage, compte tenu des contraintes techniques liées à l'état de conservation des carcasses, les carcasses trop décomposées n'étaient pas prélevées.

La possibilité d'une différence de prévalence entre la tremblante atypique et la tremblante classique en fonction de l'état du prélèvement avait été suggérée. Cependant, en prenant en compte le programme de surveillance, il n'y avait pas de différence significative au seuil de 5 % en fonction de l'état du prélèvement (test de Chi-deux).

2.2.2. Etude du plan de sondage

Taux de sondage visés

Le nombre minimum d'animaux à tester a été fixé chaque année par la Commission européenne de sorte à détecter avec une probabilité de 95% une prévalence minimum de 0,02% puis de 0,005% à l'abattoir et de 0,1% puis de 0,05% à l'équarrissage (European Commission, 2001 ; European Commission, 2002; European Commission, 2003c; European Commission, 2003b; European Commission, 2005a; European Commission, 2005b; European Commission, 2006a). Les objectifs et les effectifs réellement testés annuellement pour la période 2002-2008 sont donnés dans le Tableau 7.

Tableau 7: Effectifs des ovins testés en surveillance active entre 2002 et 2008

*Il a été demandé de reconduire le plan en extrapolant à partir des objectifs donnés pour avril 2002 puis au mois de mai 2003 des objectifs plus précis ont été donnés en raison du faible nombre de prélèvements effectués en début d'année
**Exhaustif à partir d'avril

Plan	Année	Objectif	Tests réalisés	Tests recommandés tremblante atypique (%)
Abattoir	2002	41 200	33 663	30
	2003	Idem*	44 267	37
	2004	10 000	12 377	40
	2005	10 000	12 170	38
	2006	10 000**	263 181	43
	2007	10%	78 654	46
	2008	10 000 (1,7%)	14 813	48
Equarrissage	2002	18 700	17 323	18
	2003	idem	18 864	23
	2004	10 000	12 228	30
	2005	10 000	22 073	27
	2006	10 000	228 465	33
	2007	Exhaustif	249 240	41
	2008	40 000	71 456	46

Suite à la découverte de l'isolat d'ESB chez une chèvre en 2005, la France a décidé de passer à un dépistage exhaustif des caprins à partir de la fin de l'année 2005 alors qu'initialement elle avait prévu l'arrêt des tests. Puis, suite à la détection d'isolats suspects d'ESB chez des ovins, la surveillance a également été exhaustive chez les ovins théoriquement à partir de mai 2006, mais dans les faits, pas avant septembre 2006 dans la plupart des départements. Le dispositif de

surveillance a été progressivement allégé depuis 2007. L'évolution mensuelle des effectifs d'ovins testés en France à l'abattoir et à l'équarrissage entre 2002 et 2007 est donnée Figure 14.

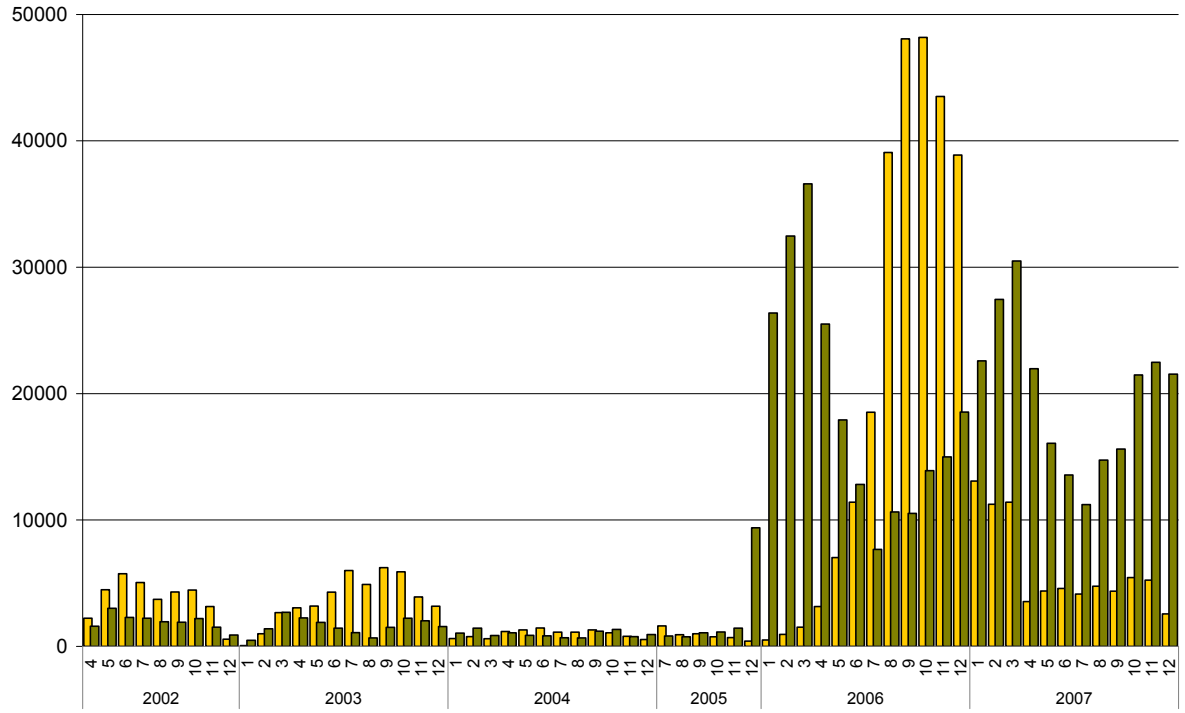


Figure 14 : Evolution mensuelle du nombre d'ovins testés entre 2002 et 2007 (source BNESST)

En ordonnées : nombre de tests, en abscisses : mois et année, en jaune : prélèvements à l'abattoir, en vert : prélèvements à l'équarrissage

Méthode de sondage

Les années où le sondage n'était pas exhaustif, les animaux devaient être sélectionnés par échantillonnage aléatoire mais aucun mode opératoire n'était imposé par la DGAl en raison de la diversité des situations rencontrées dans les différents sites de prélèvement.

Une enquête sommaire a été réalisée, par voie de questionnaire, en 2007-2008 par la DGAl auprès des DDSV. Le taux de réponse a été de 75%. Parmi les répondants, 34% des DDSV avaient mis en place un échantillonnage séquentiel à l'équarrissage ou à l'abattoir, les autres DDSV intervenaient le plus souvent dans des abattoirs dans lesquels peu d'animaux de réforme étaient abattus et elles effectuaient les prélèvements à jour fixe afin de faciliter l'organisation logistique pour le LDA et l'abatteur. Les trois quarts des DSV considéraient que l'étalement de leur échantillonnage au cours du temps était représentatif du flux d'animaux au site de prélèvement, à l'exception des changements d'objectifs de nombre d'animaux à tester au court du temps. Un quart des DDSV considéraient que certains animaux pouvaient être sur ou sous-représentés du fait de leur jour d'introduction à l'abattoir ou, plus rarement, de défauts d'identification des animaux.

Certaines DDSV ont également indiqué que les animaux maigres étaient plus souvent sélectionnés à l'abattoir.

Taux d'élevages sondés

N'ayant pas de registre fiable des cheptels ovins, l'estimation du taux d'élevages sondés est imprécise. Nous avons estimé ce taux en utilisant les effectifs recensés par Agreste et les effectifs issus de la BDNI pour la période 2002-2005 d'une part et pour l'année 2006 d'autre part. Avec les

données Agreste, 19,6% et 90,8% des élevages avaient eu au moins un animal testé respectivement pour les deux périodes et ces taux étaient respectivement de 23% et 77% à partir des données de la BDNI. Ces deux estimations s'accordent pour indiquer qu'avant 2006 moins d'un quart des élevages avaient eu un animal testé et que globalement, au cours de la période d'étude, près des trois quart des élevages de petits ruminants ont eu au moins un animal testé.

Nombre d'animaux testés par élevage

Au moment où nous avons étudié le programme de surveillance active, nous ne disposions pas des données permettant de calculer le taux de sondage annuel par élevage et nous avons seulement considéré la distribution du nombre d'animaux testés par élevage. Celle-ci est fortement corrélée aux effectifs des élevages mais reflète également les variations du taux de sondage et les biais éventuels de sélection (Figure 15).

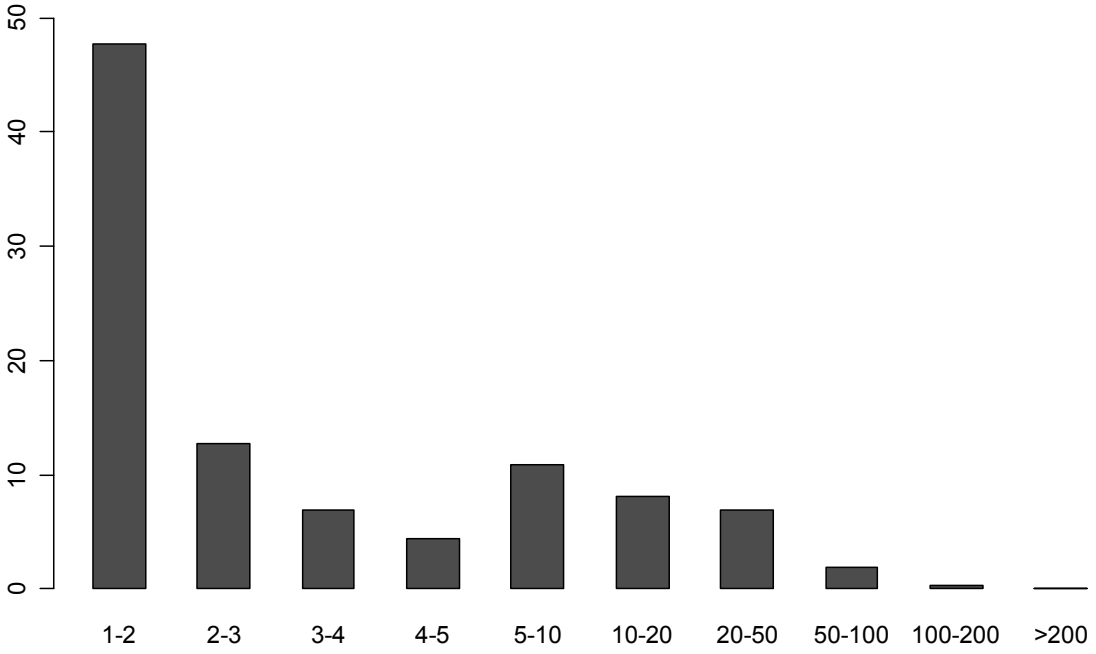


Figure 15 : Distribution du nombre d'ovins testés par exploitation

En ordonnées : Proportion d'exploitations concernées, en abscisses : nombre d'animaux testés (intervalles fermés à gauche et ouverts à droite)

Au total, sur 86 316 élevages, 47 % ont eu un animal testé et 13 % en ont eu deux, 25 % des élevages ont eu plus de six animaux testés. En moyenne sept animaux ont été testés par élevage avec un écart type de 17. Les élevages cas sont des élevages dans lesquels le nombre d'animaux testé est supérieur.

Répartition géographique du taux de sondage

Les taux de sondage départementaux ont été estimés à partir des données Agreste pour la période 2002-2006 à l'abattoir et à l'équarrissage (Figure 16, Figure 17).

La région PACA a l'un des plus faibles taux de sondage, malgré l'introduction du dépistage exhaustif. Les Pyrénées-Atlantiques connaissent également un relativement faible taux de sondage pour la période globale alors que ce n'était pas le cas avant 2006 (données non montrées). Cela pourrait traduire un échappement volontaire de la part des éleveurs.

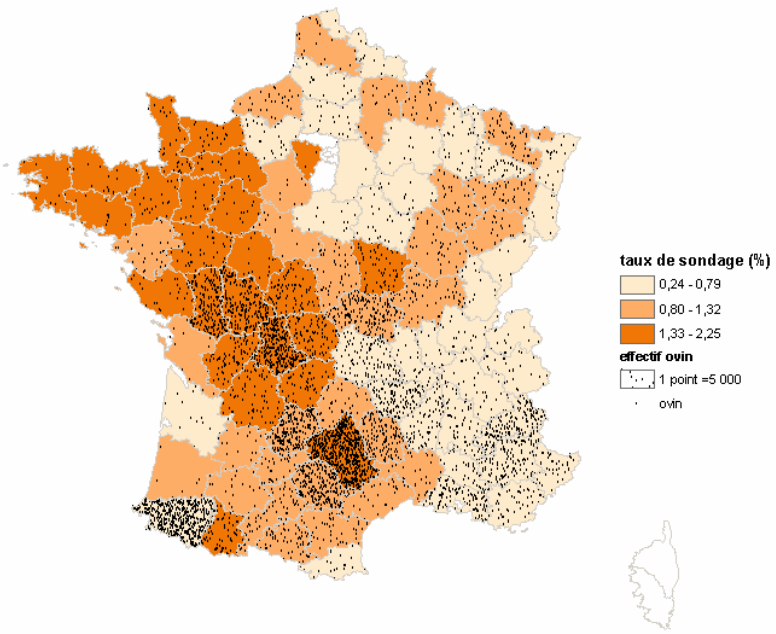


Figure 16 : Taux de sondage des ovins à l'abattoir (données cumulées pour la période 2002-2006).

Un point représente 5 000 brebis, le point étant placé aléatoirement à l'intérieur du département. Le dénominateur correspond à l'effectif de brebis par département, cumulé sur la période 2002-2006 (source Agreste).

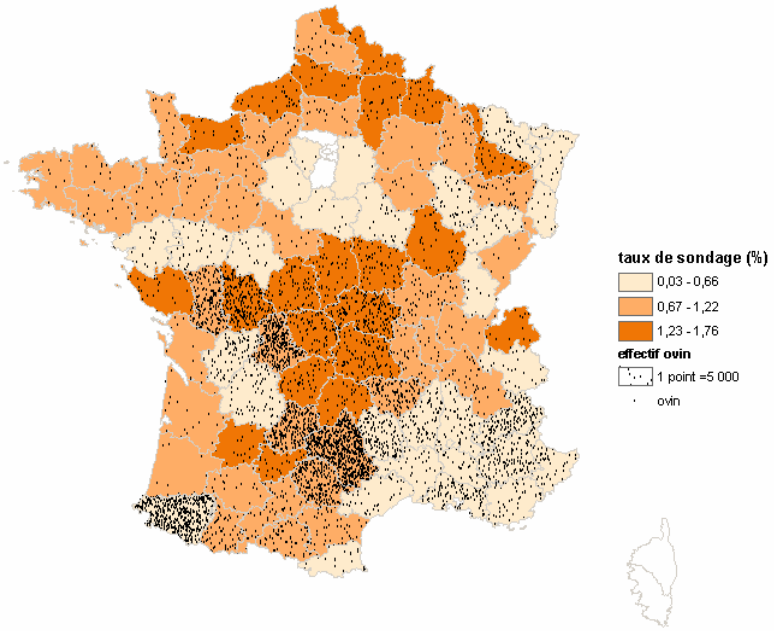


Figure 17 : Taux de sondage des ovins à l'équarrissage (données cumulées pour la période 2002-2006).

Un point représente 5 000 brebis, le point étant placé aléatoirement à l'intérieur du département. Le dénominateur correspond à l'effectif de brebis par département, cumulé sur la période 2002-2006 (source Agreste).

On observe un fort taux de sondage à l'abattoir dans l'Ouest et un fort taux de sondage à l'équarrissage dans le Centre. Il est possible que cela traduise un effet lié aux sites de prélèvements (gros abattoirs dans l'Ouest, site d'équarrissage de Bayet (Saria) dans le Centre).

2.2.3. Laboratoires et tests rapides

Tous les LDA sont soumis à des essais inter-laboratoires coordonnés par le LNR. Les essais sont spécifiques aux différents tests rapides et en fonction des résultats, la DGAl a délivré des agréments aux LDA. La plupart des LDA ont été agréés pour plusieurs tests rapides. En tout, 48 LDA ont été impliqués dans la réalisation de tests rapides à l'abattoir et 45 à l'équarrissage et la plupart des LDA étaient agréés pour plusieurs tests (Tableau 8).

Tableau 8: Utilisation des tests rapides par les LDA en surveillance active (2002-2008)

Test rapide	Nombre de LDA agréés	Nombre d'analyses
ELISA sandwich-BioRad	34	538 451
Enfer	2	1 954
HerdCheck Idexx	24	152 374
LIA Prionics	9	145 865
PrioStrip	2	40
TeSeE Sheep and Goat BioRad	2	733
Western blot Prionics	32	261 537

Durant les dernières années de surveillance, pendant lesquelles la plupart des animaux ont été testés, la proportion de tests rapides BioRad ou Idexx a globalement augmenté (Figure 18 et Tableau 7).

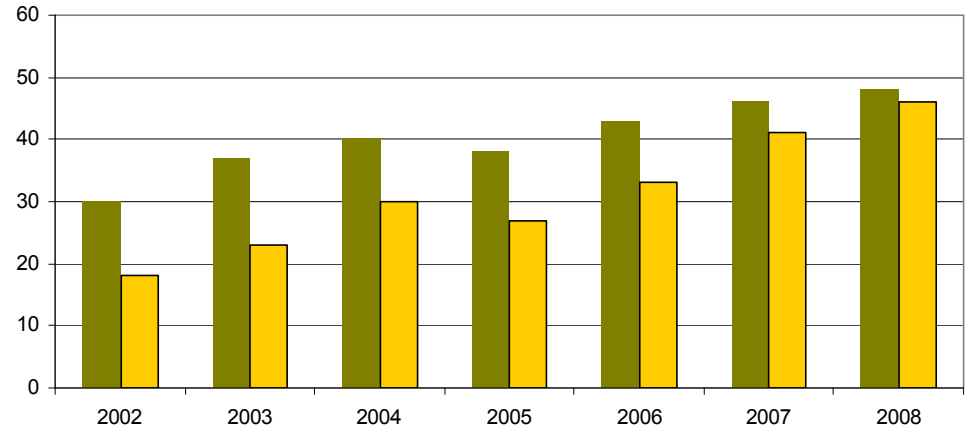


Figure 18 : Evolution de la proportion de tests recommandés pour la détection de la tremblante atypique à partir du tronc cérébral (source BNESST)

En ordonnées : proportion du nombre total de test effectués avec un test BioRad ou Idexx, en abscisses : année de surveillance, en vert : abattoir, en jaune : équarrissage

Cependant, au niveau géographique, la répartition de ces tests a été hétérogène, ce qui accentue la variation liée aux taux de sondage (Figure 19 à Figure 22). En fait, parmi les 26 laboratoires ayant réalisé plus de 10 000 tests pendant la période 2002-2007, huit laboratoires ont utilisé plus de 50% de tests ne détectant pas la tremblante atypique à partir de tronc cérébral (départements 02, 03, 31, 37, 40, 58, 81 et 87). Les tests réalisés dans les principaux sites de prélèvements, qu'il s'agisse de laboratoires ou d'équarrissage, ont été généralement répartis entre plusieurs LDA ce qui a atténué l'hétérogénéité au niveau des départements. On observe cependant que certaines zones, comme le centre de la France ou les Pyrénées pour la période 2006-2007, ont été moins fréquemment testées avec un test recommandé pour la détection de la tremblante atypique à l'abattoir.

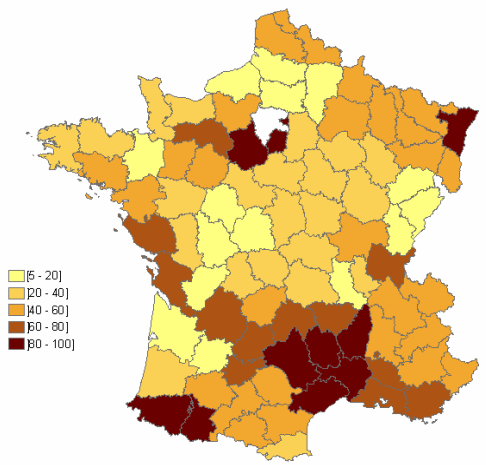


Figure 19 : Proportions de tests BioRad et Idexx (en %) à l'abattoir entre 2002 et 2005

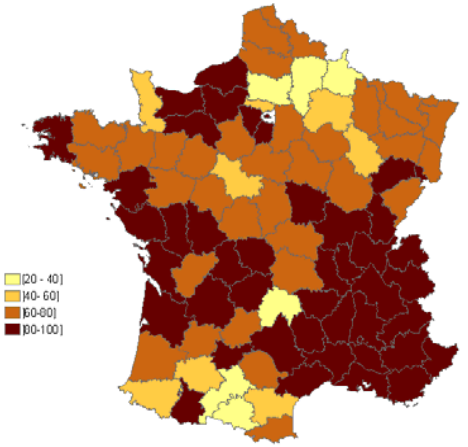


Figure 20 : Proportions de tests BioRad et Idexx (en %) à l'abattoir entre 2006 et 2007

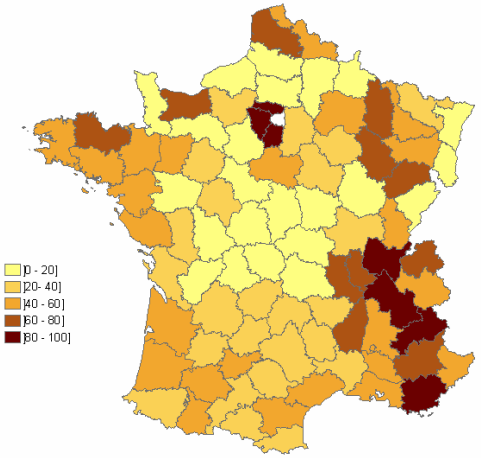


Figure 21 : Proportions de tests BioRad et Idexx (en %) à l'équarrissage entre 2002 et 2005

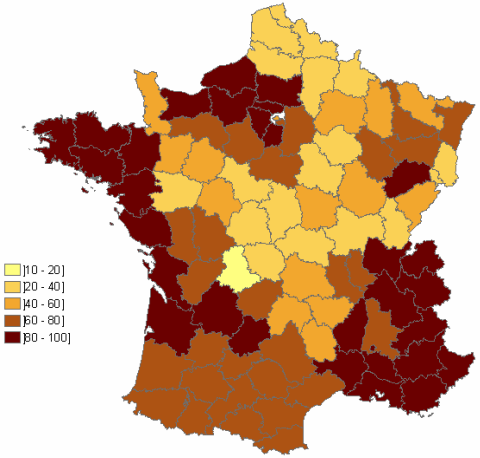


Figure 22 : Proportions de tests BioRad et Idexx (en %) à l'équarrissage entre 2005 et 2007

2.2.4. Génétique

Tests réalisés

En 2002 et en 2003, le génotypage devait être effectué sur 1 % des ovins prélevés aléatoirement. Ce pourcentage est passé à 3 % en 2004 et 2005, puis à 1 ‰ en 2006 (Tableau 9).

Tableau 9 : Nombre d'ovins négatifs génotypés par année et par plan de surveillance.

Plan	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
Abattoir	378	274	367	327	513	1859
Equarrissage	105	58	490	596	287	1536
TOTAL	483	332	857	923	800	3395

Entre 2002 et 2006, 55 prélèvements n'ont pu être analysés à l'abattoir et 51 à l'équarrissage. Au total, l'échantillon de 3 395 génotypes ainsi obtenu est très modeste comparé à la taille de la population ovine française.

Fréquences alléliques en fonction des années et des programmes

La distribution des fréquences alléliques est donnée pour les différentes années et les différents programmes. Les allèles ARH (rares) sont confondus avec les allèles ARQ et le phénotype du codon 141 est indéterminé.

Tableau 10 : Distribution des fréquences alléliques ARR, ARQ, AHQ et VRQ par année et par programme chez les ovins négatifs.

Equarrissage	Années					
	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
% ARQ	47 %	42 %	47 %	44 %	37 %	**43 %**
% VRQ	5 %	4 %	7 %	7 %	4 %	**6 %**
% AHQ	1 %	3 %	2 %	3 %	2 %	**3 %**
% ARR	47 %	50 %	44 %	46 %	57 %	**48 %**

Abattoir	Années					
	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
% ARQ	46 %	49 %	48 %	45 %	43 %	**46 %**
% VRQ	6 %	7 %	6 %	7 %	4 %	**6 %**
% AHQ	3 %	2 %	3 %	2 %	2 %	**3 %**
% ARR	45 %	43 %	43 %	46 %	50 %	**46 %**

Pour chaque programme, la distribution d'un allèle donné ne change pas significativement d'une année sur l'autre ($p = 0,2$). La distribution des allèles, après regroupement des années, n'est pas non plus significativement différente entre les programmes ($p = 0,25$).

Par la suite, les échantillons provenant des différentes années et des différents programmes ont été regroupés.

Répartition géographique des génotypes

Les animaux génotypés sont issus de la population des animaux dépistés pour les EST. Il s'agit donc d'un second degré de sondage. Les tests de génotypage sont assez bien répartis et il ne semble pas s'ajouter de biais à ceux déjà existants pour le sondage (Figure 23).

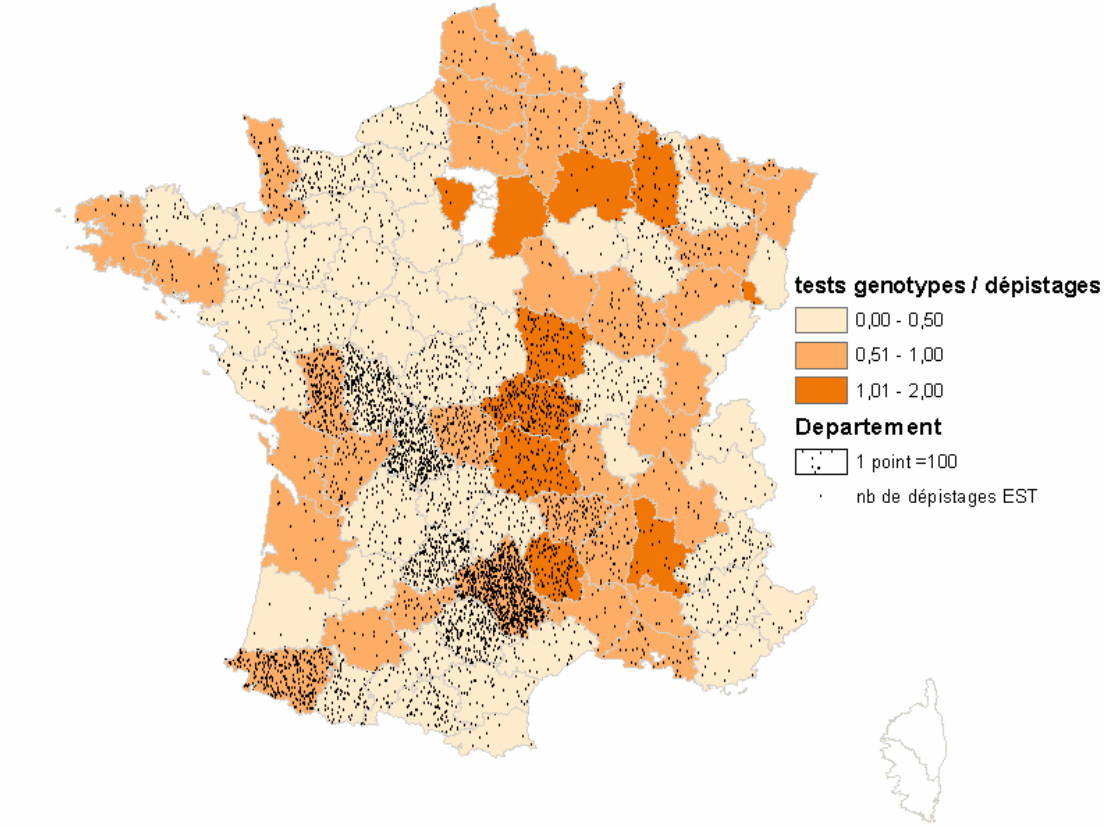


Figure 23 : Taux de génotypage des animaux dépistés pour la recherche d'EST.

Données cumulées pour la France continentale pour la période 2002-2006, programmes abattoir et équarrissage. Les départements en blanc n'ont eu aucun animal génotypé. Un point représente 100 animaux testés, le point étant placé aléatoirement à l'intérieur du département.

Nous nous sommes intéressés à la distribution des fréquences alléliques par département pour la période 2002-2006, abattoir et équarrissage confondus (Figure 24 à Figure 27). Pour chaque département, la distribution des fréquences alléliques a été comparée à celle de l'ensemble des autres départements par un test de Pearson. Dans les départements pour lesquels une différence a été mise en évidence, la fréquence de chaque allèle a été comparée à la moyenne nationale par un test d'homogénéité (Khi-deux dans les deux cas).

Les départements pour lesquels les différences étaient significatives sont l'Allier, l'Aveyron, la Haute-Loire, les Pyrénées-Atlantiques et la Vienne. Ces résultats sont à prendre avec prudence car il n'a pas été tenu compte des effets éventuels d'interdépendance entre départements voisins. Cela d'autant que la race ou le bassin sont peu individualisés dans certains départements comme l'Allier, la Haute-Loire ou la Vienne.

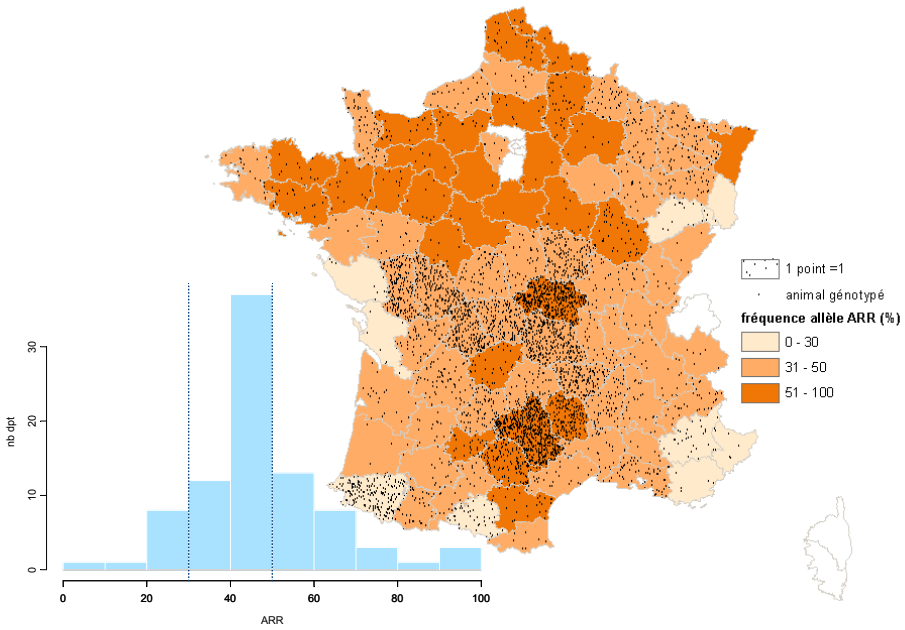


Figure 24 : Distribution de la fréquence de l'allèle ARR chez les ovins négatifs.
La fréquence de l'allèle ARR est statistiquement plus faible dans les Pyrénées-Atlantiques et la Vienne que dans les autres départements et plus élevée dans l'Allier, l'Aveyron, et la Haute-Loire.

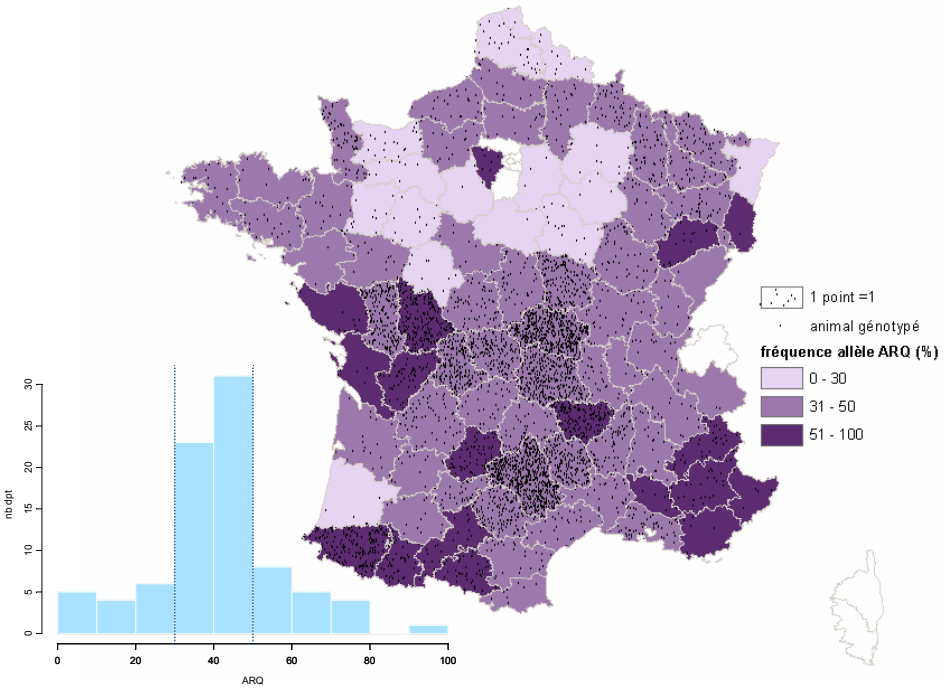


Figure 25 : Distribution de la fréquence de l'allèle ARQ chez les ovins négatifs.

La fréquence de l'allèle ARQ est statistiquement plus élevée que dans les Pyrénées-Atlantiques et la Vienne dans les autres départements et plus faible dans l'Allier, l'Aveyron, et la Haute-Loire.

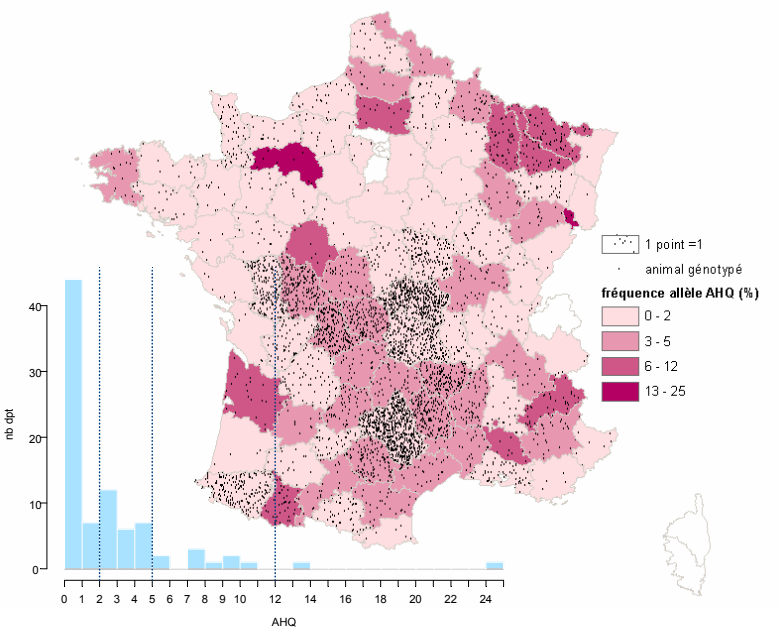


Figure 26 : Distribution de la fréquence de l'allèle AHQ chez les ovins négatifs.

Avec la méthode choisie, la fréquence de l'allèle AHQ n'est statistiquement pas différente selon les départements. Cependant, s'agissant d'un allèle rare, il pourrait s'agir d'un problème de puissance.

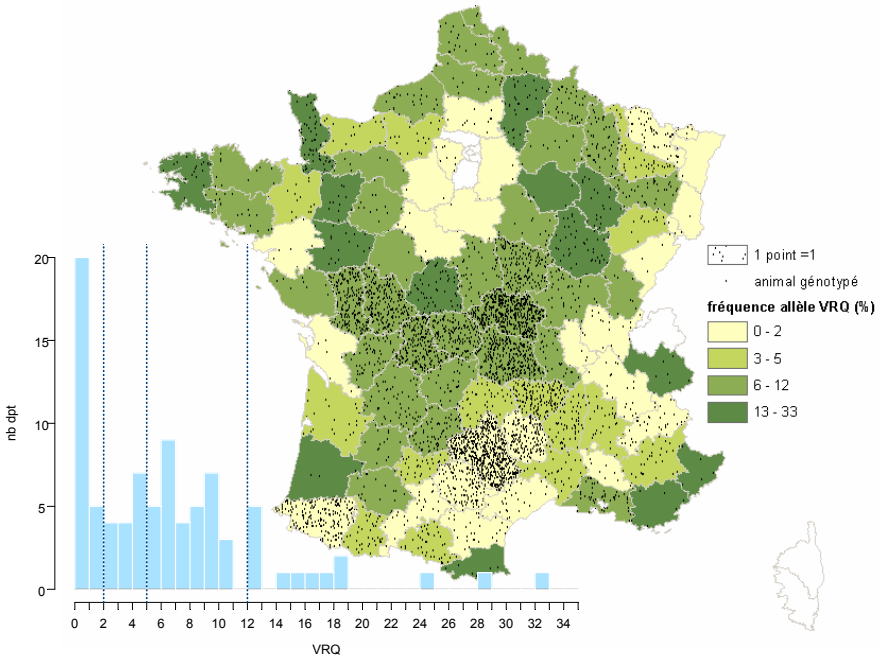


Figure 27 : Distribution de la fréquence de l'allèle VRQ chez les ovins négatifs.

La fréquence de l'allèle VRQ est statistiquement plus faible dans l'Aveyron et les Pyrénées-Atlantiques que dans les autres départements.

Fréquences alléliques par race

La population générale, principalement représentée par des animaux de races indéterminé ou croisées, présente une fréquence assez élevée de l'allèle ARR mais également de l'allèle VRQ. Les profils des races pures apparaissent assez contrastés, avec des races à faible fréquence d'ARR

(Basco-Béarnaise, Manech tête rousse, Mouton charolais), des races à forte fréquence d'ARR (Suffolk), des races à faible fréquence de VRQ (Basco-Béarnaise, Lacaune) (Tableau 11).

Tableau 11 : Répartition des fréquences alléliques par race (période 2002 à 2006, programmes abattoir et équarrissage confondus).

Race	Effectif testés	ARQ (%)	VRQ (%)	AHQ (%)	ARR (%)
Races Indéterminées	1704	44	7	3	47
Croisement	612	43	8	3	46
Lacaune	519	43	2	2	53
Manech Tête Rousse	62	75	2	2	20
Texel	47	44	10	3	44
Ile De France	43	28	12	5	56
Basco-Béarnaise	41	72	0	0	28
Moutons Charolais	37	57	11	3	30
Moutons Vendéens	37	42	12	1	45
Suffolk	37	27	5	0	68
Tarasconnaise	33	52	2	3	44

Nous avons étudié plus spécifiquement l'évolution des fréquences alléliques en race Lacaune pour laquelle les effectifs testés étaient plus importants. Malgré les programmes de sélection génétique précoces et la forte utilisation de l'insémination artificielle, nous n'avons pas observé d'augmentation de la fréquence d'ARR (p=0,1).

La distribution des fréquences des génotypes des cas est étudiée spécifiquement dans le chapitre suivant.

2.2.5. Prévalence

Prévalence de la tremblante atypique

En France, tous les cas de tremblante atypique ont été détectés avec les tests rapides BioRad et Idexx. L'intervalle de confiance à 95% de la prévalence a été estimé par la méthode binomiale (Tableau 12 et Figure 28). Les différences par année sont testées, d'une part, par un Chi-deux de tendance (test d'Armitage) et d'autre part, au moyen d'une régression logistique du nombre de cas en fonction du nombre d'animaux testés (fonction de lien binomiale) expliqués par l'année et le canal de surveillance.
Sur la période 2002 à 2008, il y a une légère baisse statistiquement significative à l'abattoir (Khi-deux de tendance, p = 0,02, OR d'une année à la suivante = 0,9 [0,87 – 1,01] et p = 0,02) mais pas de tendance à l'équarrissage (Khi-deux de tendance, p = 0,2, OR=0,95 [0,84 ; 1,04] et p = 0,2). La prévlaence globale pour la période 2002 à 2008 est de 0,57‰ à l'abattoir et 0,73‰ à l'équarrissage. La baisse de la prévalence à l'abattoir est essentiellement le fait de l'évolution entre les deux premières années et les années suivantes, puisqu'entre 2004 et 2008 il n'y a pas de tendance significative (Khi-deux de tendance, p = 0,4).

Il n'y avait pas de différence significative en fonction du plan de surveillance entre 2002 et 2006, cependant en intégrant les données de 2007 et 2008, il y a une augmentation légère mais très significative de la probabilité de trouver de la tremblante atypique à l'équarrissage par rapport à l'abattoir (en ajustant sur l'année de surveillance, OR = 1,38 [1,19 ; 1,80] et p=0,001).

Tableau 12 : Prévalence et intervalle de confiance à 95% de la tremblante atypique et de la tremblante classique ovine détectées par la surveillance active en France entre 2002 et 2008

		Tremblante atypique				Tremblante classique			
	Année	Tests	Cas	Prévalence (‰)	IC 95% (‰)	Tests	Cas	Prévalence (‰)	IC 95% (‰)
Abattoir	2002	14627	11	0,75	0,38 - 1,34	33663	16	0,48	0,27 - 0,77
	2003	25477	22	0,86	0,54 - 1,31	44267	19	0,43	0,26 - 0,67
	2004	8366	4	0,48	0,13 – 1,22	12377	6	0,48	0,18 - 1,05
	2005	7544	8	1,06	0,46 - 2,09	12170	3	0,25	0,05 - 0,72
	2006	195942	107	0,55	0,45 - 0,66	263181	21	0,08	0,05 - 0,12
	2007	66183	34	0,51	0,36 - 0,72	78654	6	0,08	0,03 - 0,17
	2008	13725	6	0,44	0,16 - 0,95	14813	1	0,07	0 - 0,38
Equarrissage	2002	3839	4	1,04	0,28 - 2,66	17323	104	5,97	4,88 - 7,23
	2003	5611	7	1,25	0,5 - 2,57	18864	24	1,27	0,81 - 1,89
	2004	5183	2	0,39	0,05 - 1,39	12228	19	1,55	0,93 - 2,42
	2005	7980	5	0,63	0,2 - 1,46	22073	29	1,31	0,88 - 1,88
	2006	110872	82	0,74	0,59 - 0,92	228465	161	0,7	0,6 - 0,82
	2007	171087	135	0,79	0,66 - 0,93	249240	73	0,29	0,23 - 0,37
	2008	60161	34	0,56	0,39 - 0,79	71456	17	0,24	0,14 - 0,38

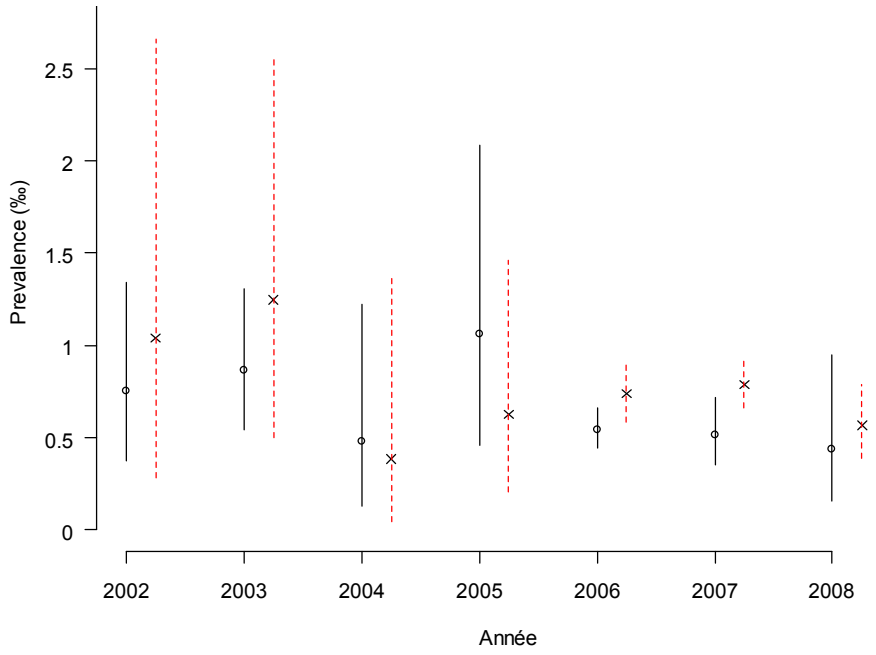


Figure 28 : Prévalence (en ‰) et intervalle de confiance à 95% de la tremblante atypique ovine entre 2002 et 2008

En noir et trait plein : prévalence à l'abattoir, en rouge et en pointillé : prévalence à l'équarrissage

Prévalence de la tremblante classique

Tous les types de tests rapides étaient compatibles pour l'estimation de la prévalence de la tremblante classique. L'intervalle de confiance à 95% de la prévalence est estimé par la méthode binomiale (Tableau 12 et Figure 29).

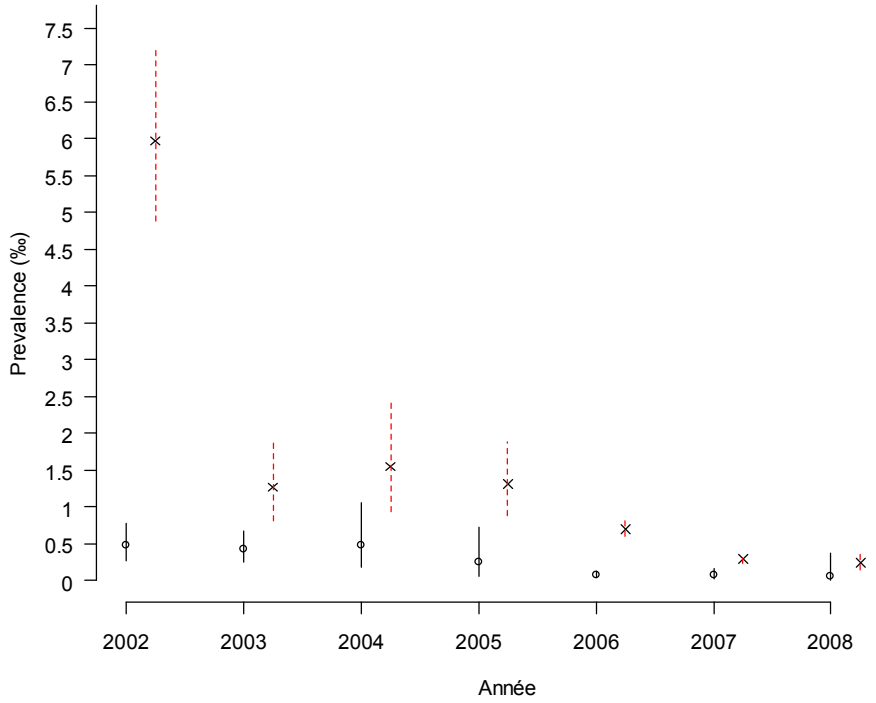


Figure 29 : Prévalence (en ‰) et intervalle de confiance à 95% de la tremblante classique ovine entre 2002 et 2008

En noir et trait plein : prévalence à l'abattoir, en rouge et en pointillé : prévalence à l'équarrissage

Entre 2002 et 2008, la prévalence de la tremblante classique a diminué de façon importante et statiquement significative à l'abattoir (Khi-deux de tendance, $p<10^{-10}$, OR d'une année à la suivante = 0,65 [0,57 ; 0,73] et $p<10^{-10}$) et à l'équarrissage (Khi-deux de tendance, $p<10^{-10}$, OR d'une année à la suivante = 0,59 [0,57 ; 0,63] et $p<10^{-10}$). La baisse est marquée en comparaison avec celle de la tremblante atypique. Une analyse de la mise en œuvre du programme en 2002 (Morignat, Cazeau et al., 2006), a fait ressortir que certains prélèvements issus de la police sanitaire avaient été classés à tort dans le plan équarrissage. Cependant, en éliminant l'année 2002, la tendance reste significative (Khi-deux de tendance, $p<10^{-10}$, OR d'une année à la suivante =0,66 [0,61 ; 0,72] et $p<10^{-10}$). Nous avons également vérifié que la baisse de la prévalence n'était pas le fait de la situation particulière dans les Pyrénées-Atlantiques qui concentraient un nombre important de cas (voir article 4).

La prévalence à l'équarrissage est significativement plus élevée qu'à l'abattoir, cette différence étant nettement plus marquée que pour la tremblante atypique (en ajustant sur l'année de surveillance, OR = 7,1 [5,52 ; 9,18] et $p<10^{-10}$) avec ou sans l'année 2002.

2.2.6. Etude de l'âge des animaux

Age des animaux testés

L'âge des animaux a été estimé par leur dentition (p. 73 et Tableau 6). Il n'est pas possible de connaître la distribution de l'âge des animaux présentés à l'abattoir ou à l'équarrissage et il n'est pas exclu qu'il y ait un biais de sélection en faveur de telle ou telle classe d'âge. Par conséquent, nous avons distingué la période 2002-2005 de la période 2006-2007 durant la quelle les tests ont

été pratiqués de façon quasi-exhaustive. Nous avons représenté la distribution de la dentition en fonction des mois de prélèvement à l'abattoir et à l'équarrissage d'une part, pour la période 2002 à 2005 et d'autre part, pour la période 2006 et 2007 (Figure 30). On s'attend à observer un pic d'animaux âgés en été à l'abattoir correspondant aux réformes, une mortalité des jeunes plus élevée au printemps et une mortalité des animaux âgés plus élevée en hiver (mise bas). Cependant, les fluctuations observées sont de faible amplitude. Elles sont possiblement atténuées par le manque de précision des classes d'âges définies par la dentition et éventuellement des erreurs de mesure. On remarque que la proportion d'animaux de la classe intermédiaire a légèrement diminué à l'équarrissage entre 2002-2005 et 2006-2007 au profit des animaux les plus âgés.

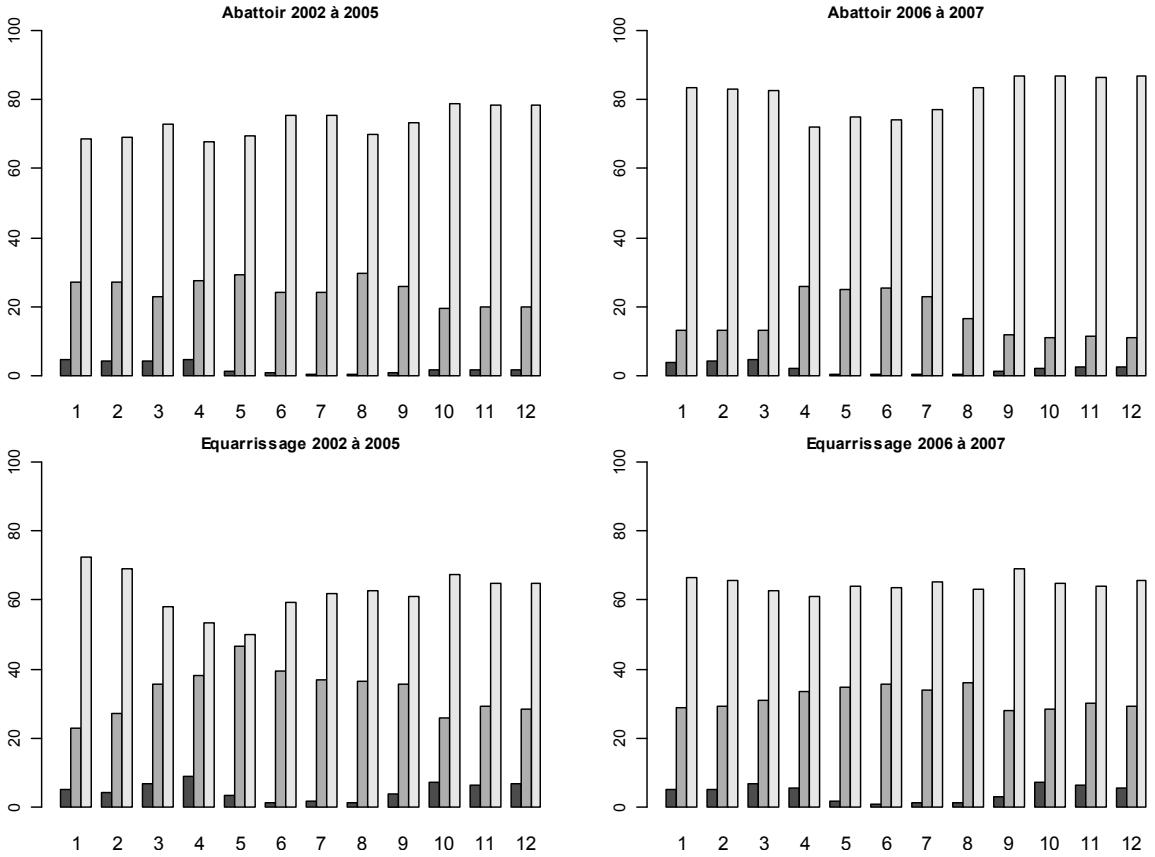


Figure 30 : Distribution mensuelle de la proportion d'animaux testés dans les différentes classes de dentition à l'abattoir et à l'équarrissage entre 2002 et 2007

En gris foncé : classe de dentition 2 à 4 ID, en gris moyen : classe de dentition 5 à 8 ID, en gris clair : classe de dentition 8 ID, en ordonnées : Pourcentage de chaque classe d'âge par mois, en abscisses : mois de l'année civile

Prévalence en fonction de l'âge

La prévalence en fonction de la classe de dentition des animaux a été calculée à partir des données précédentes.

Pour la tremblante atypique (Figure 31), la prévalence augmente avec l'âge (2 à 4 ID à 8 ID), quelque soit l'année et le plan de surveillance ($p<0,01$). Toutefois cette tendance est moins nette pour les animaux testés à l'abattoir entre 2006 et 2007. Cela peut résulter de plusieurs phénomènes non mutuellement exclusifs : un moins bon relevé de l'âge, des animaux âgés seraient repérés dans la catégorie 2 à 4 ID ; une diminution de la prévalence chez les animaux les plus âgés ; une augmentation de la prévalence chez les animaux les plus jeunes. Cette dernière hypothèse semble moins probable puisque globalement on assiste plutôt à une baisse de la prévalence.

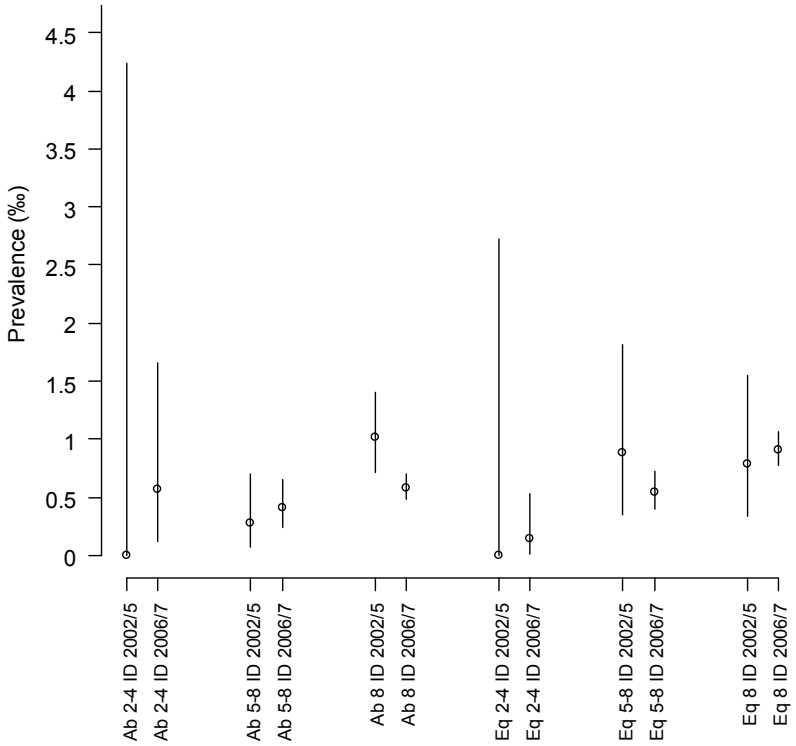


Figure 31 : Prévalence de la tremblante atypique en fonction de la dentition et du canal de surveillance pour la période 2002-2007 et IC 95%

En ordonnées : prévalence en ‰, en abscisses : canal de surveillance, Ab= « Abattoir, Eq = Equarrissage, 2002/5 : période 2002 à 2005, 2006/7 : période 2006 à 2007

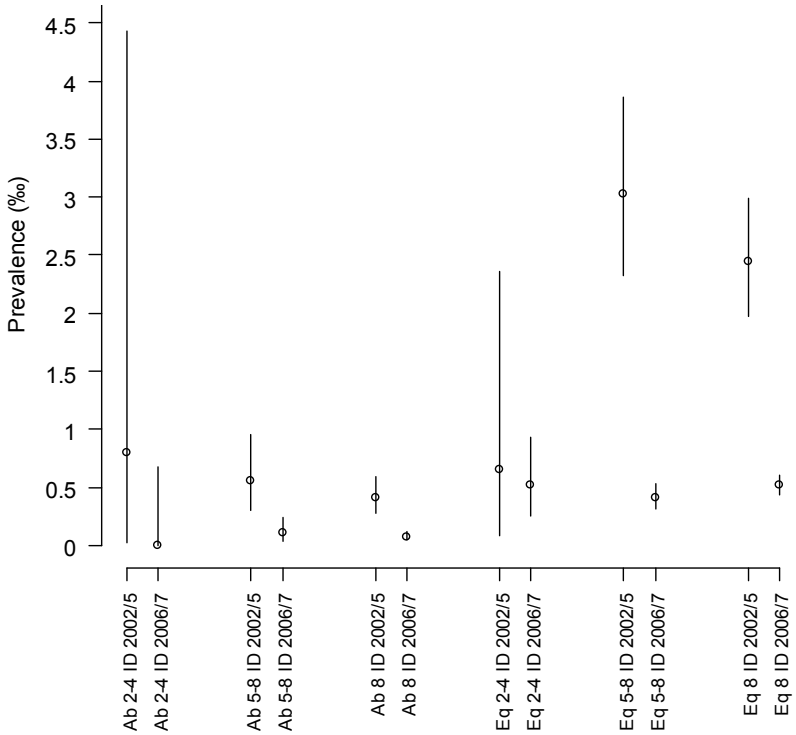


Figure 32 : Prévalence de la tremblante classique en fonction de la dentition et du canal de surveillance pour la période 2002-2007 et IC 95%

En ordonnées : prévalence en ‰, en abscisses : canal de surveillance, Ab= « Abattoir, Eq = Equarrissage, 2002/5 : période 2002 à 2005, 2006/7 : période 2006 à 2007

Pour la tremblante classique (Figure 32), les tendances ne sont pas significatives (p=0,5) et assez homogènes sauf pour la période 2002-2005 à l'équarrissage où la classe 2-4 ID est moins à risque que les autres.

Compte tenu de la qualité des données sur l'âge, il est délicat d'essayer d'analyser plus finement ce phénomène.

Age et génotype des cas

La distribution de l'âge des cas en fonction du génotype a été déterminée en fin d'étude, et seulement pour une fraction des cas pour lesquels un âge précis a pu être déterminé et le génotypage aux codons 136, 141, 154 et 171 analysé. Compte tenu des différences entre canaux de surveillance, les cas détectés à l'abattoir et à l'équarrissage sont reportés séparément (Figure 33 et Figure 34).

L'examen de ces données, dont la qualité est contestable, ne suggère pas de tendance particulière. Les cas des génotypes les plus sensibles (AFRQ/AFRQ) ne semblent pas plus jeunes que les autres. Les courbes ne présentent pas vraiment de modes et sont assez étalées.

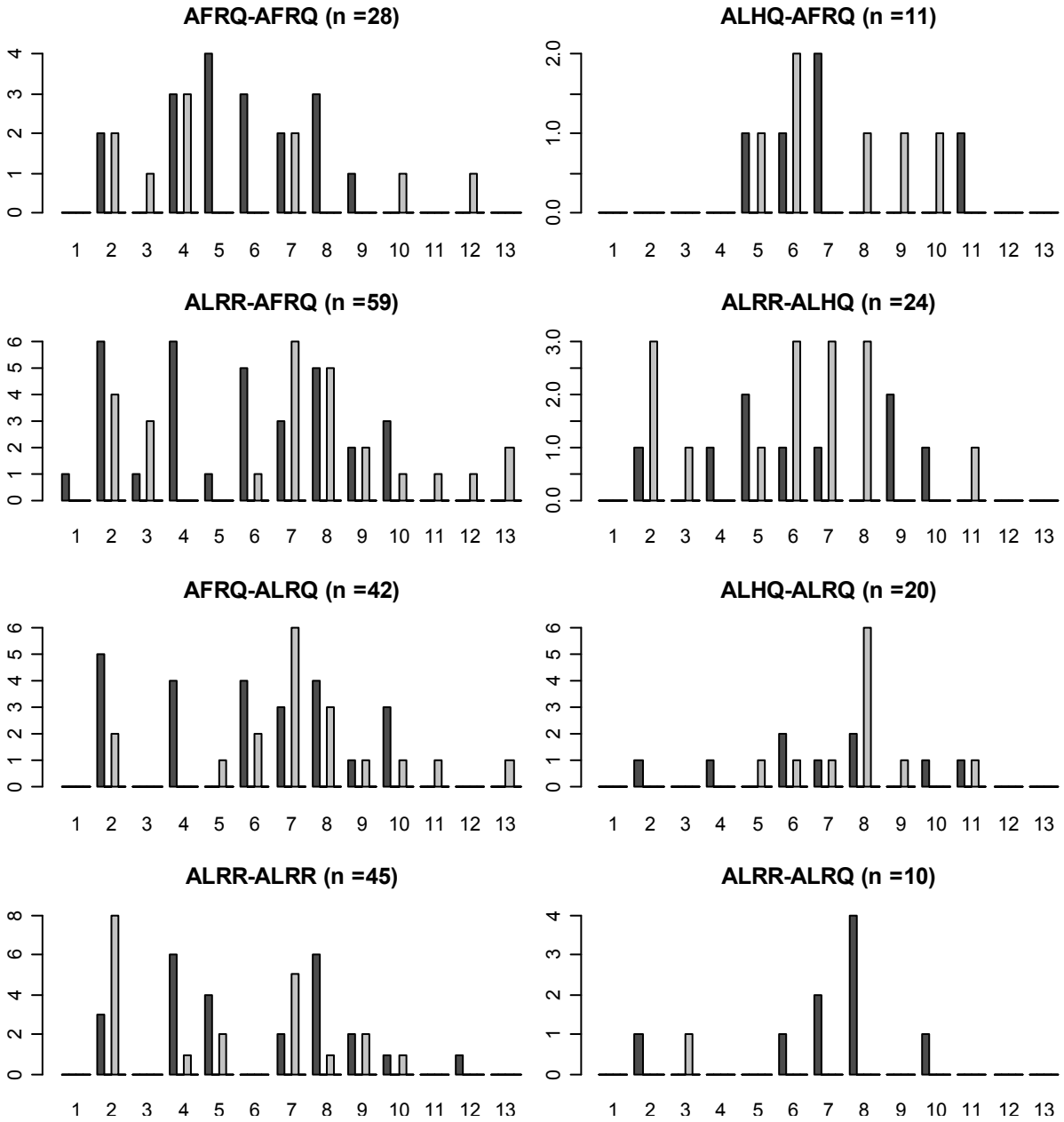


Figure 33 : Distribution de l'âge des cas de tremblante atypique par génotype

En ordonnée : nombre de cas, en abscisse âge en année, en gris foncé : abattoir, en gris clair : équarrissage, seuls les génotypes pour lesquels n ≥ 10 ont été représentés

Les données obtenues pour la tremblante classique ne sont pas non plus riches d'enseignements, on observe que les cas sont plus jeunes que les cas de tremblante atypique, quel que soit le génotype mais on ne peut affirmer que les cas du génotype le plus sensible (VLRQ/VLRQ) soient les plus jeunes, contrairement aux résultats issus d'études plus fines de troupeaux atteints et qui reposent sur des données plus fiables. Cela peut provenir de l'existence de différentes souches de tremblante classique dont les effets ne sont pas les mêmes en fonction de la structure génétique des foyers.

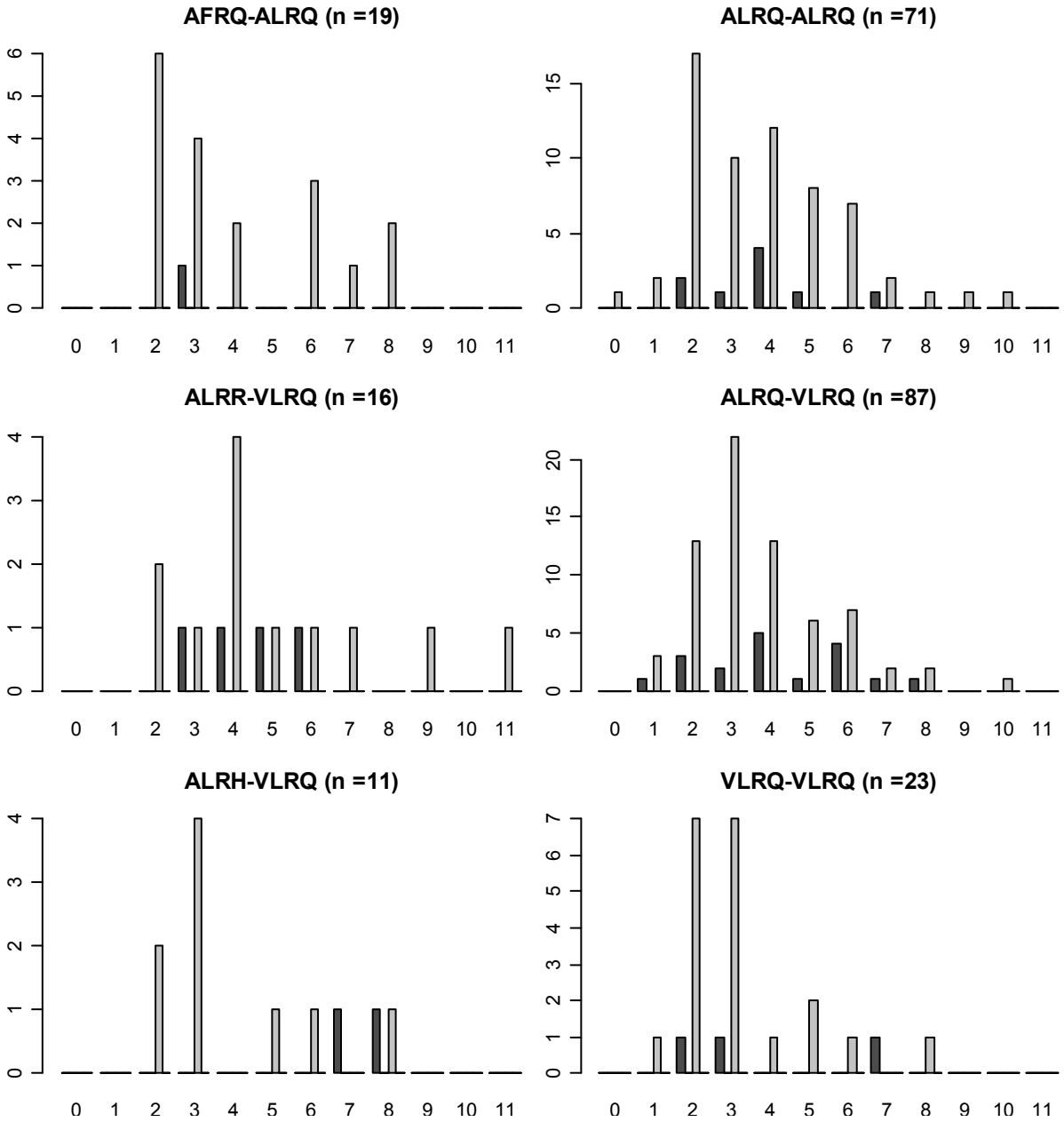


Figure 34 : Distribution de l'âge des cas de tremblante classique par génotype

En ordonnée : nombre de cas, en abscisse âge en année, en gris foncé : abattoir, en gris clair : équarrissage, seuls les génotypes pour lesquels n ≥ 10 ont été représentés

2.2.7. Discussion

Surveillance active

A partir des données de la surveillance active des EST chez les petits ruminants en France entre 2002 et 2006, il a été possible de décrire la prévalence des deux formes de tremblante et leur évolution dans le temps. Entre 2002 et 2006 les taux de sondage ont subi des variations en fonction des années, des espèces et des programmes de dépistage (équarrissage, abattoir). L'estimation de la proportion d'exploitations sondées s'avère délicate et varie selon la référence prise pour le recensement des exploitations. Par exemple, le registre d'immatriculation national comptabilise les

détenteurs dès le premier animal déclaré, à la différence des recensements Agreste qui ne comptent que les exploitations professionnelles. Aussi, aucun de ces deux dénominateurs n'est entièrement satisfaisant. Les estimations à partir de ces deux sources s'accordent cependant pour indiquer qu'entre 2002 et 2005, moins d'un quart des exploitations de petits ruminants ont eu au moins un animal testé. En ajoutant l'année 2006, c'est plus de la moitié (sans doute près des trois quarts) des exploitations de petits ruminants qui ont eu au moins un animal testé.

En l'absence de données sur les effectifs des exploitations sondées en France, la capacité de détecter un foyer en fonction du nombre d'animaux testés est difficilement estimable. On observe en toute logique que la probabilité de détecter une exploitation atteinte de tremblante augmente avec le nombre d'animaux testés dans l'exploitation. Cette relation a été déjà observée par d'autres pour la tremblante classique (Hopp, Ulvund et al., 2001 ; Hopp, Webb et al., 2003; Healy, Hannon et al., 2004 ; Philippe, Ducrot et al., 2005 ; Green, Del Rio Vilas et al., 2007 ; Boehning and Del Rio Vilas, 2009) et la tremblante atypique (Green, Del Rio Vilas et al., 2007). A propos de la tremblante classique, Boehning et al. ont par ailleurs montré que la relation n'était pas linéaire mais qu'elle impliquait des modifications du risque associé au biais de surveillance et au mode de diffusion de la maladie dans les grands troupeaux (Boehning and Del Rio Vilas, 2009).

Une hétérogénéité géographique des taux de sondage a été constatée. Même pendant la phase d'exhaustivité des programmes, décidée chez les ovins en 2006 à l'équarrissage puis à l'abattoir, il n'a pas été possible d'atteindre des taux de sondage homogènes sur le plan géographique. Ainsi, la région PACA a eu un des plus faibles taux de sondage, même depuis l'introduction du dépistage exhaustif. Les Pyrénées-Atlantiques ont également connu un relativement faible taux de sondage en 2006, ce qui est regrettable car ce département sert par ailleurs d'observatoire pour un certain nombre d'études épidémiologiques (Barillet, Palhière et al., 2004 ; Corbière, Barillet et al., 2007). Cela pourrait traduire un problème conjoncturel : le manque de nourriture pendant la période de sécheresse de 2006 a pu entraîner une réforme précoce d'une partie des animaux (Corbière F. communication personnelle). Au-delà des problèmes conjoncturels ne permettant pas d'atteindre les objectifs de nombre d'animaux à tester dans certains départements, il est probable que des biais de sélection des animaux se soient maintenus entre 2002 et 2008, éventuellement dus à un échappement volontaire ou non de la part des éleveurs. Cette hétérogénéité du taux de sondage dans le temps et l'espace a pour conséquences : i) une estimation moins précise de la prévalence de la tremblante classique dans les zones moins sondées, et donc une estimation biaisée de la prévalence nationale brute (Morignat, Cazeau et al., 2006) sachant que la prévalence de la tremblante classique n'apparaît pas homogène sur le plan géographique, ii) une sous-estimation de la prévalence de la tremblante classique si un échappement volontaire de la part des éleveurs a lieu. Cependant, cela ne concernerait vraisemblablement qu'un nombre limité d'animaux, car la positivité de l'obex pourrait être précoce par rapport à l'apparition des signes cliniques, iii) un biais supplémentaire dans l'estimation de la prévalence de la tremblante atypique. En effet, l'hétérogénéité géographique des taux de sondage est accentuée par la répartition géographique inégale de l'utilisation des tests rapides capables de la détecter. Le taux d'utilisation des tests BioRad/Idexx a augmenté au cours du temps et globalement plus de 60% des tests ont été réalisés avec un test permettant la détection de la tremblante atypique. L'impact de ce biais sur l'estimation de la prévalence nationale dépend de l'hétérogénéité spatiale du risque de tremblante atypique qui sera étudiée dans le chapitre 4.

Le programme de surveillance active des EST des petits ruminants a fourni une quantité importante de données mais de qualité discutable. Pourtant, dès ses premières années de fonctionnement des critiques constructives ont été formulées par l'AFSSA (AFSSA, 2004) et ont fait l'objet d'un stage de l'école nationale des services vétérinaires (ENSV) (Beloeil, 2003). En 2007, des recommandations avaient également été émises sur les mêmes points : standardisation des protocoles, gestion des données et contrôle des biais de sélection. L'augmentation du nombre de tests n'a pas permis de corriger ces défauts mais elle augmente la quantité de données disponibles aboutissant à des estimations très précises mais pas toujours exactes.

Prévalence en fonction du canal de surveillance

Au cours de la période 2002–2008, la prévalence de la tremblante classique était supérieure à l'équarrissage (0,69‰) par rapport à l'abattoir (0,16‰) d'un facteur 3,6. Ceci est conforme à la plupart des observations faites dans d'autres pays (Bird, 2003; Del Rio Vilas, Ryan et al., 2005; Del Rio Vilas, Hopp et al., 2007). Cet écart est vraisemblablement imputable aux animaux dont la mort a été causée ou favorisée par les manifestations cliniques de la tremblante classique.

Pour la tremblante atypique ovine, on n'observait pas de différence significative de prévalence entre l'abattoir et l'équarrissage entre 2002 et 2006 (Cazeau, Fediaevsky et al., 2007) par contre, sur la période 2002-2008, la prévalence à l'équarrissage (0,73‰) était statistiquement significativement supérieure à celle observée à l'abattoir (0,58‰). Le ratio des prévalences est de 1.3 ce qui n'est pas très éloigné de un, et si un peu moins d'animaux avaient été testés la différence ne serait pas significative (en divisant les effectifs de cas et d'animaux testés en 2006-2007 par trois la différence n'est plus significative). On peut donc considérer que cette différence bien que significative n'est pas importante. Cela pourrait s'expliquer par l'âge élevé à l'apparition des signes cliniques qui tend à se confondre avec la durée de vie commerciale des animaux. Il est également possible que l'âge réel des animaux testés à l'abattoir soit plus élevé qu'à l'équarrissage et que cela contribue à augmenter la prévalence à l'abattoir. Enfin il n'est pas exclu que certains éleveurs réforment de façon anticipée des animaux maigres ou au comportement anormal, sans nécessairement suspecter qu'ils soient atteints de tremblante, ce qui contribuerait à faire augmenter la prévalence de la tremblante atypique à l'abattoir par rapport à l'équarrissage. Cela peut être d'autant plus vrai que l'évolution de la maladie serait lente, notamment par rapport à celle de la tremblante classique.

Prévalence au cours du temps

La prévalence de la tremblante classique ovine présente une diminution significative entre 2002 et 2008 à l'abattoir et à l'équarrissage, et n'était pas due aux erreurs de classification de 2002. Cette diminution de prévalence est possiblement multifactorielle. Elle pourrait s'expliquer par un effet du contrôle de la maladie dans les cheptels atteints, notamment grâce aux restrictions de mouvements et à la recherche des animaux appartenant à la cohorte de naissance du cas. Par ailleurs, il a été montré que certains aliments concentrés avaient pu être une source de contamination pour la tremblante classique (Philippe, Ducrot et al., 2005). Les mesures de retrait des MRS puis l'interdiction des farines animales auraient contribué à réduire l'exposition alimentaire à la tremblante classique. Compte tenu de la longue période d'incubation de la maladie et de sa contagiosité modérée, il est vraisemblable que l'effet de ces mesures puisse se mesurer avec un décalage de quelques années. La diminution de la prévalence peut également s'expliquer par la sélection génétique des animaux résistants et l'élimination des animaux sensibles. Aux vues de

l'échantillon d'animaux génotypés, l'évolution des fréquences alléliques n'est pas statistiquement significative. Cependant, la fréquence de l'allèle ARR augmente et la fréquence de l'allèle VRQ diminue. Cette augmentation de portage de l'allèle ARR est d'ailleurs proche du seuil de significativité pour la race Lacaune (Khi-deux p = 0,06) qui connaît une diminution marquée de la prévalence de tremblante classique (entre 2002 et 2006, à l'abattoir Khi-deux de tendance : $p<10^{-6}$; à l'équarrissage, Khi-deux de tendance : $p<10^{-5}$). Une évolution récente de la structure génétique ne pourrait être observée que parmi la population la plus jeune, qui n'est actuellement pas testée. Par ailleurs, les élevages sélectionneurs connaissent déjà une évolution favorable de la structure génétique de leur troupeau (AFSSA, 2007a), celle-ci étant d'autant plus rapide que l'insémination artificielle est pratiquée. Au niveau de la population générale, l'évolution est plus lente.

La prévalence de la tremblante atypique semble nettement plus stable. La faible décroissance observée à l'abattoir pourrait résulter de biais démographiques car elle n'est pas observée à l'équarrissage. En 2008, la prévalence à l'équarrissage était légèrement plus basse qu'en 2007, mais de façon non significative et cela pourrait correspondre à des fluctuations aléatoires. Il n'y a pas de tendance significative à la baisse depuis 2002 à l'équarrissage mais les données observées nous invitent à rester attentifs à d'éventuelles évolutions. Si une baisse de la prévalence de la tremblante atypique était effectivement en cours dans la population générale, et qu'on ne la détectait pas à l'équarrissage, cela pourrait s'expliquer soit par le fait que l'abattoir serait plus sensible ou plus précoce pour la détecter soit par l'existence d'un biais compensateur à l'équarrissage. Etant donné que l'équarrissage est le canal où sont détectés les animaux à risque, il semble logique que ce canal soit également plus sensible pour détecter une évolution, ce qui semble d'ailleurs le cas pour la tremblante classique. Cela est toutefois à nuancer en fonction de paramètres démographiques comme l'âge moyen plutôt plus bas à l'équarrissage et à d'éventuelles différences génétiques que nous n'aurions pas pu détecter. Des mortalités importantes dues à la fièvre catarrhale ovine en 2007 et en 2008 ont du contribuer à faire baisser l'âge moyen à l'équarrissage et à y introduire des animaux morts d'autre chose ce qui aurait tendance à entraîner une baisse de la prévalence.
Il est possible que la fluctuation de la prévalence de la tremblante atypique soit liée à des fluctuations démographiques à l'abattoir, notamment des évolutions de la répartition mensuelle des animaux testés en fonction des années et dues à des modifications des objectifs des plans de surveillance. Les animaux les plus âgés étant principalement abattus à la belle saison, les années pendant lesquelles les tests ont été moins nombreux en début d'année pourraient avoir des prévalences légèrement plus élevées. Il est toutefois difficile de confirmer cette hypothèse en ne disposant que d'indicateurs grossiers pour l'âge des animaux testés. Par ailleurs, l'utilisation des tests recommandés pour la détection de la tremblante atypique à partir d'échantillons de tronc cérébral a augmenté au cours du temps, ce qui a pu avoir pour conséquence d'inclure des zones où les ovins étaient moins atteints. Dans ce cas, on devrait assister à une stabilisation de la prévalence au cours du temps. On doit également s'attendre à conserver des fluctuations aléatoires du nombre de cas qui, si elles sont nettement visibles sur une répartition mensuelle et sont lissées sur la répartition annuelle, restent toutefois perceptibles sur la répartition annuelle. Quoiqu'il en soit la prévalence de la tremblante atypique ovine en France n'augmente pas et nous considérons qu'elle est stable ou très légèrement en baisse ce qui indique que les mesures prises pour le contrôle de la tremblante n'ont pas eu autant d'influence que pour la tremblante classique. La discussion et l'interprétation de cette stabilité sera reprise dans l'étude suivante et dans la discussion générale.

2.3. Article 1 : Etude descriptive de la prévalence de la tremblante atypique et de la tremblante classique chez les ovins dans 20 pays européens

A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries

Alexandre Fediaevsky[1,2,§], Sue C. Tongue[3], Maria Nöremark[4], Didier Calavas[1], Giuseppe Ru[5], Petter Hopp[6]

[1] AFSSA-Lyon, Unité Epidémiologie, 31 Avenue Tony Garnier, 69364 Lyon Cedex 07, France
[2] INRA, UR 346 Epidémiologie animale, 63 122 Saint Genès Champanelle, France
[3] CERA, VLA Weybridge, Woodham Lane, New Haw, Addlestone, Surrey, UK. KT15 3NB
[4] SVA, National Veterinary Institute, 751 89 Uppsala, Sweden
[5] CEA-Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Italy
[6] National Veterinary Institute, P.O. Box 750 Sentrum, 0106 Oslo, Norway
[§] Corresponding author

Email addresses:
AF: a.fediaevsky@lyon.afssa.fr, SCT: s.tongue@vla.defra.gsi.gov.uk, MN: maria.noremark@sva.se,
DC : d.calavas@lyon.afssa.fr, GR : giuseppe.ru@izsto.it, PH: Petter.Hopp@vetinst.no

Abstract

Background

The development of active surveillance programmes for transmissible spongiform encephalopathies of small ruminants across Europe has led to the recent identification of a previously undetected form of ovine prion disease, 'atypical' scrapie. Knowledge of the epidemiology of this disease is still limited, as is whether it represents a risk for animal and/or public health.

The detection of atypical scrapie has been related to the use of only some of the EU agreed rapid tests. Information about the rapid tests used is not, as yet, available from public reports on the surveillance of transmissible spongiform encephalopathies in small ruminants. We collected detailed results of active surveillance from European countries to estimate and to compare the prevalence of atypical scrapie and classical scrapie in sheep for each country stratified by each surveillance stream; healthy slaughtered and found dead adult sheep.

Results

From the 20 participating countries, it appeared that atypical scrapie was detected in Europe wherever the conditions necessary for its diagnosis were present. In most countries, atypical scrapie and classical scrapie occurred at low prevalence level. The classical scrapie prevalence estimates were more variable than those for atypical scrapie, which appeared remarkably homogeneous across countries, surveillance streams and calendar years of surveillance. Differences were observed in the age and genotype of atypical scrapie and classical scrapie cases that are consistent with previous published findings.

Conclusions

This work suggests that atypical scrapie is not rare compared to classical scrapie. The homogeneity of its prevalence, whatever the country, stream of surveillance or year of detection, contrasts with the epidemiological pattern of classical scrapie. This suggests that the aetiology of atypical scrapie differs from that of classical scrapie.

Background

Classical scrapie (CS) is a transmissible, chronic, neurological disease affecting small ruminants that was first described clinically in the 18th century [1]. It belongs to the group of diseases called transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) together with, among others, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans. CS has a worldwide distribution with the exception of Australia and New Zealand, which are usually recognized as free of CS [2].

BSE was first detected in 1986 [3] and the BSE-agent is the probable cause of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in humans [4, 5]. Sheep in Europe have most probably been exposed to feed concentrates contaminated with the BSE-agent [6], and it cannot be ruled out that sheep might have been infected with BSE in natural conditions. In experimental conditions, BSE-infection can transmit horizontally between sheep [7], if such transmission occurred in usual husbandry conditions, it is feared that BSE-infection might persist in the sheep population with potential consequences for public health [8-10].

Because of this, the European Union (EU) introduced an active surveillance programme for TSE in sheep from 2002. The surveillance programme targeted sheep older than 18 months, both those sheep routinely slaughtered in abattoirs (healthy slaughter) and those sheep either found-dead or killed but not intended for human consumption (fallen stock). A sample size was set for each target population in each country [11, 12]. Later, the sample size requirements varied with amendments to regulation EC 999/2001 in 2002 [13], 2003 [14], and 2006 [15]. EU member states could test above these minimum requirements and non-EU member states were free to establish their own objectives.

Scrapie Nor98 was first detected in sheep in Norway in 1998 [16]. After the introduction of the active surveillance programmes in EU, scrapie Nor98 and TSEs in sheep designated "atypical scrapie" or "Nor98-like" have been reported from several other European countries [17-23]. Atypical scrapie (AS) cases have been characterized by the distribution of pathological changes and deposits of the disease-associated isoform of the prion protein (PrP^{Sc}), which have been most prominent in the cerebellum. The PrP^{Sc} has not been detected in peripheral tissues. The PrP^{Sc} associated with AS cases has a characteristic Western Blot profile [16, 17] and animals with specific prion protein (PrP) genotypes usually with the AHQ or $AF_{141}RQ$ allele are associated with the occurrence of the disease [16, 24-27]. In 2005, the European Food Safety Agency (EFSA) produced three documents, hereby used as reference. The first provided harmonised criteria to discriminate between AS (including scrapie Nor98) and CS [28]. The other two documents evaluated submitted tests. They recommended the use of eight tests (BioRad TeSeE (test A) and BioRad TeSeE Sheep/Goat (test G), Idexx HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit (test F), Enfer TSE Test v.2.0 (test C), InPro CDI-5, Institut Pourquier Scrapie Test, Prionics Check LIA Small Ruminants (test D), Prionics Check WB Small Ruminants (test B)) for the detection of CS on brainstem samples. For the detection of AS, all tests above, except test D, could be used on cerebellum or cerebrum samples but only three rapid tests (tests A, F and G) were recommended for the detection of AS in brainstem samples [29, 30].

In a Norwegian case-control study, based on 28 cases and 102 controls, none of the risk factors that measure transmission of scrapie between flocks by movement of animals or animal-to-animal contact were significantly associated with the occurrence of scrapie Nor98. In Great Britain, a study found that the flocks associated with atypical scrapie had a higher size and dealt with more stock than control farms but no connection between atypical scrapie farms was found [31]. Different authors have observed that one or two additional case of AS have been found in only a few flocks in which all or most of the adult sheep in flock were examined for TSEs when culled due to the detection of an AS [16 , 20, 26, 32]. Although AS was reported in 2005 to be transmissible into mice transgenic for ovine PrP [33] and into sheep [34] in 2007, the epidemiological evidences cited above suggest either that AS is not transmissible by direct contact between sheep, or that the transmission rate under natural conditions is low. Due to this and because the distribution of PrP^{Sc} has been limited to the CNS, a spontaneous aetiology for AS has been suggested [16].

In 2005 data on AS were collected from 13 countries in a questionnaire-based study [35]. The results of this study showed firstly that 95% of AS cases were detected by the BioRad Platelia/TeSeE rapid test (which represented 42% of the total number of tests) and secondly that the prevalence of AS was more similar between countries than the prevalence of CS was. It was suggested that the differences in the prevalence of AS might partly be explained by differences in sampling with regard to the surveillance streams and differences in the age structure or PrP genotype distribution of the population. However, these hypotheses could not be tested due to lack of data.

The aim of this work has been to estimate and to compare the prevalence of AS and CS in sheep for each country stratified by surveillance stream for the period 2002-2006.

Results

Participation

Twenty-three replies were returned from 22 countries and the Basque country of Spain. Three replies were excluded from the analysis because of missing information. Data from the following 20 countries or region within a country (hereafter called country) were included in the analysis: (Basque Country (Spain), Belgium, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Great Britain, Iceland, Ireland, Italy, Lithuania, Northern Ireland, Norway, Portugal, Slovenia, Sweden, Switzerland, The Netherlands).

Bias in the surveillance programmes

Most countries (14/20) considered that animals tested within the healthy slaughter programme were representative of the slaughtered population, the other six considered that some biases could have occurred.

Diagnostic tests used

The number of test results available and the type of diagnostic test used in active surveillance varied between countries. A total of 1,764,056 tests results were reported. Fifteen different diagnostic tests or combinations of tests were represented. Test A was the most common. This was used in 15 countries and represented 50% of the total number of analyses. The second most commonly used was test B, which was used in eight countries and represented 23% of the total number of analyses (Tableau 13).

The large-scale active surveillance programmes started in 2002; although some countries started earlier in healthy slaughter (Ireland, Iceland, Lithuania, Norway) or in fallen stock (Estonia, Iceland, Lithuania, Switzerland) populations, it was decided to limit the analysis to surveillance data from 2002 and onwards.

From 2002 to 2006, 56% of the samples in healthy slaughter and 42% of the samples in fallen stock were examined using test A. The overall use of tests recommended for the detection of AS in active surveillance varied between countries (Figure 35) and with time. In 2002, ten countries (Belgium, Estonia, Finland, France, Great Britain, Italy, Lithuania, Norway, Portugal, Sweden) used test A; by 2005 it was used by 15 countries (as above plus Basque Country, Cyprus, Iceland, Northern Ireland, Switzerland). The proportion of samples examined by test A has also increased in countries that used several tests. In 2006, tests A, F and G were used for examination of 73% and 53% of the samples in healthy slaughter and fallen stock, respectively.

Case detection

Fourteen countries reported AS cases. It was the only TSE in sheep reported in four countries (Figure 36). Five countries detected CS cases only. Most (94%) of the AS cases and 43% of the CS cases were detected by test A (Figure 37).

Classical scrapie prevalence estimates

The annual national CSPE for each surveillance stream, for which the number of tests exceeds 500, is presented in Figure 38 to Figure 41 (for prevalence estimates for years with less than 500 tests [see Fichier additionnel de l'article 1 : détails des prévalences de tremblante atypique et de tremblante classique estimées dans les différents pays européens, p. 313]). Due to higher values of the CSPE in Slovenia and due to lack of separation of AS and CS cases in data from Cyprus the estimates from these countries are reported in separate figures (Figure 40 and Figure 41).

For each year and country in which at least one CS case was detected, and more than 500 animals were tested, the CSPE in healthy slaughtered animals varied from 0.03‰ [0.0; 0.2] in Switzerland in 2004 to 2.8‰ [0.3;10.1] in Northern Ireland in 2005 (150.9‰ [105.6;206.3] in Cyprus in 2004 for TSE positive). The CSPE in fallen stock varied from 0.2‰ [0.0;1.2] in Norway in 2006 to 22‰ [15.3;29.5] in Slovenia in 2005 (245.6‰ [169.8;335.1] in Cyprus in 2003 for TSE positive). CSPE was null in 48 country-years and 6 countries did not detect any CS case.

Atypical scrapie prevalence estimates

Fourteen countries reported AS cases and it was the only TSE in sheep reported in four countries. The annual national prevalence estimates of AS (ASPE) for each surveillance programme are presented in Figure 42 and Figure 43.

For each year and country in which at least one AS case was detected and more than 500 animals tested, the ASPE in healthy slaughtered animals varied from 0.1‰ [0.0;0.3] in Switzerland in 2004 to 1.4‰ [0.8;2.3] in Great Britain in 2005 and the ASPE in fallen stock varied from 0.3‰ [0.0;1.5] in Norway in 2005 to 2.5‰ [1.0;5.2] in Great Britain in 2003. ASPE was null in 15 country-years and 5 countries did not detect any AS case.

Variability of classical scrapie prevalence estimates

The CS prevalence was significantly higher in fallen stock than in healthy slaughter in seven countries according to logistic regression models (Tableau 14). Six countries had detected CS but without significant difference in the CSPE between streams. Out of these, CS cases had been detected in three (Basque country, Norway, Switzerland) only occasionally. The prevalence in fallen stock was higher than in healthy slaughter in Belgium, although not significantly so (p-value = 0.06) and the prevalence in fallen stock was lower than in healthy slaughter in two countries (Czech Republic, p-value = 0.07 and Northern Ireland p-value = 0.35).

The detection of CS cases also varied with time. In seven countries (Basque country, Belgium, Czech Republic, Iceland, Northern Ireland, Norway, Slovenia), CS cases were not detected in every year, in Switzerland one case was found during the single year of surveillance. There was time-dependent variability of the CS prevalence in five countries, including Cyprus for TSE positives in the healthy slaughter population only, and Ireland in the fallen stock only. The trend was a decrease with time in all countries except Italy and Great-Britain. The results of the Chi-square linear trend test were consistent with the results of the logistic regression model, except for Italy where the trend was significant in healthy slaughter ($\chi^2 = 6.39$, df = 1, p-value = 0.01) but not in fallen stock ($\chi^2 = 1.42$, df = 1, p-value = 0.23).

Variability of atypical scrapie prevalence estimates

No significant difference between the streams was found in ten countries that detected atypical scrapie (all p-values > 0.1 and OR close to 1). In four countries, the AS prevalence was significantly higher in fallen stock than in healthy slaughter (Tableau 14).

In seven countries (Basque country, Belgium, Finland, Iceland, Northern Ireland, the Netherlands, Sweden) AS cases were not detected in every year. No time-dependent variability of the AS prevalence was found using logistic regression with adjustment on surveillance stream and time, parameterised as a categorical variable. However, there were some discrepant results depending on the parameterisation of the variable time. Significant time dependant effects were found when time was set as a continuous variable or using the Chi-square test for linear trend: significant decreases were found in France in healthy slaughter ($\chi^2 = 4.45$, df = 1, p-value = 0.03), in Great Britain in fallen stock ($\chi^2 = 6.84$, df = 1, p-value = 0.008), in Norway in fallen stock ($\chi^2 = 3.90$, df = 1, p-value = 0.05) and an increase in Portugal in healthy slaughter ($\chi^2 = 11.13$, df = 1, p-value = 0.0008).

Comparison of atypical scrapie and classical scrapie prevalence estimates

Differences between the ASPE and the CSPE were found in six countries (Tableau 15). In France and Great Britain, the ASPE was less than the CSPE in fallen stock. For the other countries with a significant difference, the ASPEs were greater than the CSPEs. The countries where no significant difference was found had relatively less samples tested than the other countries. The ORs could be calculated in both surveillance streams for four countries. In these countries, the ORs in the healthy slaughter stream were higher than the ORs in fallen stock. In particular, the probability (as a ratio) of detecting an AS case (rather than a CS one) was three to six times higher among healthy slaughter animals compared to fallen stock.

Probability to detect at least one case of AS

If one expects a country ASPE to be similar to the average European ASPE, this prevalence could be estimated by the ratio of the total number of AS cases detected by test A, F or G over the total number of tests A, F or G, which was 0.65‰ for the 20 respondent countries.

The sensitivity of the surveillance programme can be simulated to range from 50% to 100%.

A numerical example (Tableau 16) shows that given the number of samples examined with tests A, F and G in Estonia (4092) and in Lithuania (1933) the probability that no case is detected (given the assumed "design prevalence" of 0.65), even with a perfect sensitivity of the surveillance programme (Se = 100%) is higher than 5% (respectively 7% and 30%).

Comparison of the age of the cases

Data on the age of 1370 cases detected in healthy slaughter, fallen stock and TSE eradication programmes were provided by 15 countries. AS cases were reported in all classes of age over 18 months (Figure 44) and they were older than CS cases in healthy slaughter (p-value < 1.10^{-5}) and in fallen stock (p-value < 1.10^{-5}). Also, there was no significant difference between the age of AS cases in healthy slaughter and fallen stock (p-value = 0.14) although CS cases were older in healthy slaughter than in fallen stock (p-value = 0.001).

Description of the genotype of the cases

Eighteen countries provided the PrP genotype of 1258 cases detected in healthy slaughter and fallen stock (Figure 45).

The distribution of the allele frequencies (Tableau 17) between AS and CS cases was different in healthy slaughter ($\chi^2 = 300.6$, df = 4, p-value < 10^{-5}) and fallen stock ($\chi^2 = 384.4$, df = 4, p-value < 10^{-5}). In both streams, the frequency of ARR and AHQ carrier was higher in AS cases than in CS cases and the frequency of VRQ carriers was lower in AS cases than in CS cases. The allele frequency in the two surveillance streams was similar for AS ($\chi^2 = 2.547$, df = 4, p-value = 0.63). In contrast the allele frequencies differed for CS ($\chi^2 = 45.6$, df = 4, p-value < 3.10^{-9}) with more ARR carriers and less ARQ carriers in healthy slaughter compared to fallen stock.

Discussion

This study of the active surveillance for ovine TSEs in 20 European countries has produced estimates of the detected prevalence of both CS and AS over the time period 2002 to 2006, with respect to the surveillance stream. This extends previous studies on scrapie prevalence in Europe which have either been limited to one region or country [36-39] or have not discriminated between CS and AS [40, 41].

The capacity to determine the presence of either type of scrapie infection will depend on the true prevalence of disease and on several aspects of the surveillance programme. These are firstly, the ability to detect scrapie infection (if it is present) with the use of an appropriate screening test; secondly, the ability to confirm that diagnosis with relevant confirmatory tests; thirdly, the number of samples tested, and fourthly, the design of the surveillance programme. The latter includes many components from the structure of the sampled population to the sampling methodology used.

The detection of atypical scrapie – appropriate tests

The finding that the detection of AS was associated with the use of test A is consistent with the previous results presented by Nöremark et al. [35] and case reports from France [18], Germany [18], Great Britain [21], Ireland [20], Norway (as Nor98) [16], Portugal [22], Spain [23] and Sweden [17]. The tests recommended in the EFSA evaluation account for an increasing proportion of the total screening tests used (data not shown). It probably explains why AS cases have now been detected in the Basque country (Spain), Denmark, Finland, Iceland, Italy, and the Netherlands, in addition to the eight European countries where the disease has been previously reported [17, 18 , 19-22]. Neither Ireland nor Slovenia had used screening tests recommended for the detection of AS and AS was not reported via active surveillance in these countries. Two AS cases have, however, been reported from Ireland through the surveillance of clinical cases [20], which demonstrates that AS is present within the Irish sheep population. We observed that in two countries, test H and a modified version of test B have detected two AS cases each out of 18,940 and 13,529 tests respectively. However according to the trials organised by the EFSA [29], these tests could have a lower sensitivity, and by the end of 2006 they were still used on a limited scale compared to tests A, F or G which may explain why they were less frequently associated with the detection of AS case.

Probability to detect at least one case of AS

Estonia and Lithuania have regularly used test A but have not reported any case of AS. However, in these countries the total number of samples tested with screening tests recommended for the detection of AS is still relatively low. If AS is present at the estimated European average AS prevalence, Estonia has more than a five per cent chance of not yet detecting AS, whilst for Lithuania this chance exceeds 25 per cent. Therefore, AS is not necessarily absent from these populations, but might have remained undetected by chance because sufficient numbers of appropriate tests have not yet accrued.

The confirmation of atypical scrapie

Most countries reported that their diagnostic capacity to confirm AS was established in 2004. Some countries then retrospectively confirmed inconclusive diagnostic screening test results from previous years. These cases have been included when calculating the AS prevalence estimates. If not all samples with inconclusive results were retested, it could lead to an underestimation of the prevalence of AS.

Cyprus, is experiencing an epidemic of CS [42]. Discriminatory tests performed on 838 Cypriot TSE cases detected through TSE eradication programmes have not found any AS (P. Stylianou, personal communication). Although these samples are from outbreaks and are biased towards CS, we consider it probable that the majority of TSE-cases in Cyprus are CS. Therefore, we find it justified to compare the prevalence estimates on TSE cases in Cyprus with the prevalence estimates of CS from other countries. Nevertheless, the presence of AS cases cannot be ruled out.

The prevalence of scrapie (atypical and classical)

At less than nine per thousand animals tested in either surveillance stream from the majority of countries, both types of scrapie can be considered as rare diseases. The exceptions are Slovenia, which has a slightly higher prevalence (< 30‰) of CS in the fallen stock stream, and Cyprus for TSEs. The latter is a small, enclosed population with high connectivity that is in the throes of a (comparatively) recent scrapie epidemic [42].

In four countries (Portugal, Denmark, Sweden and Finland) AS cases were detected through the active surveillance programme, in the absence of any case of CS in sheep. The upper limit of the

confidence intervals of the prevalence estimates of the CS in these countries suggest that if the disease exists it occurs at a very low level, yet one cannot conclude freedom of the disease. The single case of CS found in 2006 in Norway after five years of active surveillance and 95,000 samples tested illustrates that CS could remain undetected by the current surveillance programmes for a long time, as during the same period four cases of CS were found through passive surveillance. This is probably due to a low overall sensitivity of the surveillance programmes. A lack of sensitivity of test A to detect CS cases in VRQ allele carriers such as suggested by [43] could be part of the explanation. However, in countries using different tests in parallel, the CSPE did not vary with the nature of the test used (data not shown).

Under-estimation of prevalence estimates

Active surveillance for the estimation of the apparent prevalence of infection of scrapie will always be an under-estimate of the true prevalence of infection. This is due to the long incubation period and the current absence of a detectable early marker for infection. Furthermore, even if the sheep tested within the healthy slaughter population are thought to be representative of the slaughtered population, this does not equate to the standing population. For example, in Great Britain the healthy slaughter population has been used to estimate the prevalence in the national flock [37, 44]. Differences in the age structure of source and sampled population could be a source of bias that could not be ascertained in the absence of reliable data.

The evaluation of EU agreed diagnostic tests [29, 30] did not include quantification of their sensitivity, which may differ from test to test. The overall sensitivity will be dependent on the stage of the disease and some infected sheep will remain undetected [45 , 46]. The same may be true for the screening test used on CSPE [43].

The estimation of the prevalence of AS is further complicated by the different tissue distribution of PrP^{Sc} compared to CS. The EFSA evaluation of small ruminant TSEs tests estimated the capacity to detect Nor98 cases in cerebrum samples [29, 30]. The obex is the tissue that is usually analysed in active surveillance programmes, as it is the site used for the discriminatory testing of TSEs in sheep to exclude BSE. The presence of PrP^{Sc} in the obex is not a consistent finding in AS, whilst the cerebellum is a site of increased deposition. Existence of cerebellum fragments in brainstem samples might explain the positive results for some cases [16 , 17-22, 32, 47]. Although the inclusion of a sample from the cerebellum has been recommended since January 2005 [48] it is not mandatory to test it. The inclusion of cerebellum fragments in the samples analysed will thus increase the likelihood of the detection of AS in that sample. If systematic differences in application of this existed between laboratories, the prevalence estimates of AS might be biased.

Comparison of the prevalence of a scrapie-type between surveillance streams within a country

Higher prevalence estimates of scrapie in the fallen stock stream when compared with the healthy slaughter stream have been reported previously [49]. This may be due to increased mortality amongst scrapie-infected sheep associated with their scrapie-status i.e. scrapie-infected sheep are less likely to survive to be submitted for healthy slaughter. However, in [49], AS cases were not distinguished from CS cases. In our study this situation was observed for CS in eight countries, and in Cyprus for all TSE positive cases. In the six other countries, no difference between streams was observed, which might be due to a lack of power to detect a difference, if it exists, due to the small sample sizes.

Prevalence estimates of AS were higher in the fallen stock stream than in the healthy slaughter stream in four countries (Finland, Norway, Portugal and Switzerland). This was not the case, however, in four other countries (France, Great Britain, Iceland and Italy) where there was a

difference observed for the prevalence of CS. Whether this reflects a true difference, or absence of difference, is difficult to ascertain. Depending on countries, it may reflect selection biases in the submission and collection of fallen stock schemes, and/or different farming and slaughter practices. Alternatively, it could be explained by differences in the age structure between the surveillance streams within a country. No difference was, however, observed in the age structure in countries where it could be tested (Czech Republic, France and Norway). For both types of scrapie, small sample sizes may have also explained the absence of observed difference between streams. The ratios found, of AS to CS for the prevalence estimates in each of the surveillance streams, could represent an actual difference in France, Great Britain and Italy, where large number of animals have been tested and cases of either disease are regularly found. If an actual difference does exist, one possible explanation could be a higher age at onset of clinical AS i.e. sheep become sick closer to the end of their commercial lifespan.

Variation in the scrapie-type specific estimates within a surveillance stream over time

In our study, decreases in the prevalence estimates for CS over time were observed in four countries and for the ovine TSEs prevalence estimate in Cyprus. This could result from a variety of factors. These include the effect of genetic selection based on PrP genotype and the reduction of sources of infection (control of animal movement, eradication programme, control exposure to contaminated feed). Such reduction echoes results of studies that evaluated control strategies based on mathematical models [42, 50-52].

In most countries, time was not a significant factor for ASPE. In France and Great Britain the observed trends in ASPE could be spurious due to increased number of tests in 2006, the discrepant outcomes between the Cochran Hermitage test and the logistic regression are more likely to occur with unbalanced counts [53]. The tests that found significant effect in time assume a linear variation of the prevalence which is not obvious. In addition, when the time variable is parameterised as categorical, the estimates of the coefficients of each year should be ordered in case of monotonic variation; this was not the case. The changes in the surveillance programme design in 2006 could have resulted in selection bias, for instance, since the number of tests increased in the second half of the year, the age distribution of animals tested in 2006 could be different compared to other years. In Norway, the decreased prevalence in fallen stock could be due to selection biases (such as a decrease in reporting when farmers realized that older animals were at higher risk for AS) and/or changes in the age structure of the sampled population. In Portugal unreported changes may have occurred in slaughterhouse operations; all slaughtered sheep were supposed to be sampled, yet the number of tests increased from 42,753 in 2004 to 53,748 in 2006. This would represent a 25 per cent increase in the slaughter throughput, over the two years period. In these four countries trend would need to be confirmed by future observations.

Genetic variability

It has previously been reported that the role of PrP genetics differs in AS compared to CS. In the latter the risk of developing clinical scrapie is greater for those sheep with the VRQ/VRQ, ARH/VRQ, ARQ/VRQ and ARQ/ARQ genotypes when compared with those that carry the AHQ and ARR alleles [54, 55]. There is little work published on the relative risks of infection [56, 57], although genotype-specific prevalence estimates by screening test have been published for the early British active healthy slaughter stream [43]. What makes AS so remarkable is the involvement of alleles usually associated with low to negligible risks of clinical scrapie [25-27, 58]. The case data in the current study are consistent with these previously reported findings, it also exhibits the rarity of cases in animals carrying the VRQ allele.

The impact of the genetic structure of the tested sheep populations could not be assessed here. Although results from surveys on genotype from healthy population were provided and/or published [58-64], information on the codon 141 is required when considering the risk of AS.

Age

Clinical scrapie is generally thought to occur most frequently in two to five year old sheep [65]. Analysis of surveillance data gave a mean age at death between 40 and 50 months of age [66] for clinical cases in the USA, and a peak incidence in three to four year old animals in Great Britain [41]. The high numbers of CS cases in the 18-36 months and 36-60 months categories, (and low numbers in the over 60 months categories) for those culled in eradication programmes and fallen stock, observed in our study are consistent with these published findings. The different profile for the age of CS cases in the healthy slaughter population most probably reflects a different underlying age distribution i.e. an older population from which CS cases have already been lost, either as clinical cases, fallen stock, or culling activities. In contrast, in our study, there is no 18-36 months old peak for AS cases; only an increase in numbers with age in the healthy slaughter and fallen stock populations. This is similar to findings reported from a German study [26]. Whether the difference between the age distributions of CS and AS is a function of survival, genotype, incubation period or age susceptibility remains to be established.

Bias in the surveillance programmes

The main potential for bias was the over-representation of certain flocks and possible geographical biases due to sampling rates applied in the different regions [39]. In addition, diagnostic laboratories in different regions in some countries used different tests, including those not recommended to detect AS. In some countries, there was the potential for seasonal bias either because of a change in the use of the tests during the year or, for 2006, because data did not cover the full year. For example, seasonal differences in the numbers submitted could bias the prevalence estimates if there were differences in the age distribution, or the breed of animals submitted that was related to the annual pattern of production, and if age or breed was associated with the outcome – a positive test result. However it is difficult to ascertain how such biases would influence the results without a dedicated study for each country.

In many countries, collection of fallen stock was voluntary or had been only recently organised on a compulsory basis. It was, therefore, expected that an important, but unknown, number of sheep that died on farms were not submitted for sampling. Difficulties to organise a proper TSE surveillance in small ruminants and especially in fallen stock was already stressed by the Scientific steering committee in charge of this matter [67]. The inclusion of animals that originated from known infected farms was reported in France (2002) [39] and in Ireland (2003 to 2006). In France, the decreasing trend observed in fallen stock for the CSPE is still significant for the period 2003 to 2006. In Norway, where there was no rendering plant, dead animals were reported to veterinary officers and TSE suspects animals were preferentially sampled. This could contribute to the explanation of the higher chance to detect AS in fallen stock.

Demographic differences

In both surveillance streams, demographic differences in the ovine population, especially those based on age and PrP genotype could influence prevalence estimates. No reliable data are currently available to standardise these figures, which is why no between countries comparison was performed. If such demographic data were collected then it might be possible to compare

active surveillance data between countries. These limitations in the data also apply to data collected during TSE eradication programmes; age and PrP genotype denominator data are vital. Here, seven countries reported that they had detected more than one case in the same farm, but we have no further information on the monitoring activities or the characteristics of these farms.

Comparison of the prevalence of atypical and classical scrapie within countries

Comparison of estimates of the prevalence of AS and CS is a complex issue. Firstly, the potential biases in the structure and implementation of the surveillance programmes, including the challenges of the diagnosis of AS can affect the result. Secondly, each country has its own scrapie history with respect to its presence, introduction, establishment and control activities. Thirdly, some differences might not have been detected because of only a limited number of tests or of cases.

In two countries - Portugal and Sweden - where scrapie was not reported for decades or was never reported, there was an increased chance to detect AS, compared to CS. So it could be considered that if CS were present, notwithstanding selection biases in the surveillance programme, it existed at an extremely low level. In contrast, in three countries where CS exists and there have been a large number of tests - France, Great Britain and Italy – there was higher chance to detect CS in the time period studied, compared to AS in fallen stock. It was also the case in the Netherlands when comparison was done upon tests B modified and H. In both France and Great Britain, however, there was increased chance to detect AS in the healthy slaughter stream.

For France, Great Britain and Italy, the method used to test the differences between the scrapie-type prevalence estimates was not ideal since it assumes an absence of interaction between disease and time. This was not the case as the trend in time was found to be statistically significant, but did not have a strong slope. Hence, the methodology might not be sufficiently robust for these conditions.

The ORs of the two types of scrapie by stream provides a way to measure if the two streams of surveillance within a country have similar outcomes and if some general pattern could be observed across countries such as France, Great-Britain, Norway and Portugal. However, the values of these ORs depend on more than one factor and similar results could come from different patterns. First, it depends on the contrast between AS and CS in each stream, the later being more frequent in fallen stock, secondly it is supported by the fact that CS is more frequent in fallen stock than in healthy slaughter. Eventually, it could indicate an higher probability of detecting AS instead of CS in the healthy slaughter stream compared with fallen stock. This could be due to some confounding effects. The different age distribution within the two streams, for instance, may account for that since AS mostly affects the eldest animals. A lower diagnostic sensitivity for AS in fallen stock could also contribute to that result, however such artefact has so far never been described from diagnostic reports on AS.

From our study, it would appear that AS is present wherever the capacity to diagnose it exists and a sufficient number of samples have been appropriately tested. In some countries that have no or an extremely low prevalence of CS infection, AS exists at a low, constant and homogenous prevalence between streams and countries. In other countries that have a more substantial prevalence of CS, (even if it is potentially decreasing), AS occurs, again at a relatively homogeneous prevalence. The homogeneity of the prevalence of AS in populations in which there are such variations in the prevalence of CS in populations would suggest that the aetiology and/or epidemiology of the two scrapie-types differ. The homogeneity of the prevalence estimates for AS provides support for the argument that it is not an infectious process; this would require the same conditions of transmission to exist in the different countries and for them to be different from the

conditions of transmission of CS. Yet, these data do not exclude an infectious process in which the transmission of AS occurs at a low level especially since low prevalence rates hinder observation of differences. In addition, differences in the design of the surveillance programmes or in the structure of the sheep populations, especially with respect to age and genetic, could hide actual differences in the estimates of the prevalence of AS and since data was absent this could not be assessed.

Conclusions

The Neuroprion task group on epidemiology of AS collected data on active surveillance of TSEs in sheep between 2002 and 2006 from 20 European countries. This has provided the first opportunity to compare the epidemiological situation of CS and AS simultaneously in different countries. This descriptive study has shown that the prevalence estimates of CS and AS have different patterns; the prevalence of CS has more variation than that of AS, which is remarkably homogenous. Since some biases and differences between countries were reported but not quantitatively assessed, it might be argued that the observed differences in the patterns of the prevalence of AS and CS are due, at least in part, to such biases. However, it would be unlikely that biases in different countries would consistently reduce the variability of ASPEs and not those of CSPEs. If complementary data becomes available, further analysis could explore some of the differences between countries, e.g. through adaptation of meta-analysis [49].

Methods

Data collection

In July 2006, a questionnaire was submitted to representatives of 27 European countries (Austria, Belgium, Bulgaria, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, The Netherlands, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, United Kingdom) that were involved in scrapie surveillance in accordance with EC regulation 999/2001 [48] with amendments and Iceland, Norway and Switzerland. In each country, the questionnaire was sent to both the Chief Veterinary Officer and the contacts of the country in the EU Network of Excellence Neuroprion and former SRTSE Network. They were requested to co-ordinate the completion and return of the questionnaire. A reminder was sent to countries in September and by the end of 2006 a preliminary description of contributions was returned to each participant, in order to check and to complete answers. Data collection was closed in May 2007.

The questionnaire covered information on both the design of the surveillance programmes for TSE in each of the healthy slaughter and fallen stock populations of sheep and the results for each year. For each surveillance stream (healthy slaughter or fallen stock), details of the sampling rate, the age structure of the sampled population, the identified or potential biases and any changes made in the surveillance programmes were requested. The number of sheep tested, the number of sheep with positive test results for AS and CS, and the make and type of TSE screening tests used were requested for each year of active surveillance from 2001 to 2006. Data on the age and genotype of atypical and CS cases (detected by active surveillance or TSE eradication programmes) were sought as well as data about PrP genotype frequencies from any sampled population within each country. Each country was asked for information about when it had the capacity to diagnose AS. A copy of the questionnaire is available from the corresponding author.

Data analysis

The questionnaire data were entered in a MS Access database (Microsoft® Access 2000 version 9.0. Microsoft corporation, WA, USA), statistical analysis and graphics were performed with R 2.4.0 [68], and maps were created with MapInfo (MapInfo Professional Version 5.5. 1985-1999 MapInfo corporation, NY, USA). For all statistical tests performed the significance level was set to 0.05.

Classical scrapie prevalence estimates

A 'positive classical' test result was a sample that was tested with any TSE screening test, gave a positive result and was confirmed as meeting the diagnostic criteria for CS [28]. In Cyprus, where discriminatory testing between CS and AS in active surveillance was not performed routinely the positive cases are expressed as TSE positive cases. A 'negative classical' test result was a sample tested with any screening test, that either gave a negative result or gave a positive result and thereafter confirmed as meeting the definition of AS [28]. The CSPE was calculated as the number of positive classical test results divided by the total number of screening test results, for each country, year and surveillance stream. The CSPEs were expressed as percentages.

Atypical scrapie prevalence estimates

The sensitivity for AS of some of the screening tests used in ovine TSE surveillance has been documented to be low [28] and we chose to include only the tests recommended for screening for AS when using brainstem material only, namely test A, F and G. A 'positive atypical' test result was a sample that was tested with either test A, F or G, gave a positive result and was then confirmed as meeting the definition of AS [28]. A 'negative atypical' result was a sample that was tested with either test A, F or G, and that either gave a negative result or that gave a positive result which was not confirmed as meeting the definition of AS [28]. The ASPE was defined as the number of positive atypical results divided by the sum of the positive and negative atypical test results and was expressed as a percentage.

ASPE was calculated for each country, year, and surveillance stream from the time the country was reported to have the capacity to diagnose AS. For each country and surveillance stream, analysis of the detection of AS started from the period the country was considered able to diagnose an AS case. Diagnosis of AS was taken to consist of having both the ability to detect (use of appropriate screening test) and the ability to confirm AS (access to appropriate confirmatory diagnostic tests). That period was set as the first complete year after the date on which the country reported that it had the capacity to diagnose AS, and any of the tests A, F or G was used. If the time from when the country reported that it had the capacity to diagnose AS coincided with the introduction of any of the tests A, F or G, the corresponding year was included since all the tests A, F or G performed during that year could have led to the detection of AS [see Tableau 19]. The ASPE was not estimated for 2003 in Northern Ireland because the test A and C were reported together.

Confidence intervals

Exact binomial 95% confidence intervals (CI) were computed for each prevalence estimate [Fichier additionnel de l'article 1 : détails des prévalences de tremblante atypique et de tremblante classique estimées dans les différents pays européens, p. 313].

The occurrence of each type of scrapie within a country

Logistic regression was used in order to investigate whether, within a country, the prevalence estimates varied between the two surveillance streams and/or over time. This was evaluated separately for each country and scrapie-type.

The outcome variable was the logit transform of the number of positive test results divided by the total number of negative and positive test results, as defined above in the estimates of prevalence for each scrapie-type. The explanatory variables were the surveillance stream (healthy slaughter or fallen stock, with healthy slaughter as the stream of reference) and year of surveillance. The year of reference of surveillance was the first year of surveillance applicable to the given country for the scrapie-type under investigation. The effect of the inclusion of each explanatory variable was tested by log-likelihood ratio test.

If the year of surveillance was found as a categorical variable, then both a linear effect over time and an interaction with the surveillance stream were tested for. Differences in prevalence estimates by year of surveillance were also tested for using the Chi-square test for linear trend.

If one of the two surveillance streams had only zero values, the effect of the year of surveillance was tested by using exact logistic regression. In the absence of a significant effect of the year of surveillance, all years were pooled and the Fisher exact test was performed to test for differences in the prevalence estimates of the two surveillance streams.

Comparison of the prevalence of the two different types of scrapie within a surveillance stream and within a country

The comparison of the prevalence of the two types of scrapie was performed, within a surveillance stream, by using the Mantel Haenszel test adjusted on year, or the Pearson Chi-square test if data from only one year of surveillance were available.

Probability to detect at least one case of AS

For each country that was capable of detecting AS, but which did not detect any AS case, the probability of detecting at least one AS case among all tested animals was estimated for the situation where the within country ASPE was set to equal the calculated overall prevalence of atypical scrapie in the responding countries. Assuming that the detection of an AS case is a Bernoulli variable that follows a binomial distribution (cases are assumed to be independent), the probability to detect no case of AS among n tests is:

$$P(X = 0) = C_n^0 \times (p \times Se)^0 \times (1 - p \times Se)^n = (1 - p \times Se)^n$$

Where p is the prevalence of AS and Se the diagnostic sensitivity of the surveillance programme.

Comparison of the age of the cases

In the absence of individual animal records, the age of sheep can be estimated by examination of dentition, which is an imprecise science [69]. Because we had mixed methods of ageing, we had to set broad age categories, compatible with the less accurate data from dentition. Age of cases were categorised into five broad classes (less than 18 months, 18 to 36 months, 36 to 60 months, 60 to 96 months and over 96 months). When age was given as a minimum (> xx months), the age was set to the class corresponding to that minimum. Differences in the age distribution of atypical and CS

cases, within each surveillance stream (healthy slaughter, fallen stock and animals culled in TSE eradication activities), were tested using the Mann-Whitney test.

Description of the genotype of the cases

The PrP genotype of cases requested was limited to information on the codons 136, 154 and 171, because codon 141 determination was not yet a routine procedure throughout the EU. Data on cases detected through TSE eradication activities (for example, the culling of affected flocks) were excluded from the analysis because of potential selection biases, since most eradication programmes select animals for testing preferentially according to their genotype. For each type of scrapie, the frequencies of allele carriers were calculated as the number of cases carrying the allele (homozygous or heterozygous) over the number of cases. The distribution of the allele carrier frequencies found in CS and in AS cases in each surveillance stream was compared by a Chi-square test.

Abbreviations

AS: Atypical scrapie, ASPE: Prevalence estimates of atypical scrapie, CI: Confidence intervals, CS: Classical scrapie, CSPE: Prevalence estimates of classical scrapie, EC: European Commission, EFSA: European Food Safety Agency, EU: Eureopan Union, PE: Prevalence estimates, PrP: Prion protein, PrP_{Sc}: PrP scrapie – the disease-associated isoform of prion protein, TSE: Transmissible spongiform encephalopathy,

Country codes

BC: Basque country (Spain), BE: Belgium, CH: Switzerland, CZ: Czech Republic, CY: Cyprus, DK: Denmark, EE: Estonia, FI: Finland, FR: France, GB: Great Britain (UK), IE: Ireland, IS: Iceland, IT: Italy, LT: Lithuania, NI: Northern Ireland (UK), NL: Netherlands, NO: Norway, PT: Portugal, SE: Sweden, SL: Slovenia

Authors' contributions

AF participated in the design of the project, collected the data, performed the statistical analysis and drafted the manuscript; ST led the project, participated in the design of the study, the collection of the data and the drafting of the manuscript; MN participated in the design of the study and contributed in the drafting of the manuscript; DC participated in the collection of the data, supervised the statistical analysis and contributed in the design of the manuscript; GR contributed to the analysis and to the discussion of the results; PH contributed in the design of the project and participated in drafting the manuscript. (All authors read and approved the final manuscript.)

Acknowledgements

This work was based on data collected through active surveillance programmes on small ruminant TSEs funded by the EU and within country sources. This study was conducted and funded within the frame of Neuroprion NoE, risk control group, led by Thomas Hagenaars. We would like to thank Jan Langeveld, thematic leader of Animal Control, who assisted us in gathering participants and Christian Ducrot, INRA Theix, for his support. We acknowledge the participation of the attendant to the risk and control programmes group: A. Buschmann, V. del Rio Vilas, S. Gubbins,

V. Luz, D. Matthews, C. Maurella, M. Milewski, L. Orge, L. Paisley, C. Saegerman, L. Sihvonen and S. Thorgeirsdottir.

We would like to thank all the people who have been implicated in the data collection and their affiliated institutions (see table 6).

References

1. Comber T, Morborne H: **A letter to Dr Hunter, physician in York, concerning the rickets in sheep**. *Real Improvements in Agriculture, Letters to Reade Peacock* 1772:73-83.
2. OIE: **Scrapie**. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees).* Paris: World organisation for animal health; 2004: 642-653.
3. Wells GAH, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R: **A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle**. *The Veterinary Record* 1987, **121**:419-420.
4. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C *et al*: **Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent**. *Nature* 1997, **389**(6650):498-501.
5. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG: **A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK**. *The Lancet* 1996, **347**(9006):921-925.
6. Philippe S, Ducrot C, Roy P, Remontet L, Jarrige N, Calavas D: **Sheep Feed and Scrapie, France**. *Emerging Infectious Diseases* 2005, **11**(8):1274-1279.
7. Bellworthy SJ, Dexter G, Stack M, Chaplin M, Hawkins SA, Simmons MM, Jeffrey M, Martin S, Gonzalez L, Hill P: **Natural transmission of BSE between sheep within an experimental flock**. *Vet Rec* 2005, **157**(7):206.
8. Baylis M, Houston F, Kao RR, McLean AR, Hunter N, Gravenor MB: **BSE - a wolf in sheep's clothing?** *Trends Microbiol* 2002, **10**(12):563-570.
9. Ferguson NM, Ghani AC, Donnelly CA, Hagenaars TJ, Anderson RM: **Estimating the human health risk from possible BSE infection of the British sheep flock**. *Nature (and supplementary information)* 2002, **415**(6870):420-424.
10. Kao RR, Gravenor MB, Baylis M, Bostock CJ, Chihota CM, Evans JC, Goldmann W, Smith AJA, McLean CA: **The Potential Size and Duration of an Epidemic of Bovine Spongiform Encephalopathy in British Sheep**. *Science* 2002, **295**(5598):332-335.
11. European Commission: **Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies**. *Off J Eur Communities* 2001, **147**(147):1-40.
12. European Commission: **Commission Regulation (EC) No 1248/2001 of 22 June 2001 amending Annexes III, X and XI to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards epidemio-surveillance and testing of transmissible spongiform encephalopathies**. *Off J Eur Communities* 2001, **1248/2001**:12-22.
13. European Commission: **Commission Regulation (EC) No 270/2002 of 14 February 2002 amending Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards specified risk material and epidemio-surveillance for transmissible spongiform encephalopathies and amending Regulation (EC) No 1326/2001 as regards animal feeding**

and the placing on the market of ovine and caprine animals and products thereof. *Off J Eur Communities* 2002, **45**:4-15.

14. European Commission: **Commission Regulation (EC) No 2245/2003 of 19 December 2003 amending Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards specified risk material and epidemio-surveillance for transmissible spongiform encephalopathies and amending Regulation (EC) No 1326/2001 as regards animal feeding and the placing on the market of ovine and caprine animals and products thereof**. *Off J Eur Communities* 2003, **333**:4-15.
15. European Commission: **Commission Regulation (EC) No 1041/2006 of 7 July 2006 amending Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards specified risk material and epidemio-surveillance for transmissible spongiform encephalopathies and amending Regulation (EC) No 1326/2001 as regards animal feeding and the placing on the market of ovine and caprine animals and products thereof**. *Off J Eur Communities* 2006, **187**:4-15.
16. Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schônheit J, Tranulis MA, Bratberg B: **Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type Nor98**. *The Veterinary Record* 2003, **153**:202-208.
17. Gavier-Widen D, Nöremark M, Benestad S, Simmons M, Renstrom L, Bratberg B, Elvander M, af Segerstad CH: **Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population**. *J Vet Diagn Invest* 2004, **16**(6):562-567.
18. Buschmann A, Biacabe A-G, Ziegler U, Bencsik A, Madec J-Y, Erhardt G, Lühken G, Baron T, Groschup MH: **Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests**. *Journal of Virological Methods* 2004, **117**(1):27-36.
19. De Bosschere H, Roels S, Benestad SL, Vanopdenbosch E: **Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance**. *Vet Rec* 2004, **155**(22):707-708.
20. Onnasch H, Gunn HM, Bradshaw BJ, Benestad SL, Bassett HF: **Two Irish cases of scrapie resembling Nor98**. *The Veterinary Record* 2004, **155**:636-637.
21. Everest SJ, Thorne L, Barnicle DA, Edwards JC, Elliott H, Jackman R, Hope J: **Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie-surveillance programme**. *J Gen Virol* 2006, **87**(Pt 2):471-477.
22. Orge L, Galo A, Machado C, Lima C, Ochoa C, Silva J, Ramos M, Simas JP: **Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal**. *The Journal of General Virology* 2004, **85**(Pt 11):3487-3491.
23. Geijo MV., Garrido JM., Benedicto L., Garcia-Crespo D., Hurtado A., RA. J: **First report of atypical scrapie in Spain**. In: *Control strategies for small ruminant TSE meeting: 30/9-1/10 2005 2005; Bergen, Norway*; 2005.
24. Moum T, Olsaker I, Hopp P, Moldal T, Valheim M, Benestad SL: **Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases**. *J Gen Virol* 2005, **86**(Pt 1):231-235.
25. Saunders GC, Cawthraw S, Mountjoy SJ, Hope J, Windl O: **PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain**. *J Gen Virol* 2006, **87**(Pt 11):3141-3149.
26. Luhken G, Buschmann A, Brandt H, Eiden M, Groschup MH, Erhardt G: **Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases**. *Veterinary Research* 2007, **38**(1):65-80.
27. Moreno CR, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Cazeau G, Andreoletti O, Chadi S, Elsen JM, Calavas D: **Which PrP haplotypes in a French sheep population are the most susceptible to atypical scrapie?** *Archives of Virology* 2007, **152**(6):1229-1232.

28. European Food Safety Autority (EFSA): **Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in Small Ruminants**. *The EFSA Journal* 2005, **276**:1-30.
29. European Food Safety Autority (EFSA): **Scientific Report of the European Food Safety Authority on the Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants**. *The EFSA Journal* 2005, **31**:1-17.
30. European Food Safety Autority (EFSA): **Scientific Report of the European Food Safety Authority on the Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants (2)**. *The EFSA Journal* 2005, **49**:1-46.
31. Green DM, Del Rio Vilas VJ, Birch CP, Johnson J, Kiss IZ, McCarthy ND, Kao RR: **Demographic risk factors for classical and atypical scrapie in Great Britain**. *J Gen Virol* 2007, **88**(Pt 12):3486-3492.
32. Konold T, Davis A, Bone G, Bracegirdle J, Everitt S, Chaplin M, Saunders GC, Cawthraw S, Simmons MM: **Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report**. *BMC Vet Res* 2007, **3**(1):2.
33. Le Dur A, Beringue V, Andreoletti O, Reine F, Lai TL, Baron T, Bratberg B, Vilotte J-L, Sarradin P, Benestad SL *et al*: **A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes**. *PNAS* 2005, **102**(44):16031-16036.
34. Simmons MM, Konold T, Simmons HA, Spencer YI, Lockey R, Spiropoulos J, Everitt S, Clifford D: **Experimental transmission of atypical scrapie to sheep**. *BMC Vet Res* 2007, **3**(1):20.
35. Nöremark M, Hopp P: **Reported occurence of Atypical Scrapie in Europe**. In: *11th Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics: 2006; Cairns*; 2006: 1-3.
36. Simmons MM, Ryder SJ, Chaplin MC, Spencer YI, Webb CR, Hoinville LJ, Ryan J, Stack MJ, Wells GHA, Wilesmith JW: **Scrapie surveillance in Great Britain: results of an abattoir survey, 1997/1998**. *The Veterinary Record* 2000, **146**:391-395.
37. Del Rio Vilas VJ, Ryan J, Elliott HG, Tongue SC, Wilesmith JW: **Prevalence of scrapie in sheep: results from fallen stock surveys in Great Britain in 2002 and 2003**. *The Veterinary Record* 2005, **157**(23):744-745.
38. Humphry RW, Clark AM, Begara-McGorum I, Gunn GJ: **Estimation of scrapie prevalence in cull and found-dead sheep on the Shetland Islands**. *The Veterinary Record* 2004, **154**(10):303-304.
39. Morignat E, Cazeau G, Biacabe AG, Vinard JL, Bencsik A, Madec JY, Ducrot C, Baron T, Calavas D: **Estimates of the prevalence of transmissible spongiform encephalopathies in sheep and goats in France in 2002**. *The Veterinary Record* 2006, **158**(20):683-687.
40. Bird S-M: **European Union's rapid TSE testing in adult cattle and sheep: implementation and results in 2001 and 2002**. *Statistical Methods in Medical Research* 2003, **12**(3):261-278.
41. Del Rio Vilas VJ, Guitian J, Pfeiffer DU, Wilesmith JW: **Analysis of data from the passive surveillance of scrapie in Great Britain between 1993 and 2002**. *The Veterinary Record* 2006, **159**(24):799-804.
42. Gravenor MB, Papasozomenos P, McLean AR, Neophytou G: **A scrapie epidemic in Cyprus**. *Epidemiol Infect* 2004, **132**(4):751-760.
43. Tongue S, Wilesmith J, Nash RJ, Kossaibati MA, Ryan J: **The importance of the prp genotype in active surveillance for ovine scrapie**. *Epidemiol Infect* 2007(In press).
44. Gubbins S, Simmons MM, Sivam K, Webb CR, Hoinville LJ: **Prevalence of scrapie infection in Great Britain: interpreting the results of the 1997-1998 abattoir survey**. *Proc Biol Sci* 2003, **270**(1527):1919-1924.

45. Reckzeh C, Hoffmann C, Buschmann A, Buda S, Budras KD, Reckling KF, Bellmann S, Knobloch H, Erhardt G, Fries R *et al*: **Rapid testing leads to the underestimation of the scrapie prevalence in an affected sheep and goat flock**. *Vet Microbiol* 2007.
46. Gomez N, Garrido JM., Benedicto L., García-Crespo D., Nagore D., Geijo M., Hurtado A., Korkostegi JL., RA. J: **Comparison of diagnostic tests in an outbreak of scrapie in Latxa sheep.** *Small Ruminant Research* 2007, **72**:141-148.
47. Konold T, Davis A, Bone GE, Simmons MM, Kahn J, Blake-Dyke MC, Bracegirdle J, Shimwell CJ: **Atypical scrapie cases in the UK**. *The Veterinary Record* 2006, **158**(8):280.
48. European Commission: **Commission Regulation (EC) No 36/2005 of 12 January 2005 amending Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards specified risk material and epidemio-surveillance for transmissible spongiform encephalopathies and amending Regulation (EC) No 1326/2001 as regards animal feeding and the placing on the market of ovine and caprine animals and products thereof**. *Off J Eur Communities* 2005, **10**:9.
49. Del Rio Vilas VJ, Hopp P, Nunes T, Ru G, Sivam K, Ortiz-Pelaez A: **Explaining the heterogeneous scrapie surveillance figures across Europe: a meta-regression approach**. *BMC Vet Res* 2007, **3**(1):13.
50. Kao RR, Gravenor MB, McLean AR: **Modelling the national scrapie eradication programme in the UK**. *Mathematical Biosciences* 2001, **174**(2):61-76.
51. Gubbins S, Webb CR: **Simulation of the options for a national control programme to eradicate scrapie from Great Britain**. *Prev Vet Med* 2005, **69**(3-4):175-187.
52. Woolhouse MEJ, Stringer SM, Matthews L, Hunter N, Anderson RM: **Epidemiology and control of scrapie within a sheep flock**. *Proceedings of the Royal Society of London - B* 1998, **265**:1205-1210.
53. Agresti A: **Categorical Data Analysis**, 2nd Ed. edn: Wiley-Interscience; 2002.
54. Baylis M, Goldmann W: **The genetics of scrapie in sheep and goats**. *Current Molecular Medicine (Hilversum)* 2004, **4**(4):385-396.
55. Tongue SC, Pfeiffer DU, Warner R, Elliott H, Del Rio Vilas V: **Estimation of the relative risk of developing clinical scrapie: the role of prion protein (PrP) genotype and selection bias**. *Vet Rec* 2006, **158**(2):43-50.
56. Tongue SC, Webb P, Simmons MM, Gubbins S: **Prevalence of scrapie infection in cull animals from 14 scrapie-affected flocks in Great Britain**. *Vet Rec* 2005, **157**(16):480-482.
57. Corbiere F, Barillet F, Andreoletti O, Fidelle F, Laphitz-Bordet N, Schelcher F, Joly P: **Advanced survival models for risk-factor analysis in scrapie**. *J Gen Virol* 2007, **88**(Pt 2):696-705.
58. Bossers A, Harders FL, Smits MA: **PrP genotype frequencies of the most dominant sheep breed in a country free from scrapie**. *Archives of Virology* 1999, **Archives of Virology**(4):829-834.
59. Roels S, Renard C, De Bosschere H, Geeroms R, Van Poucke M, Peelman L, Vanopdenbosch E: **Detection of polymorphisms in the prion protein gene in the Belgian sheep population: some preliminary data**. *Vet Q* 2004, **26**(1):3-11.
60. Hurtado A, Garcia-Pérez AL, Beltran de Heredia I, Barandika J, Sanz-Parra A, Berriatua E, Juste RA: **Genetic susceptibility to scrapie in a population of Latxa breed sheep in the Basque Country, Spain**. *Small Ruminant Research* 2002, **45**:255-259.
61. Eglin RD, Warner R, Gubbins S, Sivam SK, Dawson M: **Frequencies of PrP genotypes in 38 breeds of sheep sampled in the National Scrapie Plan for Great Britain**. *Vet Rec* 2005, **156**(14):433-437.

62. Thorgeirsdottir S, Sigurdarson S, Thorisson HM, Georgsson G, Palsdottir A: **PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep**. *J Gen Virol* 1999, **80 (Pt 9)**:2527-2534.
63. Vaccari G, Petraroli R, Agrimi U, Eleni C, Perfetti MG, Di Bari MA, Morelli L, Ligios C, Busani L, Nonno R *et al*: **PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. Brief report**. *Archives of Virology* 2001, **146**(10):2029-2037.
64. Acutis PL, Sbaiz L, Verburg F, Riina MV, Ru G, Moda G, Caramelli M, Bossers A: **Low frequency of the scrapie resistance-associated allele and presence of lysine-171 allele of the prion protein gene in Italian Biellese ovine breed**. *J Gen Virol* 2004, **85**(Pt 10):3165-3172.
65. Detwiler LA, Baylis M: **The epidemiology of scrapie**. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 2003, **22**(1):121-143.
66. Wineland NE, Detwiler LA, Salman MD: **Epidemiologic analysis of reported scrapie in sheep in the United States: 1,117 cases (1947-1992)**. *JAVMA Journal American Medical Association* 1998, **212**(5):713-718.
67. Scientific Steering Committee: **Opinion on requirements for statistically authorative BSE/TSE surveys**. In. Edited by Commission E: Europen Commission; 2001: 39.
68. R Development Core Team: **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** *R Found Stat Comput* 2008.
69. Cocquyt G, Driessen B, Simoens P: **Variability in the eruption of the permanent incisor teeth in sheep**. *Vet Rec* 2005, **157**(20):619-623.

Figures

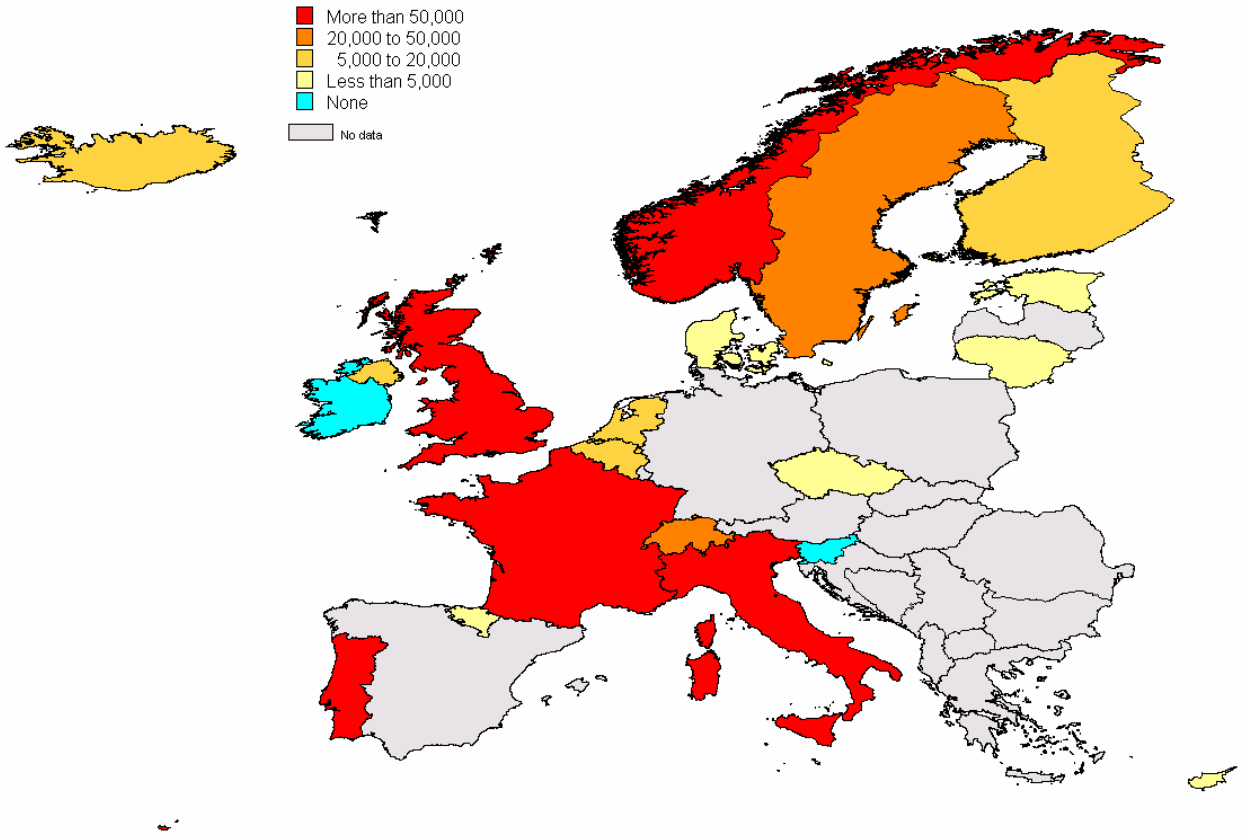


Figure 35: Quantity of samples examined by tests A, F and G

In red, five countries processed more than 50,000 tests. In orange, one country processed between 20,000 to 50,000 tests. In yellow, four countries processed 5,000 to 20,000 tests. In pale yellow, five countries, performed less than 5,000 tests. In blue, four countries did not perform any of these tests. In grey, 11 countries did not answer the questionnaire (including Malta).

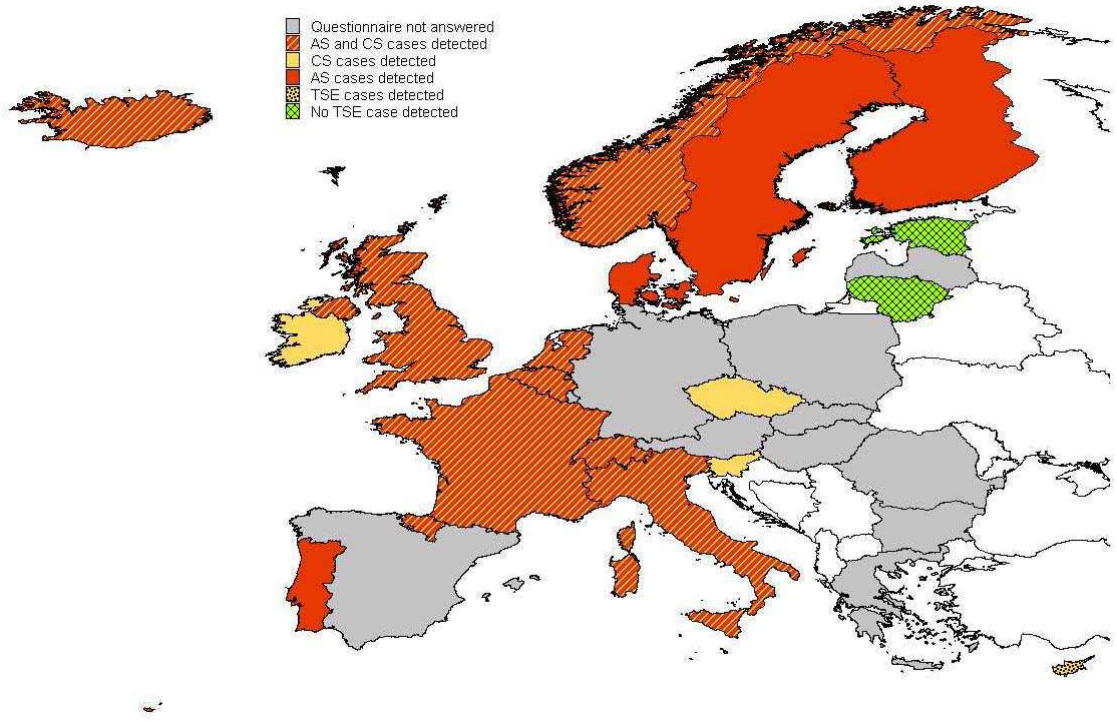


Figure 36: Cases detected in sheep in active surveillance.

In red, four countries detected AS only. In strip red and yellow, ten countries detected AS and CS. In yellow, three countries detected CS only. In yellow with black spots, one country detected TSE unclassified case. In green, two countries didn't detect any case. In grey, 11 countries did not answer the questionnaire (including Malta). The period covered ranges from 2002 to 2006. AS cases may have been detected by other means than through active surveillance.

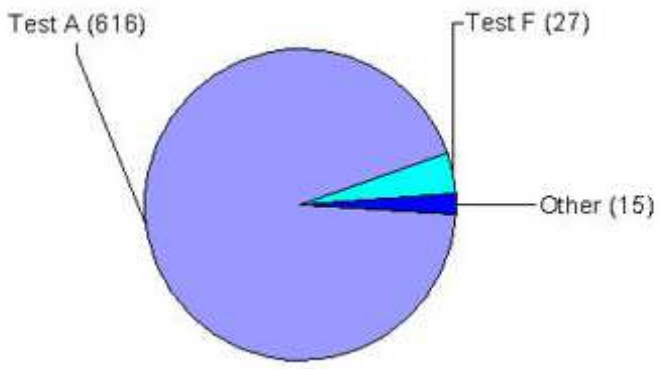


Figure 37: Reported AS cases by test.

Percentage (number in brackets) of AS cases detected in sheep through active surveillance in 20 EU countries between 2002 and 2006 per test or combination of tests.

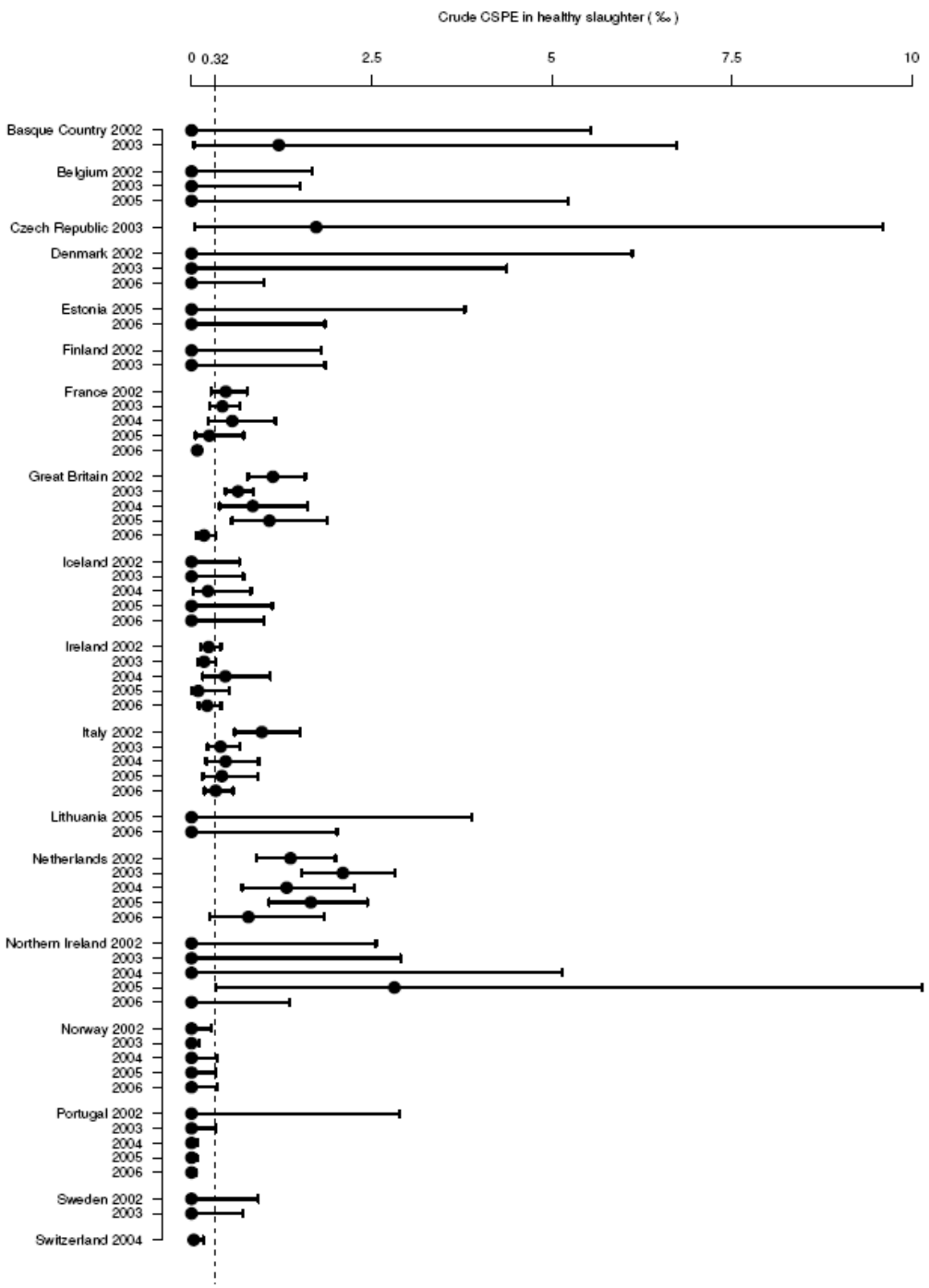


Figure 38: Sheep CSPE (‰) in healthy slaughter surveillance

Crude prevalence estimates are represented with their 95% confidence intervals. The dashed line represents the mean CSPE in healthy slaughter for all the countries and all the years. Graph is restricted to country-years with more than 500 tests because confidence intervals were too large to fit on the graph with an appropriate scale. For 2006, some countries could not provide data for the full year. In Switzerland, surveillance was conducted from July 2004 to June 2005 and was referred to as a single year (2004).

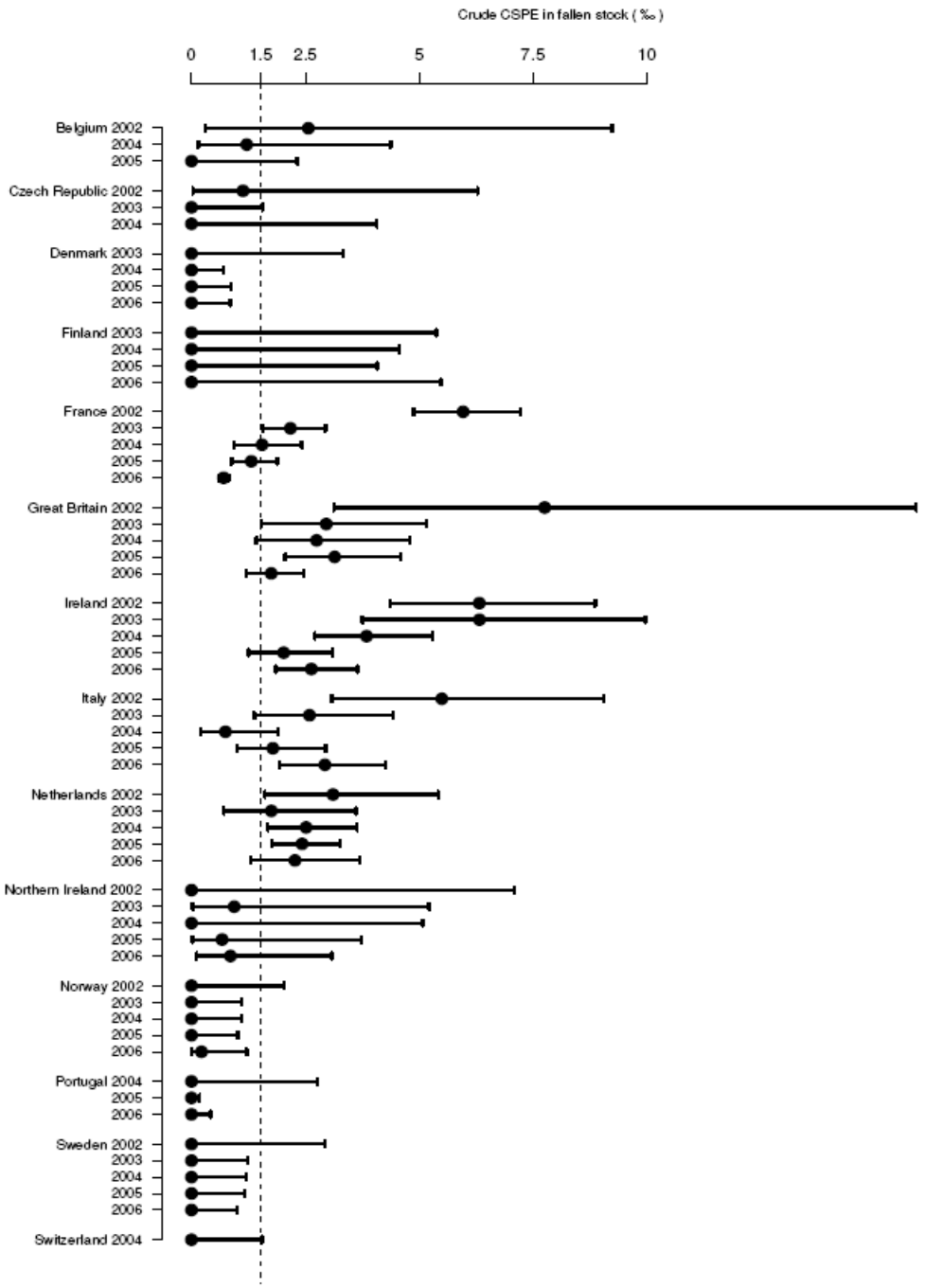


Figure 39: Sheep CSPE (‰) in fallen stock surveillance

Crude prevalence estimates are represented with their 95% confidence intervals. The dashed line represents the mean CSPE in fallen stock for all the countries and all the years. Graph is restricted to country-years with more than 500 tests because confidence intervals were too large to fit on the graph with an appropriate scale and not showing Slovenia due to higher prevalence. For 2006, some countries could not provide data for the full year. In Switzerland, surveillance was conducted from July 2004 to June 2005 and was referred to as a single year (2004).

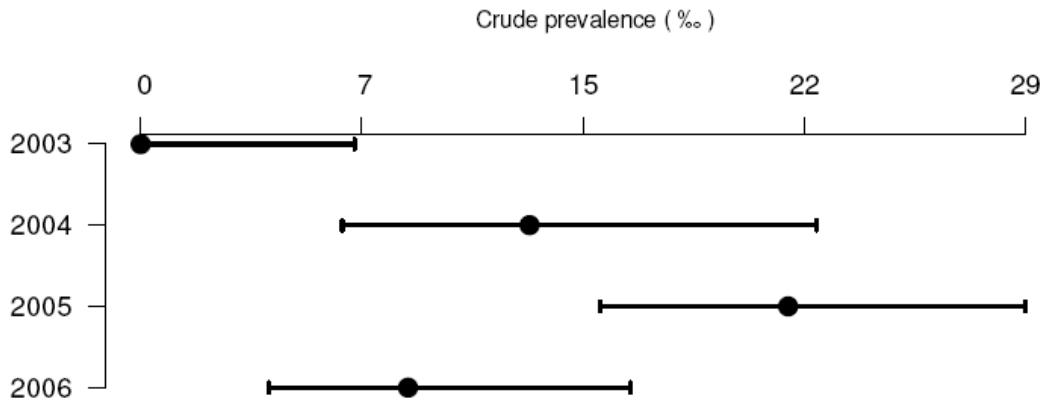


Figure 40: Sheep CSPE (‰) in fallen stock surveillance in Slovenia

Crude prevalence estimates are presented with their 95% confidence intervals.

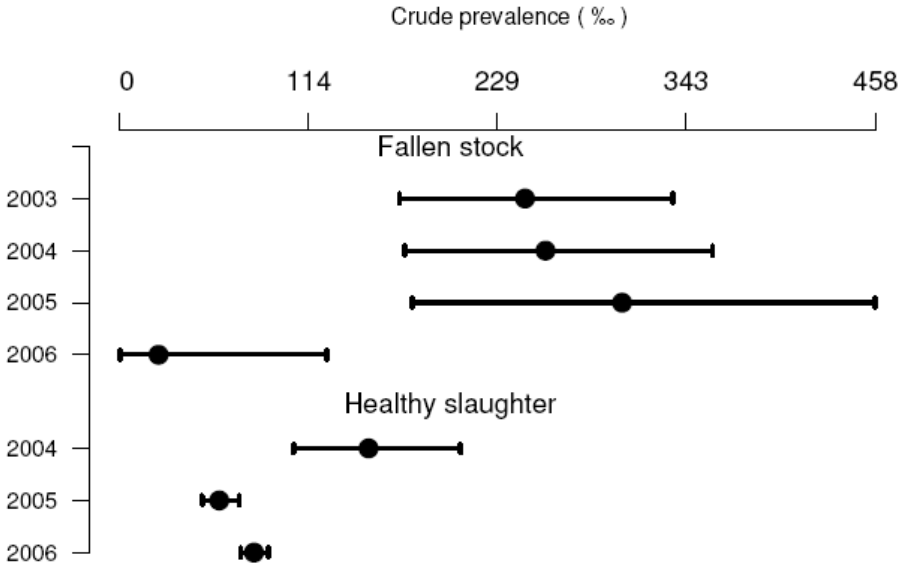


Figure 41: Sheep TSEs prevalence (‰) in active surveillance in Cyprus

Crude prevalence estimates are presented with their 95% confidence intervals.

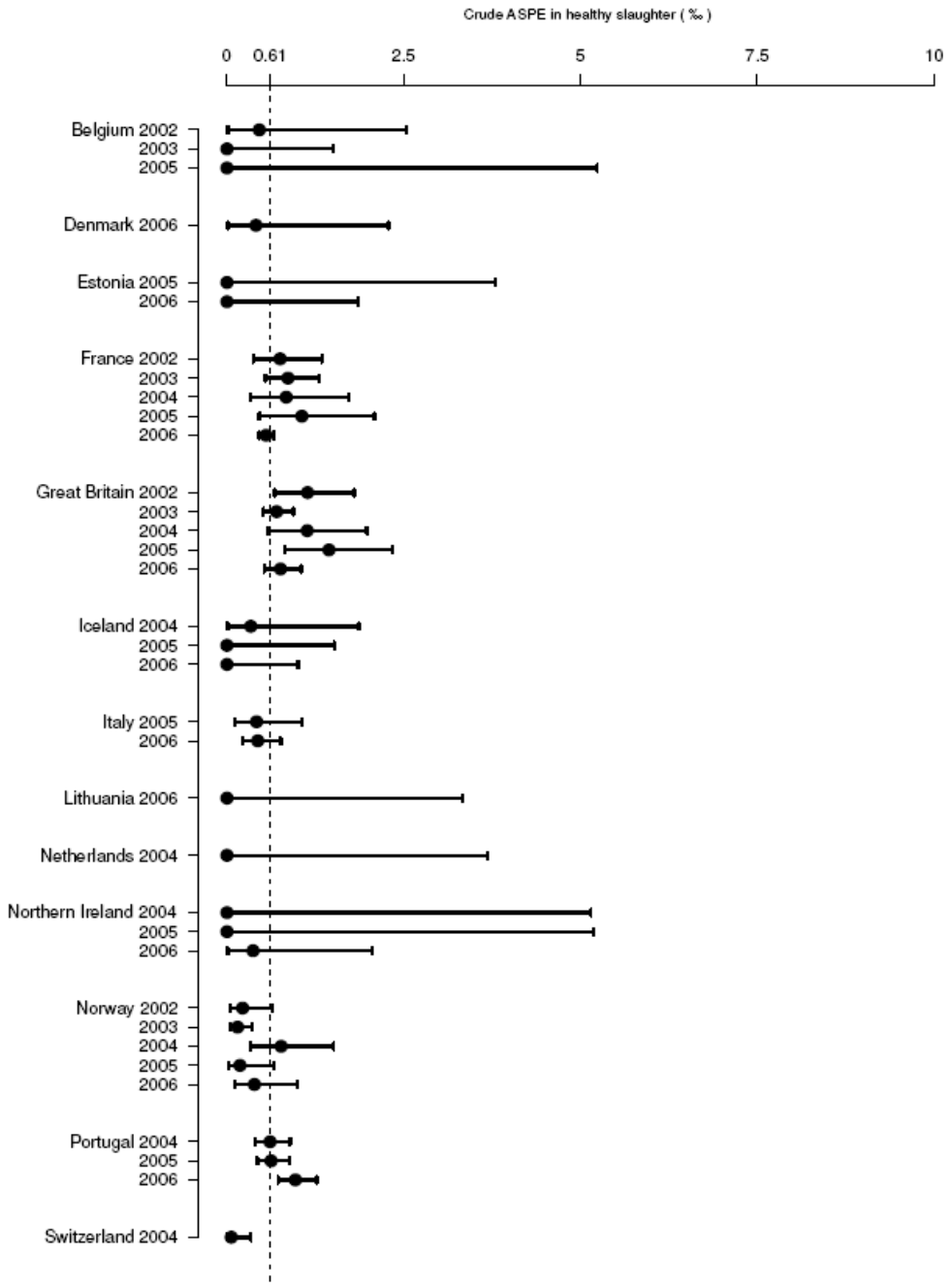


Figure 42: Sheep ASPE (‰) in healthy slaughter surveillance

Crude prevalence estimates are represented with their 95% confidence intervals. The dashed line represents the mean ASPE in healthy slaughter for all the countries and all the years included in ASPE calculation. Graph is restricted to country-years with more than 500 tests A or G because confidence intervals were too large to fit on the graph with an appropriate scale. For 2006, some countries could not provide data for the full year. In Switzerland, surveillance was conducted from July 2004 to June 2005 and was referred to as a single year (2004).

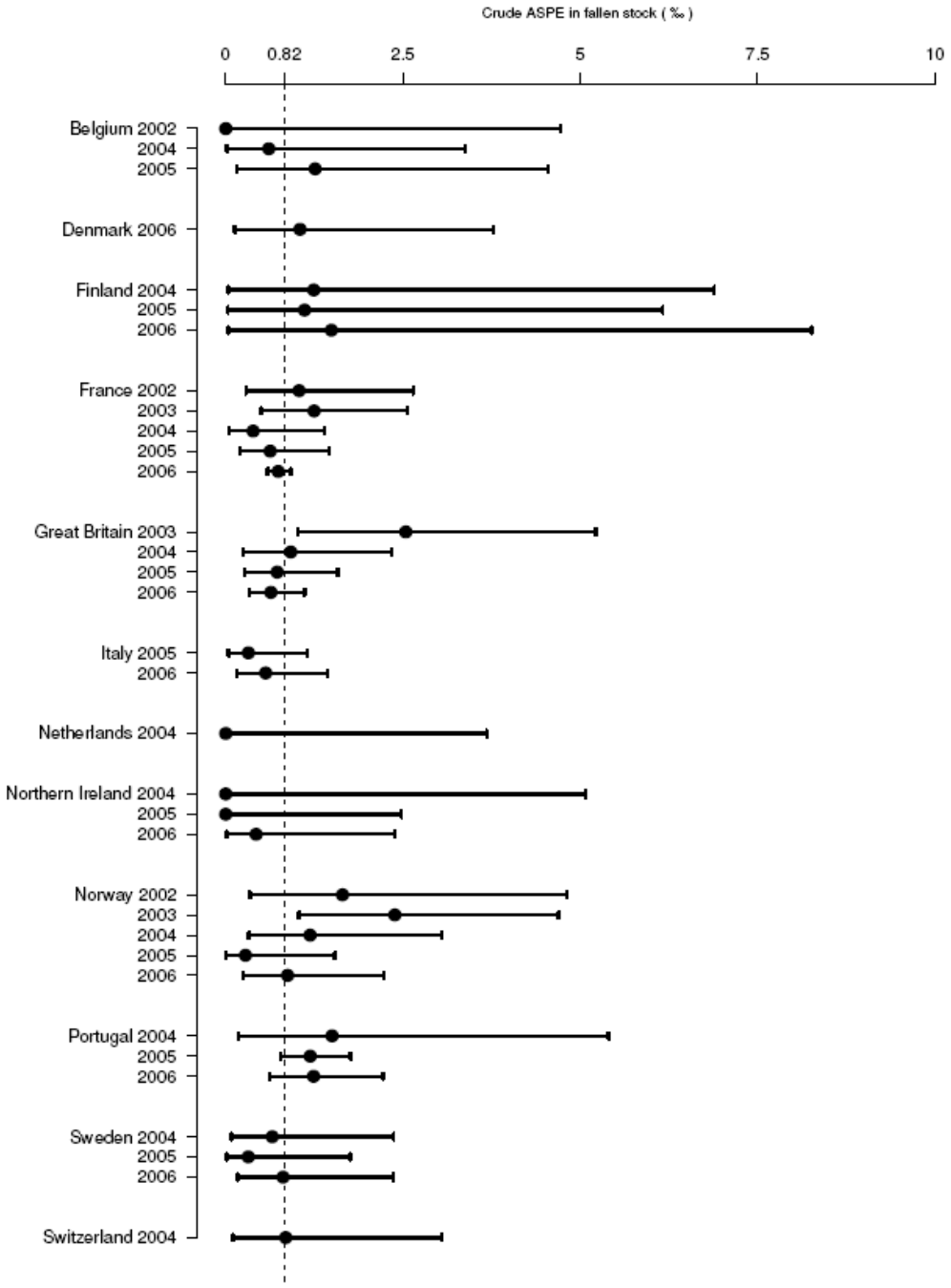


Figure 43: Sheep ASPE (‰),in fallen stock surveillance

Crude prevalence estimates are represented with their 95% confidence intervals. The dashed line represents the mean ASPE in fallen stock for all the countries and all the years included in ASPE calculation. Graph is restricted to country-years with more than 500 tests A or G because confidence intervals were too large to fit on the graph with an appropriate scale.) For 2006, some countries could not provide data for the full year. In Switzerland, surveillance was conducted from July 2004 to June 2005 and was referred to as a single year (2004).

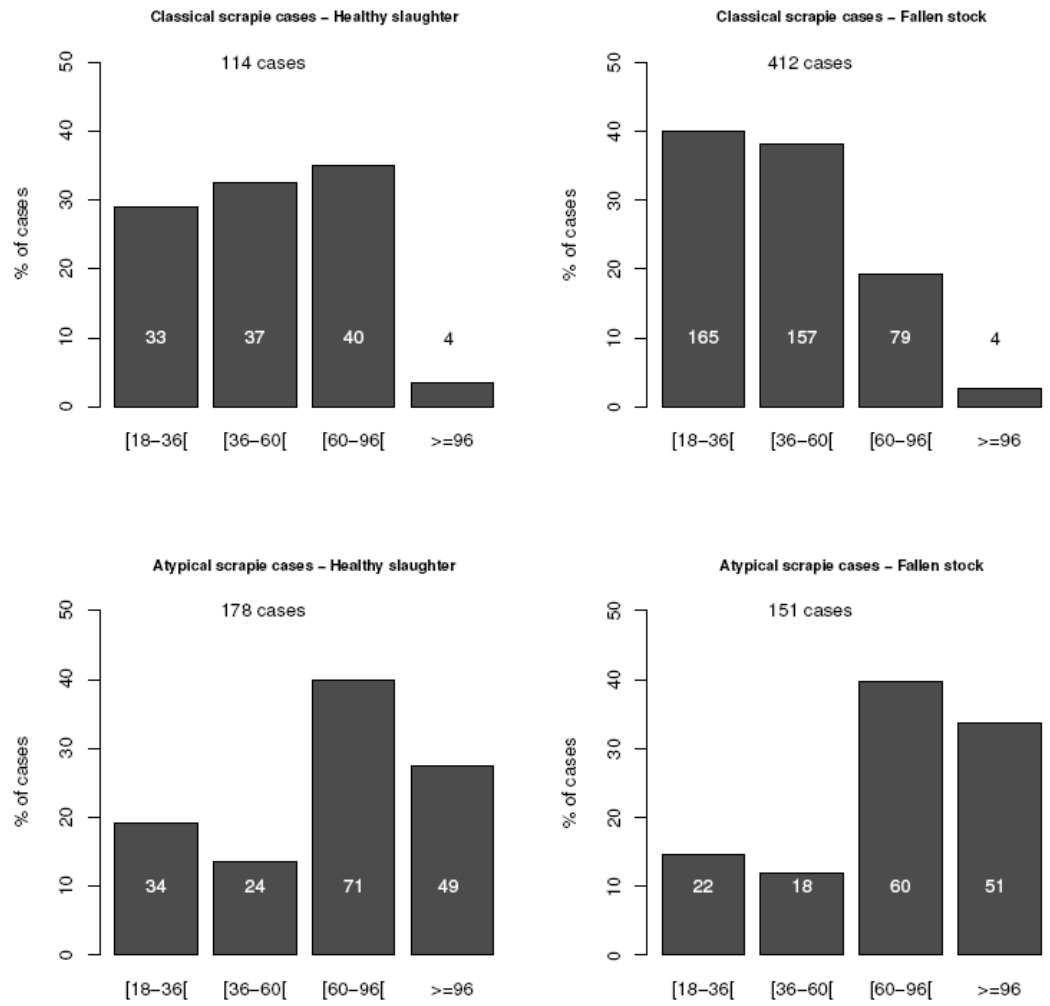


Figure 44: Age distribution of AS and CS cases according to stream of surveillance (in %)

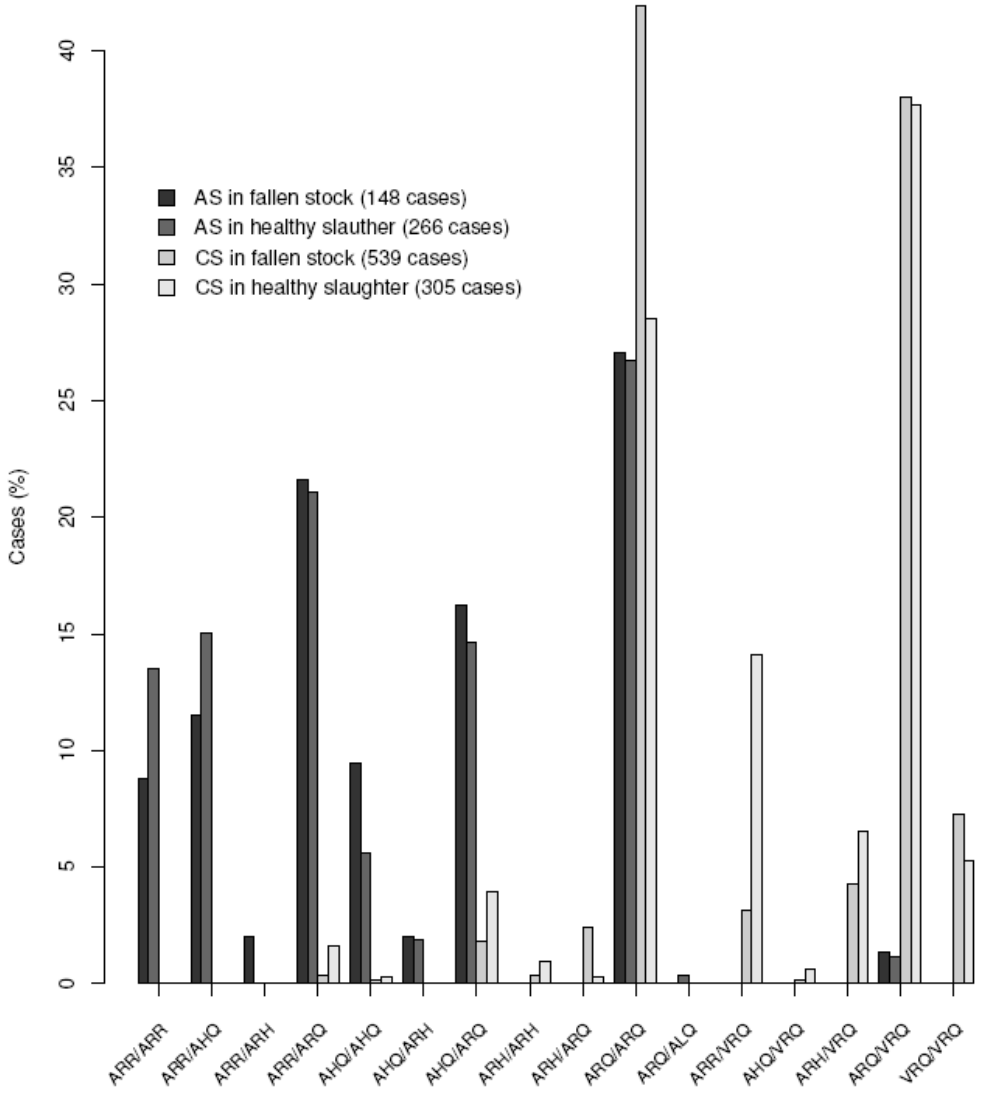


Figure 45: Genotype distribution of AS and CS cases

Figure for 414 AS cases and 844 CS cases detected through active surveillance in fallen stock or healthy slaughter

Tables

Tableau 13 : Tests used in sheep TSE active surveillance between 2001 and 2006. Tests associated with the detection of AS case(s) are in bold, tests recommended by EFSA are underlined.

Test code	Test or combination of tests reported	Share of total reported tests (%)	Countries in which the specified diagnostic test was used	
			Countries	Number of countries
A	**Bio-Rad Platelia test and Bio-Rad TeSeE**	50	BC, BE, CY, EE, FI, FR, GB, IS, IT, LT, NI, NL, NO, PT, SE	15
B	Prionics Check Western test	23	CZ, DK, FI, FR, GB, IT, NL, SL	8
C	Enfer-test	9	BC, DK, FR, IE, IT, LT, NI	7
D	Prionics-Check LIA test	5	BC, CY, CZ, FR, IT	5
E	Enfer TSE Kit version 2.0	5	CZ, FR, IE, LT, SL	5
F	**IDEXX HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit, EIA**	3	DK, FR	2
G	**Bio-Rad TeSeE Sheep/Goat test**	2	CH, IS, NO	3
H	**Prionics-Check Western Small Ruminant test**	1	CH, CZ, NL	3
I	Other (Histopathology and/or Immunohistochemistry; **Prionics-Check Western Blot modified**; Prionics Check Western test & Prionics-Check LIA test in parallel; **Prionics-Check Western Small Ruminant and Bio-Rad TeSeE Sheep/ Goat test in line; Enfer test and Bio-Rad TeSeE in parallel**; Prionics Check PrioSTRIP; Prionics-Check Lia Small Ruminant)	10	CH, CY, CZ, FR, IS, IE, LT, NI, NL, NO	12

Tableau 14 : Variability of AS and CS detection with surveillance stream (reference is healthy slaughter) and year of surveillance.

Type of TSE	Country	Factor	p	OR	$CI_{95\%}$
Atypical	Finland (Fisher test)	Surveillance stream	0.0321		
	Norway	Surveillance stream	$< 1.10^{-5}$	4.27	[2.33, 7.83]
	Portugal	Surveillance stream	0.0088	1.64	[1.13, 2.37]
	Switzerland	Surveillance stream	0.0142	9.38	[1.57, 56.15]
Classical	France	Surveillance stream	$< 1.10^{-5}$	8.01	[6.15, 10.44]
		Year of surveillance (linear)	$< 1.10^{-5}$	0.61	[0.58, 0.64]
	Great Britain	Surveillance stream	$< 1.10^{-5}$	5.04	[3.61, 7.03]
		Year of surveillance (2003 vs 2002)	0.0022	0.53	[0.36, 0.80]
		Year of surveillance (2004 vs 2002)	0.0325	0.54	[0.31, 0.95]
		Year of surveillance (2005 vs 2002)	0.0488	0.61	[0.37, 1.00]
		Year of surveillance (2006 vs 2002)	$< 1.10^{-5}$	0.25	[0.15, 0.39]
	Iceland	Surveillance stream	$< 1.10^{-5}$	304.40	[50.44, 1 836.84]
	Ireland	Surveillance stream	$< 1.10^{-5}$	29.19	[17.05, 49.97]
		Year of surveillance (linear)	0.8895	0.99	[0.80, 1.21]
		Interaction between surveillance stream and year of surveillance (linear)	0.0337	0.78	[0.61, 0.98]
	Italy	Surveillance stream	$< 1.10^{-5}$	5.68	[4.00, 8.05]
		Year of surveillance (2003 vs 2002)	0.0013	0.44	[0.26, 0.72]
		Year of surveillance (2004 vs 2002)	0.0001	0.26	[0.13, 0.50]
		Year of surveillance (2005 vs 2002)	0.0002	0.35	[0.20, 0.61]
		Year of surveillance (2006 vs 2002)	0.0006	0.45	[0.29, 0.71]
	Slovenia (Fisher test)	Surveillance stream	0.0037		
	The Netherlands	Surveillance stream	0.0017	1.53	[1.17, 1.99]
TSE positive	Cyprus	Surveillance stream	0.2022	0.27	[0.04, 2.00]
		Year of surveillance (2004 vs 2003)	0.0719	0.15	[0.02, 1.18]
		Year of surveillance (2005 vs 2003)	0.0052	0.05	[0.01, 0.42]
		Year of surveillance (2006 vs 2003)	0.0123	0.07	[0.01, 0.57]
		Interaction between surveillance stream and year of surveillance (2004 vs 2003)	0.0635	7.13	[0.90, 56.75]
		Interaction between surveillance stream and year of surveillance (2005 vs 2003)	0.0027	24.70	[3.05, 200.18]

Non-statistically significant results were not displayed.

Tableau 15 : Comparison of detection of AS and CS in active surveillance in fallen stock and in healthy slaughter. OR is defined as chances to detect AS versus chances to detect CS.

Country	Surveillance stream	Chi-square	df	p-value	OR	$CI_{95\%}$
France	Healthy slaughter	68.63	1	$< 1.10^{-5}$	3.96	[2.80,5.62]
	Fallen stock	7.83	1	0.005	0.69	[0.54,0.89]
Great Britain	Healthy slaughter	9.30	1	0.002	1.55	[1.17,2.05]
	Fallen stock	22.03	1	$< 1.10^{-5}$	0.37	[0.24,0.57]
Italy	Fallen stock	21.60	1	$< 1.10^{-5}$	0.16	[0.07,0.38]
Norway	Healthy slaughter	19.17	1	1.10^{-5}	45.00	[2.73,741.78,]
	Fallen stock	14.71	1	0.0001	13.66	[2.60,71.71]
Portugal	Healthy slaughter	107.38	1	$< 1.10^{-5}$	367.66	[10.22,13 231.94]
	Fallen stock	35.44	1	$< 1.10^{-5}$	127.67	[3.51,4 637.69]
Sweden	Fallen stock	5.56	1	0.02	21.00	[0.88,500.93]

Non-statistically significant results were not displayed.

Tableau 16 : Probability to detect zero case of AS depending on the sensitivity of the test (in column) and the number of tests (in row) for Estonia and Lithuania

	0.5	0.7	0.8	0.9	1
1933 (Estonia)	0.53	0.41	0.36	0.32	0.30
4092 (Lithuania)	0.26	0.15	0.12	0.09	0.07

Tableau 17 : Number and frequency (%) of allele carriers among 1258 AS and CS cases detected between 2002 and 2006 in healthy slaughter and fallen stock in 18 EU countries.

Allele	Healthy slaughter		Fallen stock	
	AS	CS	AS	CS
ARR	132 (32.3)	48 (9.5)	65 (28.4)	19 (2.3)
ARQ	170 (41.6)	220 (43.7)	98 (42.8)	456 (56.3)
VRQ	3 (0.7)	196 (39.0)	2 (0.9)	285 (35.2)
ARH	5 (1.2)	24 (4.8)	6 (2.6)	38 (4.7)
AHQ	99 (24.2)	15 (3.0)	58 (25.3)	12 (1.5)

Tableau 18 : List of acknowledge people and affiliated institutions

Basque Country (Spain)

Department of Animal Production and Health, Basque Institute for Agricultural Research and Development (NEIKER)

Joseba M. Garrido, Marivi Geijo, Nieves Gomez, Leyre Benedicto, David Garcia-Crespo, Ana Hurtado, Ramon A. Juste

Belgium

Veterinary and Agrochemical Research Centre (CODA/CERVA)

Stefan Roels

Cyprus

Veterinary Services

Giorgos Neophytou, Penelope Stylianou, Polyvios Neocleous, Soteria Georgiadou

Czech Republic

NRL for Diagnosis of BSE and Animal TSEs, State Veterinary Institute Jihlava

Pavel Bartak, Pavel Vodrazka, Zbynek Semerad - State veterinary administration

Denmark

Danish Veterinary and Food Administration

Søren Bach Rasmussen, Thomas Lysgaard, Peter Lind, National Veterinary Institute, Tecnical University of Denmark

Estonia

Veterinary and Food Board

Ago Pärtel, Maarja Kristian

Finland

Finnish Food Safety Authority Evira

Maria Hautaniemi

France

AFSSA Lyon

Didier Calavas, Eric Morignat, Geraldine Cazeau, Alexandre Fediaevsky

Great Britain (UK)

Veterinary Laboratories Agency

Jo Nash, Judi Ryan, Julia Colvin, Mohamad Kossaibati, Danny Matthews, Sue Tongue

Iceland

Institute for Experimental Pathology

Stefania Thorgeirsdottir, Sigurdur Sigurdarson

Ireland

Department of Agriculture and Food

John Mullen

Italy

National Reference Centre for Trasmissible Spongiform Encephalopaty (CEA) - Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

Giuseppe Ru, Maria Cristina Bona, Pierluigi Acutis

Lithuania

National Veterinary Laboratory

Gediminas Pridotkas

Northern Ireland (UK)

Department of Agriculture and Rural Development

Valerie Allen

Norway

National Veterinary Institute

Petter Hopp

Portugal

Direcção Geral de Veterinária

Agrela Pinheiro, Maria José Marques Pinto, Vanessa Luz

Slovenia

Ministry of agriculture, food and forestry – Veterinary administration of republic of Slovenia (VARS);
University of Ljubljana, Veterinary Faculty, National Veterinary Institute

Vida Cadonic Špelic, Ivan Ambrožic, Polona Juntes

Sweden

SVA, National Veterinary Institute

Maria Nöremark

Switzerland

Federal Veterinary Office

Dagmar Heim, Heinzpeter Schwermer

The Netherlands

Central Institute for Animal Disease Control

Fred van Zijderveld

Additional file

Tableau 19 : Reference year

Description: Indicate the year each country was considered able to detect atypical scrapie in healthy slaughter and in fallen stock. This may not reflect the exact time from when a country had the capacity to detect AS case.

Country	Fallen stock	Healthy slaugther
Basque Country (Spain)	2004	2004
Belgium	2002	2002
Cyprus	NO	NO
Czech Republic	NO	NO
Denmark	2006	2006
Estonia	2002	2002
Finland	2004	2004
France	2002	2002
Great Britain	2002	2002
Iceland	2005	2004
Ireland	NO	NO
Italy	2005	2005
Lithuania	2004	2004
Netherlands	2004	2004
Northern Ireland	2004	2004
Norway	2002	2002
Portugal	2004	2004
Slovenia	NO	NO
Sweden	2004	2004
Switzerland	2004	2004

Chapitre 3 : Etudes des facteurs de risque de la tremblante atypique

3.1. Présentation des études

Le chapitre précédant a montré que la prévalence de la tremblante atypique était de l'ordre de 6 cas pour 10 000 animaux testés et différait peu en fonction du temps, du canal de surveillance et du pays d'origine ; à la différence de la prévalence de la tremblante classique. Les programmes de surveillance sont imparfaits, notamment en raison des différences de sensibilité des tests et des biais de sélection possibles. Cependant, les contrastes observés entre les deux formes de tremblante sont peu susceptibles d'être expliqués entièrement par l'existence de ces biais. Ils reflètent plus probablement des différences épidémiologiques entre les deux maladies, ce qui est conforté par les différences de schéma pathologiques. Les facteurs de risque de la tremblante classique sont connus et ont été évoqués dans le chapitre 1 alors que les facteurs de risque de la tremblante atypique ont été encore très peu étudiés (aucune étude n'avait été publiée à ce sujet lorsque les travaux de thèse ont commencé).

L'objectif de cette partie est d'explorer les facteurs de risque de la tremblante atypique, associés d'une part, aux pratiques d'élevages et, d'autre part, au polymorphisme du gène PRNP. Compte tenu de la rareté de la maladie, la méthode la plus efficiente pour la recherche de facteurs de risque est l'enquête cas-témoins. Ce type d'étude peut être réalisé de différentes façons et porter sur différents types de facteurs de risque : liés aux pratiques d'élevage, à la génétique ou encore à la localisation des cas. Dans tous les cas de figure, il semble important de tenir compte de l'âge élevé des cas soit par ajustement soit par appariement, afin d'éviter de comparer une population de cas âgés à une population de témoins nettement plus jeunes.

L'article 2 a été publié dans la revue *Emerging Infectious Disease* en tant que *Research paper* (Fediaevsky, Morignat et al., 2009). Elle a fait l'objet d'une communication orale au congrès Neuroprion 2008 à Madrid (Fediaevsky, Morignat et al., 2008) et a été retenu pour une communication orale au congrès de l'ISVEE XII en août 2009 à Durban. Nous avons mis en place une étude cas-témoins avec appariement pour étudier les facteurs de risque de la tremblante atypique en France en élevage ovin. Les hypothèses testées portaient sur les contacts avec des animaux en provenance d'autres élevages, les pratiques autour de l'agnelage, l'alimentation des animaux et l'exposition à des produits toxiques (pesticides, insecticides, antiparasitaires). Des données sur le génotype des animaux ont été également collectées et ont été analysées sous forme d'analyse de sensibilité. Nous avons inclu 95 cas et 225 témoins. Les élevages laitiers étaient plus à risque (Odds ratio (OR) = 15,1 [3,3;69,7] alors que l'agriculture biologique (OR=0,15 [0,02 ;1,26], l'ensilage de maïs (OR=0,16 [0,05 ;0,53] et les suppléments minéraux et vitaminiques (OR=0,6 [0,32 ;1,14]) étaient des facteurs protecteurs. L'effet de la génétique était prépondérant par rapport aux autres facteurs. Cette étude n'a pas mis en évidence de facteurs de risque associés à une hypothèse d'origine infectieuse mais elle suggère que la maladie pourrait être spontanée avec un fort déterminisme génétique et potentiellement influencée par des facteurs métaboliques.

Le niveau de risque génétique a été estimé à partir d'échantillons de cas et de témoins génotypés dans le cadre de la surveillance active et correspond à une partie du travail présenté dans l'article 3.

L'article 3 a été soumis le 23 juin 2009 à la revue *Genetics Selection Evolution* en tant que *Research article*. L'objectif de cette étude était de quantifier le risque génétique de tremblante atypique et de tremblante classique dans la population ovine française. Nous avons obtenu le génotype du gène PRNP aux codons 136, 141, 154 et 171 d'un échantillon représentatif de 248 cas de tremblante atypique et 245 cas de tremblante classique. Nous avons utilisé un échantillon aléatoire de 3317 animaux témoins génotypés aux codons 136, 154 et 171 et nous avons inféré le génotype au codon 141 par imputations multiples à partir d'un jeu de données externe. Pour estimer le risque associé aux porteurs d'allèles et aux génotypes, nous avons utilisé des modèles de régression logistique multifactoriels en ajustant sur le plan de surveillance et l'âge des animaux. Nous avons également estimé la prévalence de la tremblante atypique pour les différents génotypes. La susceptibilité associée aux porteurs d'allèle pour la tremblante atypique se classait dans l'ordre croissant suivant : VLRQ<ALRQ ≈ ALRH<ALRR<ALHQ ≈ AFRQ alors que pour la tremblante classique, elle se classait dans l'ordre suivant ALRR<ALHQ<ALRQ ≈ ALRH ≈ AFRQ<VLRQ. La prévalence chez les animaux ALRR/ALRR n'était pas différente de la prévalence de la population générale, par conséquent la sélection de ce génotype ne devrait pas conduire à un changement de la prévalence moyenne de tremblante atypique. Cependant, les troupeaux entièrement ALRR/ALRR qui sont engagés dans une certification basée sur des tests de dépistage ont des chances d'être détectés positifs en tremblante atypique si l'on admet que la maladie n'est pas d'origine infectieuse.

Les aspects méthodologiques n'ont pas pu être présentés en détail dans l'article 3 en raison des contraintes de taille, ils sont donc présentés en amont de l'article. Les résultats et la discussion sont par contre présentés uniquement dans l'article.

3.2. Article 2 : Enquête cas-témoin sur l'origine de la tremblante atypique ovine en France

A case control study on the origin of atypical scrapie in French sheep

Authors:

Fediaevsky Alexandre, DVM, MSc, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Lyon, France and Institut National de la Recherche Agronomique, Theix, France,
Morignat Eric, MSc, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Lyon,
Ducrot Christian, DVM, PhD, MSc, INRA, Institut National de la Recherche Agronomique, Theix, France,
Calavas Didier, DVM, PhD, MSc, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Lyon,

Corresponding author: Fediaevsky Alexandre, Unité d'Épidémiologie Animale, INRA, UR346, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France, Phone: +33473624050, Fax: +33473624548, Email: afediaevsky@clermont.inra.fr

Article Summary Line

The risk factors associated with atypical scrapie in this case control study on French sheep suggested a non-infectious origin but rather a spontaneous disease whose occurrence is influenced by genetic susceptibility and metabolic disorders.

Key-words

Scrapie, Transmissible Spongiform Encephalopathies, Prion Diseases, Matched Case-Control Studies, Sheep, Epidemiology

Abstract

A matched case–control study (95 cases and 220 controls) was designed to study risk factors for atypical scrapie in sheep in France. We analyzed contacts with animals from other flocks, lambing and feeding practices, and exposure to toxic substances. Data on the prnp genotype were collected for some case and control animals and included in a complementary analysis. Sheep dairy farms had a higher risk for scrapie (odds ratio [OR] 15.1, 95% confidence interval [CI] 3.3–69.7). Lower risk was associated with organic farms (OR 0.15, 95% CI 0.02–1.26), feeding corn silage (OR 0.16, 95% CI 0.05–0.53), and feeding vitamin and mineral supplements (OR 0.6, 95% CI 0.32–1.14). Genetic effects were quantitatively important but only marginally changed estimates of other variables. We did not find any risk factor associated with an infectious origin of scrapie. Atypical scrapie could be a spontaneous disease influenced by genetic and metabolic factors.

Introduction

Atypical scrapie is a transmissible spongiform encephalopathy (TSE) of small ruminants, which was recently defined by the European Food Safety Authority (EFSA) according to phenotypic features (1). This disease was identified for the first time in 1998 (2) and few things are known about its aetiology and epidemiology (3), which contrasts with the etiology and epidemiology of classical scrapie (4). Diagnosis of atypical scrapie is impaired by discrepant clinical diagnostic results (5) of rapid diagnostic tests and variable accumulation of scrapie prion protein (PrP^{Sc}) in the brainstem (3). In France, the average apparent prevalence of atypical scrapie detected by active surveillance with tests recommended by the European Food Safety Authority (6, 7) for the detection of this disease in brainstem samples was 6 cases/10,000 tested animals during 2002–2006. This prevalence was comparable elsewhere in Europe (8).

The origin of atypical scrapie is still unclear and whether the disease has an infectious origin or not remains a major question. This disease has been transmitted experimentally to Tg-mice (9) and sheep (10), but histopathologic features of atypical scrapie have suggested similarities with human spontaneous TSE (Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome) (2, 11). The few reports on >1 case of atypical scrapie in the same flock provide insufficient information to draw conclusions on natural transmission of this disease (3). If atypical scrapie had an infectious origin, it could be influenced by risk factors associated with a pattern of infectious disease transmission as described for classical scrapie (12-14). In 2006, a case–control study of atypical scrapie in Norway did not detect such factors, but it showed that the removal of the placenta at lambing could have a protective effect (15). Feeding of vitamin and mineral supplements

showed an adverse effect, which was interpreted as interaction of some minerals with cellular prion protein (16, 17) rather than a feed contamination. Such an effect warrants confirmation.

Genetic factors should be considered when investigating risk factors for atypical scrapie because some mutations of the prnp gene, which codes for prion protein (PrP), modify the risk for this disease (2, 18, 19). Because all described genotypes of the prnp gene confer susceptibility to sheep, a purely genetic origin is unlikely but a confounding effect could occur.

Other possible origins for atypical scrapie could involve exposure to toxic substances, particularly pesticides, which were shown to be involved with other neurodegenerative diseases involving protein disorders such as Parkinson disease and Alzheimer disease (20, 21). Some biochemical mechanisms for these diseases could be similar.

To confirm the findings of Hopp et al. (15) and to explore further hypotheses on risk factors for atypical scrapie, we conducted a case–control study of sheep in France.

Material and Methods

Study design

The epidemiologic unit was the animal, and most of the data collected concerned its birth cohort, assuming that in each flock all animals born during the same birth campaign (C_0, defined from July 1 of year n – 1 to June 30 of year n) shared the same exposure. Cases and controls were matched by frequency matching on their birth cohort (C_0) so that their distributions were similar over the birth campaigns.

Cases were recruited among cases detected by the active surveillance program during January 2006–March 2007. The index case had to be a female that was born and reared all its life in the same flock, with a known C_0. A total of 137 cases met these criteria.

Two controls per case were selected. The control animal was an animal born in C0, kept until birth campaign 2006 (C_{2006}) in the same flock, and originated from a control flock randomly selected among the list of flocks from which >1 sheep had been tested in 2006 with a test recommended for the detection of atypical scrapie. All results from TSE rapid tests on sheep from control flocks had to be negative for atypical scrapie and classical scrapie. Each control had 9 replacement animals randomly selected from sheep flocks from the same county (French département).

Flocks of case and control animals were required to have no history of scrapie and >20 ewes kept for reproduction. Males were not included in the study because they have a low incidence of atypical scrapie and because farming practices used with rams are different from those used with ewes.

Data collection

Four persons interviewed farmers during the summer of 2007. The questionnaire, which was available in French on request, was divided in 5 parts: 1) 13 questions on structure and economic context of the flock, 2) 7 questions on purchase of sheep and contacts with other flocks, 3) 3 questions on lambing management, 4) 16 questions on feeding practices including list of feed, and 5) 8 questions on exposure to toxic products, including the list of products used. Questions related to structure of the flock were asked for C_0 and C_{2006} to check if changes had occurred. Questions related to exposure during the first months of life were asked only for C_0, questions related to general feed exposure were asked for the period between C_0 and the 2 subsequent reproduction campaigns (C_0–C_{0+2}) and questions related to exposure to toxic products and mineral feeding were asked for C_0–C_{2006}. For each flock, the number of animals tested with a recommended test for atypical scrapie during active surveillance programs during 2002–2006 was extracted from the Base Nationale des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles Animales.

Prnp genotypes at codons 136, 141, 154, and 171 were determined by Labogena (Jouy en Josas; France). For cases, material examined consisted of a sample of soft tissue (muscle or ear) or brainstem. For controls, the matching constraint was relaxed to enable interviewers to sample some hair from any ewe born during C_0–C_{0+2}.

Data management

Data were entered into a Microsoft (Redmond, WA, USA) Access 2000 database. All statistical analyses were performed by using R 2.6.1 for Windows (22).

Three types of toxic exposure were assessed: pesticides on crops, insecticides on premises and antiparasitic treatments. For each category, active components of products reported were identified from databases (23-26). The Direction des Végétaux et de l'Environnement (DIVE) from the AFSSA specified the known or suspected neurotoxic components and their mechanism of action. Three categorical variables were created and were assigned a value of 1 for a case of exposure to any neurotoxic product of the category of concern between C_0 - C_{2006} and a value of 0 otherwise. Missing values from the questionnaire were imputed by using available covariates as predictors after verifying that the missingness pattern was compatible with random missing (27).

Genotypes were linearly classified into 5 levels of risk on a log scale (Tableau 20) according to the odds ratio (OR) estimated for the sheep population in France (19). Many genotypes were missing, mainly for controls because of difficulties in extracting DNA from hair samples (n = 117) and for a few cases because of unsuitable samples (n = 13). Missing values for controls were randomly imputed by using distribution of genotypes per breed. From the distribution of all available genotypes of cases of atypical scrapie in France, 20 datasets were imputed. To account for geographic distribution of flocks, France was divided into 9 sheep production areas according to sheep farming density and production patterns.

Univariate and multivariate analyses

The analyses were conditional to the matching variable and based on univariate and multivariate generalised linear mixed models with the logit link function for the outcome and C_0 as a random coefficient (28, 29). ORs and their 95% confidence interval were derived from the coefficient estimates and variance parameters. When variables could not be introduced simultaneously in the multivariate analysis because they were collinear, the most biologically sound variable was selected.

Variables for the multivariate model were selected according to the recommendations of Hosmer & Lemeshow (28). Candidate variables for the multivariate model were backward selected according to the log-likelihood ratio test. Candidate variables with a p-value <20% in univariate analyses were tested before other variables were tested. The effect of variables with a p-value ≥20% on the coefficient parameter of the selected variables was then verified 1 at a time. Best parameterization of continuous variables and statistical significance of interactions terms were then checked. A false discovery rate (FDR) (30) was calculated by using p values of the log-likelihood ratio tests for the tested variables and interaction terms.

A complementary model was used to assess if genetics influenced stability of the final model. For each of the datasets imputed, level of genetic risk was introduced in the final model as an ordinal covariate; coefficients, standard errors, and Wald test p values of different variables were inferred according to the method of Little and Rubin (27).

Sensitivity Analysis

The national database used to sample the controls did not enable us to take into account the size of the flocks. Therefore, counties with a large percentage of very small flocks (<20 ewes) may have been overrepresented. To assess the influence of geographical selection bias, we conducted a sensitivity analysis by using 2 methods: 1) weighing of controls in the final model with weights being defined for each county as the ratio of the percentage of flocks >20 ewes in the county divided by the percentage of flocks >20 ewes at the national scale, and 2) introduction of sheep production areas as random coefficients in the final model.

Results

Study Population

Among 137 selected farms containing cases, 11 did not satisfy the selection criteria. In addition, 11 farmers refused to participate and 20 could not be reached. A total of 95 cases were included in the study. For controls, 1,131 farmers were contacted to participate in the study; 621 flocks did not satisfy the selection criteria (374 because flocks had <20 ewes, 41 because matching criteria could

not be satisfied, 20 because flocks had <20 ewes and matching criteria were not satisfied, and 186 because of other reasons). In addition, 124 farmers refused to participate and 161 could not be reached. A total of 225 controls were included in the study.

The 95 cases and 225 controls were located throughout France (Figure 46). Case animals were born during 1994-2005. Because of exclusion of cases independent of the selection of their matched controls, the average ratio of controls per case was 2.4 instead of 2 and varied according to C_0 (Figure 47). There were few missing values for the questionnaire variables (0.4%).

Univariate analyses

Flocks containing cases were larger than flocks containing controls, had more animals tested for TSEs, and were present more often on sheep dairy farms (Tableau 21). Moreover, these 3 variables showed a significant correlation (Pearson coefficient of correlation between size of flock and number of animals tested $\rho = 0.67$, Spearman coefficients of correlation between size of flocks and dairy production $\rho = 0.23$ and between number of animals tested and dairy production $\rho = 0.20$, $p<0.001$). None of the variables associated with a hypothesis of infectious origin was associated with atypical scrapie (Tableau 22).

Variables associated with feeding practices were not associated with increased risk for atypical scrapie (Tableau 23). Feeding milk replacers, which was negatively correlated to dairy production (Spearman coefficient of correlation $\rho = -0.41$, $p <0.001$), and feeding corn silage showed an inverse association with atypical scrapie.

Pesticides and insecticides on the premises correlated with an increased risk for atypical scrapie (Tableau 24). These 2 variables correlated with dairy production (Spearman coefficients of correlation $\rho = 0.33$ and $\rho = 0.39$, respectively, $p <0.001$).

Multivariate analyses

The set of candidate variables included 36 categorical variables and 1 continuous variable (Tableau 25, Tableau 26). The final model included 5 variables and 1 interaction term (Tableau 25). The random coefficient had a null variance and the scale parameter was close to 1, which indicated an absence of shrinkage.

No variable associated with a hypothesis of infectious origin was present in the final model. The number of animals tested and sheep dairy farming were associated with disease (Tableau 26). Organic farms, feeding corn silage and vitamin and mineral supplements showed an inverse association with disease. Use of these supplements, which was not significant by univariate analysis, was significant after adjustment for sheep dairy farming, and the 2 variables had a significant interaction term. The uncontrolled FDR for our analysis was 33%, meaning that one third of the variables of the final model were spurious.

After we introduced the genetic effect, estimates of other variables did not vary by >25% of their initial values (Tableau 27). In addition, genetics showed a strong effect; OR for atypical scrapie ranged from 2.6 for genotypes in group 2 to 48.4 for genotypes in group 5 (Tableau 20).

Sensitivity analyses

Sensitivity analysis to check possible geographic selection bias led to the same results as analysis without taking into account geographic selection bias when either weighing of samples (Figure 48) or adjusting for sheep production areas (Figure 46) was used. These results indicated that putative bias had no statistical effect on the results.

Discussion

There was no evidence of a relationship between risk for atypical scrapie and factors related to an infectious origin of the disease in France. Our results are consistent with those from Hopp *et al.* (15). The only difference in the study by Hopp *et al.* was that removal of the placenta was associated with a decreased risk for disease. Other studies on atypical scrapie also suggested that the disease could have a noninfectious origin (3). The variables in our dataset were not associated with disease, and their corresponding ORs in univariate and multivariate analyses, regardless of the parameterization of the variables were ≈1, which suggests that they did not tend to be risk factors.

This result contrasts with those of case-control studies on classical scrapie, which found relationships between risk for disease and introduction of ewes (12-14), grazing on the same pasture as other flocks (14), exposure to placenta (13) and feeding of concentrates (12). Green et al. reported that flocks in which cases of scrapie (atypical or classical) were detected were larger and had more exchange of animals between flocks than control flocks (31). When they studied movement of sheep between flocks of equivalent status, flocks positive for classical scrapie were interconnected but flocks positive for atypical scrapie were not. These authors indicated that their results were compatible with atypical scrapie not being infectious.

Our results showed the influence of nutritional and metabolic factors. Although sheep dairy farming covers a broad category of farms with many factors, sheep dairy farms often use more sophisticated technology, and dairy ewes are more exposed to metabolic disorders because of high levels of exported nutrients, including minerals, during milk production. Thus, some feed components such as vitamin and mineral supplements or corn silage could alleviate the risk for disease. This lessening of risk may also occur with less harsh farming conditions found on organic farms.

There is evidence suggesting that minerals, especially copper, manganese, and zinc, could play a role in the physiopathology of prion diseases (16, 17). In contrast with our study, Hopp et al. (15) found that feeding of vitamin and mineral supplements was associated with atypical scrapie. The difference in the association between atypical scrapie and vitamin and mineral supplements in the 2 studies could be explained by differences in local conditions or roles of some minerals (17). Proper balance of minerals is complex because many interactions occur between mineral intake, diet of the animals, and physiologic conditions. Results of the few epidemiologic studies conducted on this topic (32-35) were rarely conclusive but such associations are difficult to demonstrate with observational data.

Among different mechanisms that should be explored to understand occurrence of atypical scrapie, we believe that toxic exposure should not be overlooked. In our study, organic farms were less at risk, and univariate analysis showed that pesticides on crops and insecticides on the premises were risk factors for disease. Multivariate analysis showed a confounding effect of dairy farming but this finding should not rule out a possible effect of pesticides. Organophosphates and pyrethroids were frequently identifyed among reported products; these 2 groups of active components, which may be associated with Parkinson disease (21, 36), interfere with the mitochondrial chain which is a possible pathway for prion diseases (37). Another study, on toxic exposures and gene-environment interaction could be more conclusive regarding this issue (38).

In that regard, flocks recently exposed to insecticide treatment for control of bluetongue vectors could constitute interesting cohorts to follow up for atypical scrapie.

Genetic factors had no confounding effect on variables in the final model, and associated ORs were high (<48 for animals with the highest genetic risk). This high magnitude of risk, compared with other factors, suggests that genetic factors play a role in the epidemiology of atypical scrapie. However, exploring the role of genetic factors in the origin of atypical scrapie would require estimation of penetrance of different mutations, but this estimate is not currently available. In addition, genetic factors are known to be a major risk factor for classical scrapie despite a contagious origin (4).

In an exploratory study such as ours, interpretation of variables in the final model is not straightforward. Particular caution should be given to the risk of purely statistical associations and to selection, classification or confusion biases. The risk of purely statistical associations increases with the number of variables tested. An FDR estimates the rate of such spurious associations (30), which was high in our final model (FDR 33%). To limit the FDR to a low value (5%), one would only consider as confident results the variables with a p value $<6.10^{-4}$, which are the number of animals tested, dairy farming and use of corn silage. However, a high FDR should not prevent discussion of findings. Rather, this value provides a safeguard against overinterpretation of results when testing many hypotheses.

We identified a geographical selection bias in the selection of controls. However, sensitivity analysis indicated that this bias did not influence the results. Misclassification problems for some variables could not be excluded, especially those regarding recall bias and memory failure. To minimize these problems, farming documents and account books were used when available, and some data were directly fetched from national databases.

Year of birth could have been a confounding factor because cases of atypical scrapie are usually found in old animals, and exposure to risk factors could be time-dependant. We matched controls on the birth cohort and accounted for year of birth as a random coefficient in a generalised linear mixed model which is recommended with this design (28, 29). Null variance of the random coefficient indicated that there was no variation of the risk between the different birth cohorts.

In several studies on scrapie (atypical or scrapie), the size of the flock was a risk factor for disease (12-14, 31, 39, 40). There are many possible relationships between size and status of the animals. In the hypothesis of infectious origin, larger flocks are more exposed because of increased contacts, whereas in the hypothesis of a spontaneous disease, expectancy of the number of cases increases with the size of the flock. Farming practices could also affect risk for developing disease and could be linked to the size of the flock. Moreover, larger flocks have higher number of animals tested in active surveillance which increases the probability to detect an animal with disease. The number of animals tested is determined by a combination of many structural factors that involve the size of the flock, local conditions of implementation of the surveillance program, mortality and culling rates, and use of a TSE qualification program. We could not simultaneously adjust for the size of the flock and number of animal tested and we prioritized control of surveillance bias. However, the 2 options were numerically equivalent.

Genetic analysis suggested no confounding effect but a strong association with the disease. However, results must be interpreted with caution because sensitivity analysis was conducted after imputing missing data for 53% of the controls and 13% of the cases.

Our final model suggested that atypical scrapie in sheep could be a spontaneous disease with a genetic determinant and possible influence of environmental and metabolic factors. On the basis of our results, there was no risk factor linked to an infectious origin. In particular, atypical scrapie is unlikely to originate from purchase of sheep. Other epidemiologic approaches such as spatial analyses or surveys on occurrence of secondary cases could help substantiate these findings. If infectious origin is confirmed, this finding would indicate that movement limitations of animals from flocks positive for atypical scrapie would not be a key measure in controlling the disease.

Acknowledgement

We thank the farmers for their participation in this study; the veterinary services for assistance in contacting farmers; the interviewers for their commitment to this work; R. Ecochard, P. Hopp, G. Gerbier, and the Direction des Végétaux et de l'Environnement for advice; the staff of the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments in Lyon, France, for technical assistance; and Carole Moreno, Pascal Laurent, and Katayoun Goudarzi for providing genotype information.
This study was supported by the Direction Générale de l'Alimentation of the French Ministry of Agriculture and the Neuroprion Network of Excellence (no. FOOD-CT-2004-506579).

Dr Fediaevsky is a veterinary public health inspector at INRA Clermont-Theix, France, and a doctoral student in veterinary epidemiology at the Blaise Pascal University in Clermont Ferrand, France. His research interests include epidemiology and control of animal prion disease.

Reference list

1. European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in Small Ruminants (Question number EFSA-Q-2005-073) adopted on 26 October 2005. 2005;276:1-30.
2. Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schönheit J, Tranulis MA, Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type Nor98. Vet Rec. 2003;153:202-8.
3. Benestad SL, Arsac JN, Goldmann W, Noremark M. Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. Vet Res. 2008 Jul-Aug;39(4):19.
4. Detwiler LA, Baylis M. The epidemiology of scrapie. Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties. 2003;22(1):121-43.
5. Konold T, Davis A, Bone G, Bracegirdle J, Everitt S, Chaplin M, et al. Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report. BMC Vet Res. 2007;3:1-27.
6. European Food Safety Authority. Scientific Report of the European Food Safety Authority on the Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants. The EFSA Scientific Report. 2005 17/05/2005;31:1-17.
7. European Food Safety Authority. Scientific Report of the European Food Safety Authority on the Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants (2). The EFSA Scientific Report. 2005 26/09/2005;49:1-46.
8. Fediaevsky A, Tongue SC, Noremark M, Calavas D, Ru G, Hopp P. A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. BMC Vet Res. 2008 Jun 10;4(1):19.

9. Le Dur A, Beringue V, Andréoletti O, Reine F, Lai TL, Baron T, et al. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. PNAS. 2005;102(44):16031-6.
10. Simmons MM, Konold T, Simmons HA, Spencer YI, Lockey R, Spiropoulos J, et al. Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. BMC Vet Res. 2007 Aug 28;3(1):20.
11. Buschmann A, Biacabe A-G, Ziegler U, Bencsik A, Madec J-Y, Erhardt G, et al. Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. J Virol Methods. 2004;117(1):27-36.
12. Philippe S, Ducrot C, Roy P, Remontet L, Jarrige N, Calavas D. Sheep Feed and Scrapie, France. EID. 2005;11(8):1274-9.
13. Healy AM, Hannon D, Morgan KL, Weavers E, Collins JD, Doherty ML. A paired case-control study of risk factors for scrapie in Irish sheep flocks. PVM. 2004;64(2-4):73-83.
14. Hopp P, Ulvund MJ, Jarp J. A case-control study on scrapie in Norwegian sheep flocks. PVM. 2001;1622:183-98.
15. Hopp P, Omer MK, Heier BT. A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. J Gen Virol. 2006 Dec;87(Pt 12):3729-36.
16. Choi CJ, Kanthasamy A, Anantharam V, Kanthasamy AG. Interaction of metals with prion protein: possible role of divalent cations in the pathogenesis of prion diseases. Neurotoxicology. 2006 Sep;27(5):777-87.
17. Leach SP, Salman MD, Hamar D. Trace elements and prion diseases: a review of the interactions of copper, manganese and zinc with the prion protein. Anim Health Res Rev. 2006 Jun-Dec;7(1-2):97-105.
18. Moum T, Olsaker I, Hopp P, Moldal T, Valheim M, Benestad SL. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. J Gen Virol. 2005 Jan;86(Pt 1):231-5.
19. Moreno CR, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Cazeau G, Andréoletti O, Chadi S, et al. Which PrP haplotypes in a French sheep population are the most susceptible to atypical scrapie? Arch Virol. 2007 Jun;152(6):1229-32.
20. Baldi I, Lebailly P, Mohammed-Brahim B, Letenneur L, Dartigues JF, Brochard P. Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. Am J Epidemiol. 2003 Mar 1;157(5):409-14.
21. Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS. Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? Environ Health Perspect. 2006 Feb;114(2):156-64.
22. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found Stat Comput. 2008 mai 6, 2008.
23. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (MAP). E-phy. 2008 [cited 2008 17/07/2008]; Available from: http://e-phy.agriculture.gouv.fr/
24. Afssa - Direction du végétal et de l'environnement. Agritox. 2008 [cited 2008 17/07/2008]; Available from: http://www.dive.afssa.fr/agritox/index.php
25. Meissonnier E, Devisme P, Join-Lambert P. Dictionnaire des médicaments vétérinaires et des produits de santé animale. In: Editions du point vétérinaire, editor. 14 ed. Maisons-Alfort, France; 2007.
26. Footprint. The FOOTPRINT Pesticide Properties DataBase. Database collated by the University of Hertfordshire as part of the EU-funded FOOTPRINT project (FP6-SSP-022704). . 2007,2008 [cited 2008 17/07/2008]; Available from: http://www.eu-footprint.org/ppdb.html.
27. Little RJA, Rubin DB. Statistical Analysis with Missing Data. 2nd ed. New York: Wiley John and Sons, Ltd; 1988.

28. Brown H, Prescott R. Applied mixed models in Medicine. UK: Wiley John and Sons, Ltd; 2006.
29. Agresti A. Categorical Data Analysis. 2nd Ed. ed: Wiley-Interscience; 2002.
30. Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. Ann Stat. 2001;29(4):1165-88.
31. Green DM, Del Rio Vilas VJ, Birch CP, Johnson J, Kiss IZ, McCarthy ND, et al. Demographic risk factors for classical and atypical scrapie in Great Britain. J Gen Virol. 2007 Dec;88(Pt 12):3486-92.
32. Gudmundsdottir KB, Sigurdarson S, Kristinsson J, Eiriksson T, Johannesson T. Iron and iron/manganese ratio in forage from Icelandic sheep farms: relation to scrapie. Acta Vet Scand. 2006;48(1):16.
33. Imrie CE, Korre A, Munoz-Melendez G. Spatial correlation between the prevalence of transmissible spongiform diseases and British soil geochemistry. Environ Geochem Health. 2008 Apr 22.
34. Chihota CM, Gravenor MB, Baylis M. Investigation of trace elements in soil as risk factors in the epidemiology of scrapie. Vet Rec. 2004;154(26):809-13.
35. Slivarichova D, Mitrova E, Koscova S, Uhnakova I. Slovak Accumulation of Genetic Creutzfeldt-Jakob Disease with Exogenous Risk Factor. Neuroprion 2007; 2007; Edinburgh, UK; 2007.
36. Kamel F, Hoppin JA. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. Environ Health Perspect. 2004 Jun;112(9):950-8.
37. Choi SI, Ju W-K, Choi E-K, Kim J, Lea H-Z, Carp RI, et al. Mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in the brains of hamsters infected with the 263 K scrapie agent. Acta Neuropathol. 1998;96(3):279-86.
38. Coppede F, Mancuso M, Siciliano G, Migliore L, Murri L. Genes and the environment in neurodegeneration. Biosci Rep. 2006 Oct;26(5):341-67.
39. Gubbins S, Clark AM, Eglin RD, Sivam SK. Results of a postal survey of scrapie in the Shetland Islands in 2003. Vet Rec. 2006 Feb 25;158(8):255-60.
40. McIntyre KM, Gubbins S, Sivam SK, Baylis M. Flock-level risk factors for scrapie in Great Britain: analysis of a 2002 anonymous postal survey. BMC Vet Res. 2006 Aug 3;2(1):25.

Tables

Tableau 20 : Genotypes grouped by levels of genetic risk for atypical scrapie in sheep, France*

*Groups showed homogeneous odds ratios for atypical scrapie. The level of risk is the value of the corresponding log linear variable introduced into the multivariate model. prnp, prion protein.

Table 1. Genotypes grouped by levels of genetic risk for atypical scrapie in sheep, France*

Group	Genotypes of *prnp* gene	Coded level
1	ALRR-ALRQ, ALRR-VLRQ, ALRQ-ALRQ, ALRQ-ALRH, ALRQ-VLRQ	0
2	ALRR-ALRR, ALRR-ALRH, VLRQ-VLRQ	1
3	ALHQ-ALRH, ALHQ-VLRQ, AFRQ-ALRH, ALRH-ALRH, AFRQ-VLRQ, ALRH-VLRQ	2
4	ALRR-ALHQ, ALRR-AFRQ, ALHQ-ALRQ, AFRQ-ALRQ	3
5	ALHQ-ALHQ, ALHQ-AFRQ, AFRQ-AFRQ	4

Tableau 21 : Univariate analyses of farm structure variables conditional to C0 for atypical scrapie in sheep, France*

Variable	Controls	Cases	Odds ratio	p value
Mean ± SE no. animals tested during 2002–2006	15 ± 17	32 ± 29	1.04	<0.001
Sheep dairy farm				
No	196	64	3.3	<0.001
Yes	29	31		
Flock of familial origin				
No	70	24		
Yes	155	71	1.3	0.29
Flock of external origin				
No	126	58		
Yes	99	37	0.8	0.41
Member of a producer organization during C_0–C_{2006}				
No	104	35		
Yes	121	60	1.5	0.12
Follow-up of farm results during C_0–C_{2006}				
No	112	36		
Yes	113	59	1.6	0.05
Organic farm during C_0–C_{2006}				
No	211	94		
Yes	14	1	0.2	0.08
Sent flock animals to breeding centers during C_0–C_{2006}				
No	192	63		
Yes	33	32	3.0	<0.001
Presence of cows during C_0–C_{0+2}				
No	115	67	0.4	<0.001
Yes	110	28		
Presence of goats during C_0–C_{0+2}				
No	200	81	1.4	0.36
Yes	25	14		
Presence of pigs during C_0–C_{0+2}				
No	216	93	0.5	0.40
Yes	9	2		
Presence of poultry during C_0–C_{0+2}				
No	209	89	0.9	0.80
Yes	16	6		

*C_0, birth cohort assuming that in each flock all animals born during the same birth campaign (defined from July 1 of year n – 1 to June 30 of year n) shared the same exposure; SE, standard error; C_{2006}, birth campaign 2006; C_0–C_{0+2}, period between C_0 and the 2 subsequent reproduction campaigns.

Tableau 22 : Univariate analyses of contact with sheep from other flocks and afterbirth exposure variables conditional to C0 for atypical scrapie in sheep, France*

Variable	Controls	Cases	Odds ratio	p value
Contact with other flocks during C_0–C_{2006}				
No	189	79	1.1	0.85
Yes	36	16		
Purchase of rams during C_0–C_{2006}				
No	30	17	0.7	0.29
Yes	195	78		
Purchase of ewes during C_0–C_{2006}				
No	139	68	0.6	0.10
Yes	86	27		
No. flocks of origin of ewes purchased during C_{2005}–C_{2006}				
0	139	68	1.0	0.22
1	35	13	0.8	
2	25	9	0.7	
≥4	26	5	0.4	
Disposal of placenta in C_0				
Never	82	37	1.0	0.51
Sometimes	36	19	1.2	
Always	107	39	0.8	
Use of adoption cases in C_0				
No	41	12	1.5	0.22
Yes	184	83		

*C_0, birth cohort assuming that in each flock all animals born during the same birth campaign (defined from July 1 of year n – 1 to June 30 of year n) shared the same exposure; C_{2006}, birth campaign 2006; C_{2005}, birth campaign 2005.

Tableau 23 : Univariate analyses of feeding component variables during the specified period and conditional to C0 for atypical scrapie in sheep, France*

Variable	Controls	Cases	Odds ratio	p value
Lambs fed milk replacers in C_0				
No	68	42	0.5	0.02
Yes	157	53		
Corn silage in C_0				
No	195	90	0.4	0.04
Yes	30	5		
Beet root in C_0				
No	185	86	0.5	0.06
Yes	40	9		
Straw in C_0				
No	77	23	1.6	0.08
Yes	148	72		
Oil cake in C_0				
No	164	73	0.8	0.47
Yes	61	22		
Compound feed in C_0				
No	78	28	1.3	0.37
Yes	147	67		
Grass silage in C_0				
No	195	77	1.5	0.20
Yes	30	18		
Grain in C_0				
No	45	18	1.1	0.83
Yes	180	77		
Molasses in C_0				
No	212	88	1.3	0.59
Yes	13	7		
Vitamin and mineral supplements in C_0				
No	102	48	0.8	0.40
Yes	123	47		
Salt licks (pure salt) during C_0–C_{2006}				
No	7	2	1.5	0.62
Yes	218	93		
Salt licks with minerals during C_0–C_{2006}				
No	46	28	0.6	0.08
Yes	179	67		
Other ruminants feed during C_0–C_{0+2}				
No	205	90	0.6	0.27
Yes	20	5		
Other ruminants minerals during C_0–C_{0+2}				
No	203	85	1.1	0.84
Yes	22	10		
Pig feed during C_0–C_{0+2}				
No	209	89	0.9	0.80
Yes	16	6		
Poultry feed during C_0–C_{0+2}				
No	193	80	1.1	0.71
Yes	32	15		

*C_0, birth cohort assuming that in each flock all animals born during the same birth campaign (defined from July 1 of year n – 1 to June 30 of year n) shared the same exposure; C_{2006}, birth campaign 2006; C_0–C_{0+2}, period between C_0 and the 2 subsequent reproduction campaigns.

Tableau 24 : Univariate analyses of exposure to toxic products variables during the specified period and conditional to C0 for atypical scrapie in sheep, France*

Variable	Controls	Cases	Odds ratio	p value
Use of mineral drugs during C_0–C_{2006}				
No	99	38	1.2	0.50
Yes	126	57		
Pesticides containing neurotoxic components used on crops during C_0–C_{2006}				
No	155	51	1.9	0.009
Yes	70	44		
Insecticides containing neurotoxic components used on premises during C_0–C_{2006}				
No	169	55	2.2	0.002
Yes	56	40		
Antiparasitic treatments containing neurotoxic components during C_0–C_{2006}				
No	100	47	0.8	0.42
Yes	125	48		

*C_0, birth cohort assuming that in each flock all animals born during the same birth campaign (defined from July 1 of year n – 1 to June 30 of year n) shared the same exposure; C_{2006}, birth campaign 2006.

Tableau 25 : Multivariate analyses coefficient parameters of the final model for atypical scrapie in sheep, France*

Variable	Coefficient (β)	Standard error (β)	p value†
Random coefficient	0	2.00×10^{-5}	
Intercept	–1.51	0.24	2×10^{-10}
No. animals tested during 2002–2006	0.04	0.01	6×10^{-10}
Sheep dairy farm	2.71	0.78	2×10^{-5}
Organic farm	–1.88	1.08	0.03
Corn silage in C_0	–1.81	0.59	5×10^{-4}
Vitamin and mineral supplements in C_0	–0.51	0.33	0.02
Interaction term between sheep dairy farm and vitamin and mineral supplements in C_0	–1.69	0.88	0.04

*For categorical variables, the reference value was no. C_0, birth cohort assuming that in each flock all animals born during the same birth campaign (defined from July 1 of year n – 1 to June 30 of year n) shared the same exposure.
†By log likelihood ratio test.

Tableau 26 : Adjusted odds ratios of atypical scrapie associated with variables computed from the final model in sheep, France*

Variable	Adjusted odds ratio	95% CI
No. animals tested increased by 5	1.22	1.11–1.35
Sheep dairy farm when vitamin and mineral supplements not given	15.06	3.25–69.73
Sheep dairy farm when vitamin and mineral supplements given	2.77	1.21–6.37
Organic farm	0.15	0.02–1.26
Corn silage	0.16	0.05–0.53
Vitamin and mineral supplements used on sheep dairy farms	0.18	0.03–1.04
Vitamin and mineral supplements not used on sheep dairy farms	0.6	0.32–1.14

*CI, confidence interval.

Tableau 27 : Multivariate analysis including genetic risk from multiple imputation parameters for atypical scrapie in sheep, France*

Variable	Coefficient (β)	Standard error (β)	p value†
Intercept	−3.03	0.37	7×10^{-16}
Level of genetic risk‡	0.97	0.13	1×10^{-13}
No. animals tested during 2002–2006	0.03	0.01	5×10^{-5}
Sheep dairy farm	2.52	0.96	8×10^{-3}
Organic farm	−2.38	1.29	0.07
Corn silage in C_0	−1.48	0.68	0.03
Vitamin and mineral supplements in C_0	−0.40	0.40	0.31
Interaction term between sheep dairy farm and vitamin and mineral supplements in C_0	−1.99	1.09	0.07

*Genetic risk from multiple imputation parameters was estimated by the method of Little and Rubin (27). C_0, birth cohort assuming that in each flock all animals born during the same birth campaign (defined from July 1 of year n – 1 to June 30 of year n) shared the same exposure.
†By Wald test.
‡Because the variable is ordinal, the odds ratio (OR) for a given level of genetic risk is the exponential of the coded level (see Table 1) multiplied by the estimated coefficient β. The ORs for groups 2–5 are 2.6, 7.0, 18.4, and 48.4, respectively.

Figures

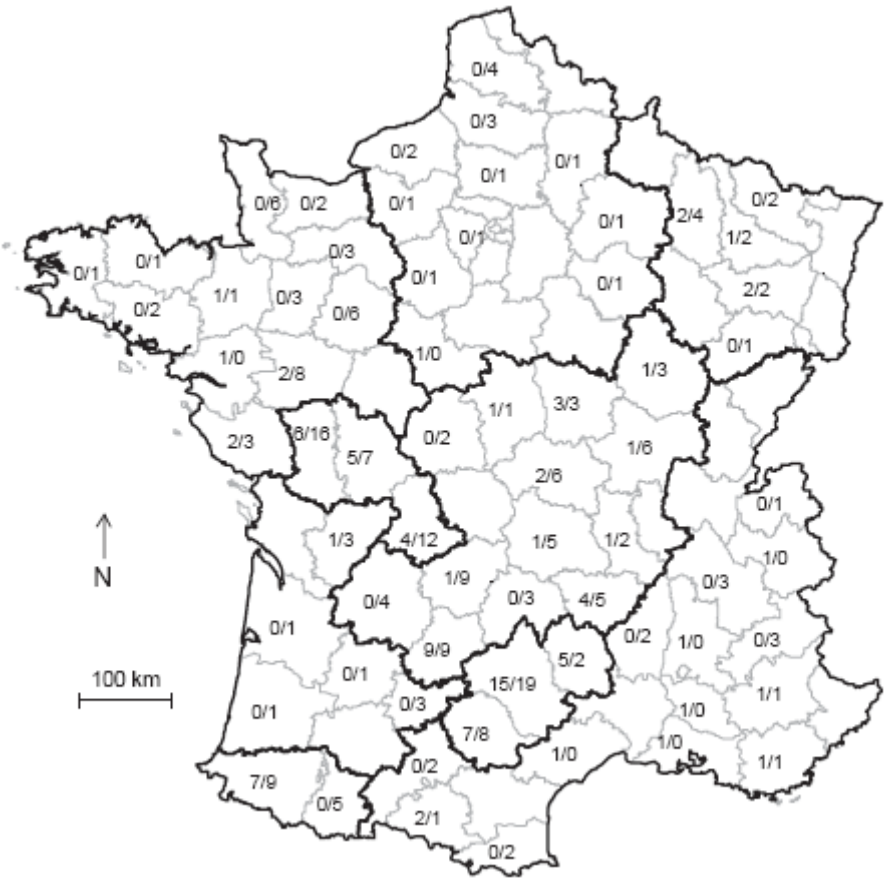


Figure 46 : Distribution of cases of atypical scrapie and controls (no. cases/no. controls) in sheep, France, 2007. Sheep production areas are outlined in black, and counties are outlined in gray.

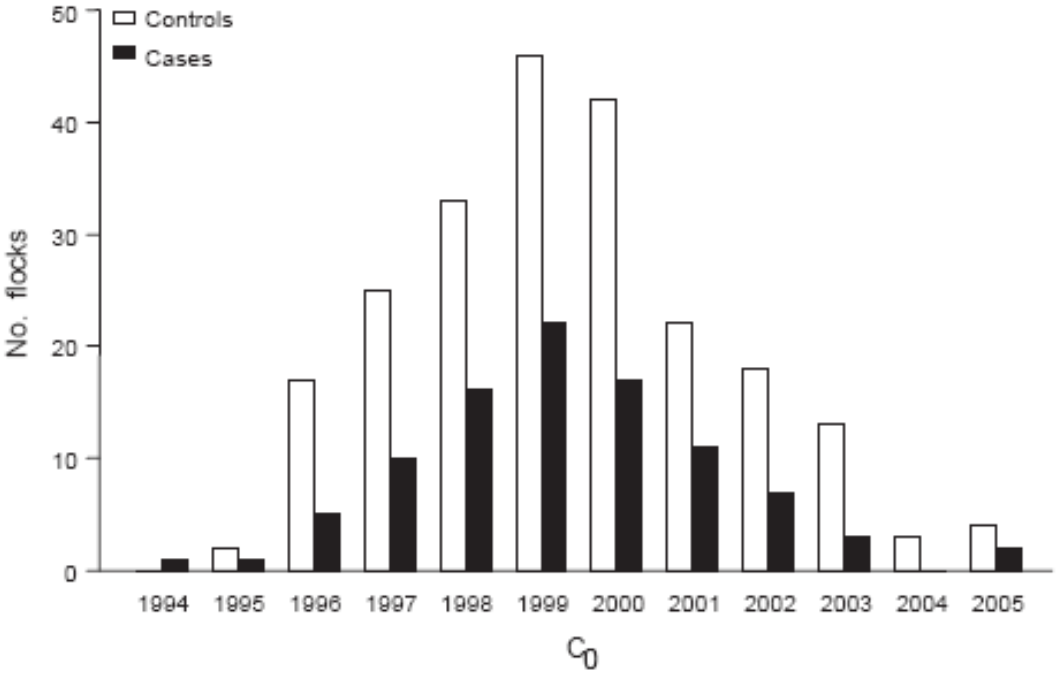


Figure 47: Distribution of C0 for cases of atypical scrapie and controls in sheep, France, 1994–2005.

C0, birth cohort assuming that in each flock all animals born during the same birth campaign (defined from July 1 of year n – 1 to June 30 of year n) shared the
same exposure.

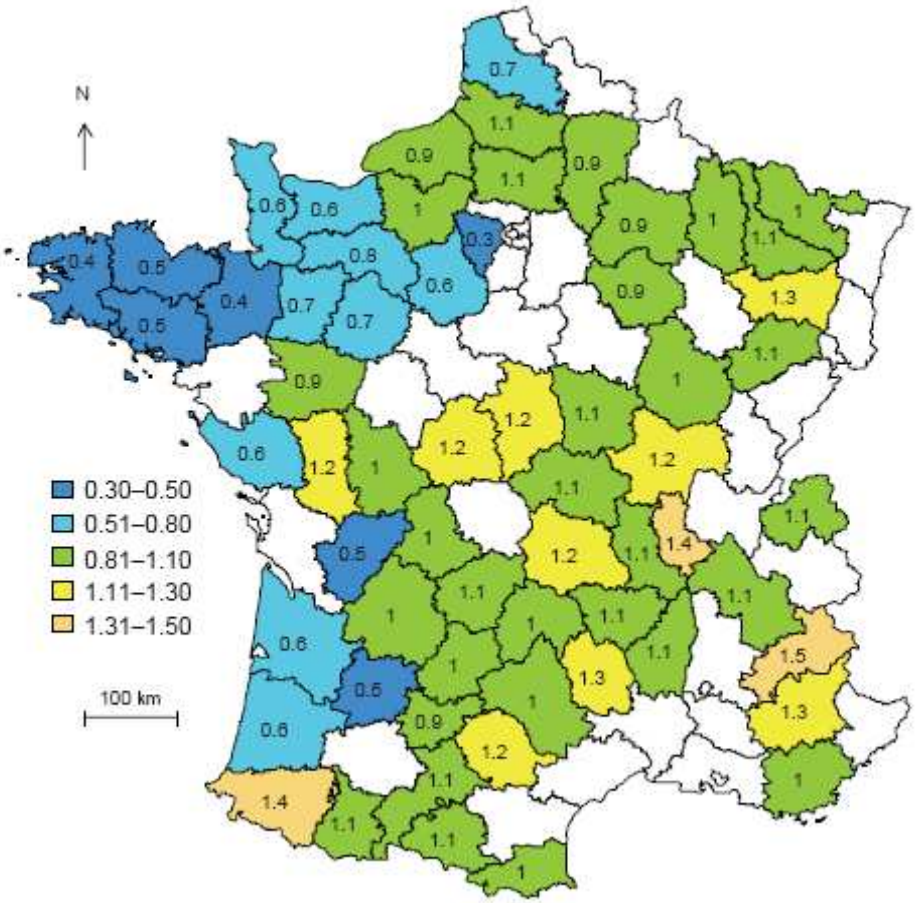


Figure 48: Distribution of control weightings

Calculated as the ratio of the percentage of flocks with >20 ewes in the county over the average percentage of flocks with >20 ewes for atypical scrapie in sheep, in France, 2007. Ranges represent classes of weightings.

3.3. Matériel et méthodes de l'étude du risque génétique de la tremblante atypique et de la tremblante classique ovines en France (article 3)

3.3.1. Objectifs

L'objectif global de ce travail était de caractériser le risque de tremblante atypique et classique dans la population ovine soumise à la surveillance active, en fonction de la susceptibilité génétique des animaux, portant sur la partie codante du gène PRNP. L'étude proposait en particulier:

- d'estimer et de comparer pour les principaux génotypes et allèles les odds ratio (OR) associés au risque de tremblante atypique et de tremblante classique ;
- d'estimer la prévalence moyenne de la tremblante atypique pour les principaux génotypes ;
- d'estimer la probabilité qu'un troupeau exclusivement composé d'animaux ARR/ARR soit détecté positif en fonction du nombre d'animaux testés.

3.3.2. Population d'étude

Cette étude a porté sur la population ovine adulte soumise à la surveillance active vis-à-vis des EST entre 2002 et 2007 en France continentale. Les génotypages ont été conduits pour partie par séquençage au laboratoire INRA de Jouy en Josas et pour partie au laboratoire Labogena (Jouy en Josas).

Cas de tremblante atypique

Le groupe des cas de tremblante atypique a été constitué de façon séquentielle en fonction de la disponibilité du génotype aux codons 136, 141, 154 et 171. Dans le cadre d'un projet de recherche (Moreno, Moazami-Goudarzi et al., 2007), un séquençage du gène PRNP a été demandé pour 118 cas de tremblante atypique détectés en France entre avril 2002 et mai 2006. Dans un second temps, dans le cadre d'une étude cas-témoins (Fediaevsky, Morignat et al., 2009), il a été demandé de génotyper les 180 cas détectés entre juin 2006 et mars 2007. Enfin, grâce à des crédits supplémentaires, un lot de 16 cas sélectionnés aléatoirement parmi ceux détectés entre avril et septembre 2007 a été ajouté. Certains échantillons n'ont pas pu être analysés en raison de l'indisponibilité de matériel analysable, principalement pour les cas issus de la surveillance à l'équarrissage. Au final le génotype était disponible pour 254 cas de tremblante atypique.

Cas de tremblante classique

Pour les cas de tremblante classique, les génotypes aux codons 136, 154 et 171 étaient disponibles pour 310 des 395 cas index détectés, parmi lesquels 276 présentaient un allèle ARQ. Il a été demandé à Labogena de destocker et d'analyser ces échantillons pour déterminer les codons 141 et 171. En raison de contraintes techniques, seules 220 analyses ont pu être effectuées. Finalement, le génotype était disponible pour 254 cas de tremblante classique.

Témoins

Les témoins correspondaient aux animaux testés dans le cadre de la surveillance active et qui avaient fourni un résultat négatif à la recherche d'EST. Pour ces animaux, le génotype au codon 141 et la distinction entre les phénotypes H et Q en position 171 n'étaient pas disponibles.

Nous avons inféré les données manquantes à partir d'un jeu de données externe. Celui-ci provenait d'une étude dans laquelle les fréquences des génotypes aux codons 136, 141, 154 et 171 du gène PRNP avaient été estimées pour les animaux du noyau de sélection des principales races ovines françaises, avant la mise en place du programme de sélection génétique de la résistance à la tremblante classique (Moreno, Moazami-Goudarzi et al., 2007). Après avoir préalablement vérifié : i) que les fréquences des allèles n'étaient pas significativement différentes entre les populations des deux études (Chi-deux) et ii) que l'équilibre de Hardy Weinberg prévalait dans la population témoin (Chi-deux), les fréquences p_{F141} et p_{H171} correspondant respectivement aux phénotypes F141 et H171 parmi les animaux porteurs de l'allèle ARQ ont été utilisées.

Les mutations F141 et H171 ont ensuite été imputées chez les témoins porteurs de l'allèle ARQ. Pour chaque témoin concerné, l'allèle ARQ a été remplacé par un allèle AFRQ, ALRH ou ALRQ en fonction de la réalisation d'une variable aléatoire suivant une distribution multinomiale à trois modalités de paramètres p_{F141}, p_{H171}, 1- p_{F141} - p_{H171} correspondant aux trois allèles AFRQ, ALRH et ALRQ. Afin de tenir compte de l'incertitude associée à l'estimation initiale issue d'un autre jeu de données, nous avons considéré que les paramètres p_{F141} et p_{H171} suivaient une distribution béta de paramètres a et b tels que la moyenne et la variance de la variable correspondaient aux valeurs estimées dans le jeu de données externe. Les paramètres a et b ont été estimés à l'aide du logiciel Betabuster (Chun-Lung Su, http://www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/betabuster.html). Afin de prendre en compte l'incertitude liée à cette méthode, l'analyse a été répétée par bootstrap et 1 000 jeux de données avec imputation aléatoire des allèles AFRQ, ALRH et ALRQ ont été constitués.

3.3.3. Analyses multivariées

Pour chacune des deux formes de tremblante, nous avons estimé sous forme d'OR le risque associé au portage d'allèle d'une part et au génotype d'autre part. Pour cela, des modèles de régressions logistiques multivariées ont été utilisés qui incluaient des variables d'ajustement en plus de l'effet génétique d'intérêt : le canal de surveillance (équarrissage versus abattoir) et la dentition (classes 5 à 8 ID et 8 ID versus 2 à 4 ID). Des exclusions de cas et de témoins ont été faites en raison de données manquantes sur le plan de surveillance ou sur la dentition.

L'analyse associée aux allèles a été conduite pour les porteurs d'allèles plutôt que pour les fréquences alléliques, l'unité est donc l'individu et non pas l'allèle. La référence était l'allèle ALRQ. De ce fait, les OR étaient calculés pour des individus, ce qui est plus facilement interprétable en terme épidémiologique et l'analyse n'est pas soumise aux conditions de validation de l'équilibre de Hardy-Weinberg dans les populations comparées (Sasieni, 1997), les cas étant en déséquilibre. Cependant, les OR basés sur les porteurs d'allèles impliquent une hypothèse de dominance puisque les hétérozygotes et les homozygotes sont assimilés. Dans le cas contraire, le biais est conservateur : les OR mesurés sont plus proches de un qu'ils ne le sont en réalité. Les effets estimés pour les génotypes sont donc plus corrects.

L'analyse du risque associé aux génotypes a été conduite par rapport au risque associé au génotype ALRQ/ALRQ. Les OR et leurs intervalles de confiance n'ont pas pu être calculés pour tous les génotypes, en raison de l'absence de cas dans certaines catégories.

Les paramètres des régressions logistiques ont été estimés pour les 1 000 réplicas de jeux de données et la moyenne et l'écart type des paramètres ont été estimés par la méthode de Rubin (Roderick J. A. Little and Donald B. Rubin, 1988).

3.3.4. Estimation de la prévalence moyenne par génotype

La prévalence moyenne de tremblante atypique pour chaque génotype Gi, P(TA/Gi), a été calculée en pondérant la prévalence moyenne de tremblante atypique dans la population générale par le rapport des fréquences des génotypes Gi observés chez les cas et chez les témoins :

$$P(TA/Gi) = \frac{P(Gi/TA).P(TA)}{P(Gi/TA).P(TA) + P(Gi/T-).(1-P(TA))} \approx P(TA).\frac{P(Gi/TA)}{P(Gi/T-)} \quad (1)$$

Afin de prendre en compte les différents niveaux d'incertitude liés aux fluctuations d'échantillonnage, nous avons supposé que chacune de ces proportions (prévalence de tremblante atypique, fréquence de génotype Gi chez les cas de tremblante atypique et fréquence de génotype Gi chez les témoins), suivait une distribution béta. Les paramètres d'échelle et de dispersion des lois béta ont été estimés de sorte à ce que les proportions aient pour espérance et pour variance respectivement la moyenne et la variance des variables correspondantes observées à partir des échantillons, déterminés comme précédemment. Pour les génotypes impliquant un allèle ALRQ, AFRQ ou ALRH nous avons utilisé le nombre moyen de témoins porteurs du génotype concerné déterminé à l'étape précédente.

Pour chaque génotype ou groupe de génotypes définis précédemment pour la tremblante atypique, les estimateurs de la moyenne de P(TA/Gi) et ses intervalles de crédibilité à 95% ont été obtenus à l'aide du logiciel Winbugs (Lunn, Thomas et al., 2000) pour des chaînes de 2 000 itérations échantillonnées avec un pas de deux après une chaîne brûlée de 1 000 itérations.

Nous n'avons pas calculé la prévalence par génotype pour la tremblante classique car la plupart des animaux ne sont pas exposés à l'agent infectieux, quel que soit leur génotype. En fait, une prévalence par génotype n'a de sens que pour les animaux issus des troupeaux infectés.

3.3.5. Risque de tremblante atypique pour un troupeau 100% ALRR/ALRR

Afin de calculer la probabilité qu'un troupeau constitué d'animaux ALRR/ALRR soit détecté atteint de tremblante atypique en fonction du nombre d'animaux testés, nous avons fait les hypothèses que i) le risque de tremblante atypique ne dépend que du génotype, de l'âge de l'animal et du canal de surveillance, et ii) en moyenne, les animaux testés en provenance d'un troupeau donné ont la même structure d'âge et sont testés dans les mêmes proportions selon le canal de surveillance que la population générale.

Sous ces hypothèses on peut considérer que le nombre, X, d'animaux positifs dans un troupeau constitué exclusivement d'animaux ALRR/ALRR suit une distribution binomiale dont le paramètre de probabilité, p, correspond à la prévalence moyenne observée pour ce génotype.

La probabilité que le troupeau soit déclaré positif en fonction du nombre n d'animaux testés s'écrit alors simplement :

$$P(X \geq 1) = 1 - P(X = 0) = 1 - p^0 \times (1-p)^n \quad (2)$$

Nous avons estimé p comme précédemment pour le génotype ALRR/ALRR et pour n variant de 1 à 1 000, nous avons calculé la moyenne de P(X≥1) et ses intervalles de crédibilité à 95% à l'aide de Winbugs pour des chaînes de 2 000 itérations échantillonnées avec un pas de deux après une chaîne brûlée de 1 000 itérations.

3.4. Article 3 : Etude du risque génétique de la tremblante atypique et de la tremblante classique ovines en France

Quantitative estimation of genetic risk for atypical scrapie and classical scrapie in French sheep

Authors

A. Fediaevsky[1,2], Calavas[2], P. Gasqui[1], K. Moazami-Goudarzi[4], P. Laurent[4], J-N. Arsac[2], C. Ducrot[1], D. C. Moreno[3]

[1] INRA, Centre de Clermont-Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France
[2] AFSSA-Lyon, 31 Avenue Tony Garnier, 69364 Lyon Cedex 07, France
[3] INRA, SAGA, UR631, BP52627, 31326 Castanet-Tolosan, France
[4] INRA GABI, UMR1313, domaine de Vilvert, 78252 Jouy-en-Josas, France.

Corresponding author

A. Fediaevsky
INRA, Centre de Clermont-Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France
afediaevsky@clermont.inra.fr
Tel +33 473 624 050
Fax : +33 473 624 548

Summary

Background: Since 2002 active surveillance programmes have detected important number of classical scrapie (CS) and atypical scrapie cases (AS) in French sheep in almost all PRNP genotypes. The aim of this study was to quantify the genetic risk of classical scrapie (CS) and atypical scrapie (AS) cases in French sheep.

Methods: We obtained genotypes at the codons 136,141,154 and 171 of the PRNP gene for representative samples of 248 AS and 245 CS cases. We used a random sample of 3317 scrapie negative animals genotyped at the codons 136, 154 and 171 and we made inferences on the position 141 by multiple imputations, using external data. To estimate the risk associated to allele carriers and genotypes we fitted multifactor logistic regression models and we estimated the prevalence of AS for the different genotypes.

Results: Compared to ALRQ, the ALRR allele was significantly at risk of AS and was very significantly protective for CS whereas the VLRQ allele was significantly protective for AS and at risk for CS. We have ranked allelic susceptibilities for AS: VLRQ<ALRQ ≈ ALRH<ALRR<ALHQ ≈ AFRQ and for CS: ALRR<ALHQ<ALRQ ≈ ALRH ≈ AFRQ<VLRQ.

The prevalence of AS in ALRR-ALRR animals was 0.6‰ and was not different from the prevalence of the general population.

Conclusion: Selecting ALRR-ALRR animals should not change the overall AS prevalence but fully ALRR-ALRR flocks submitted to tests based certification scheme risk to become AS positive.

Background

The concern that bovine spongiform encephalopathy (BSE), a zoonotic transmissible spongiform encephalopathy (TSE), may have entered the sheep and goat populations has prompted European countries to organise control and surveillance of TSE in small ruminants among which BSE cannot be distinguished clinically from scrapie.

In sheep, genetic susceptibility to classical scrapie (CS) is supported by polymorphic variations at specific codons (136, 154, 171) on the PRNP gene, which encodes the normal cellular protein prion (PrPC) [1]. The main alleles defined by these three codons can be classified by increasing risk as follow ARR<AHQ<ARQ ≈ ARH<VRQ. This knowledge permitted implementation of scrapie eradication programme at a large scale throughout Europe based on positive selection of the most resistant allele (ARR) and negative selection of the most susceptible allele (VRQ)[2].

The detection of an atypical form of scrapie (AS) challenged these programmes because animals genetically resistant to CS were affected [3-6]. However, whereas exposure to an infectious agent is necessary for CS development [7], AS could have a non infectious origin. Despite the fact that AS was experimentally transmitted to transgenic mice [8] and to sheep [9], a number of studies questioned AS infectious origin [4, 10-14]. This is supported by the old age of the cases, the location of the histological changes and the rarity of secondary cases in affected flocks [4, 12, 13].

Furthermore, most cases of atypical scrapie were found in animals with the PrP genotype showing low susceptibility to CS. Several studies have shown that AS susceptibility is associated with PrP codons 141 (L/F) and 154 (R/H) [15, 16]. Importantly, cases of ALRR carriers have been described but VRLQ carriers are rare.

A descriptive study found that in Europe AS had a similar prevalence, whatever the country or the tested population, of about 6 cases per 10,000 tests [12]. This could hide a relatively high prevalence of AS in the most susceptible genotypes. In addition, estimation of the prevalence in ALRR-ALRR animals is strategically important to estimate the impact of breeding programmes on the AS prevalence in the general population.

We have designed a case-control study to estimate the risk of AS associated to the PRNP alleles carriers and genotypes in the French sheep population and compare it with those of CS. In addition, we used our dataset to estimate the prevalence of AS per genotype and to estimate the risk for a fully CS resistant flock to be detected positive for AS under certain assumptions.

Methods

Cases and controls were recruited among the animals tested in France. Each year since 2002, a number of adult sheep from unknown TSE status flocks were randomly selected for TSE detection at abattoirs (healthy slaughter) or at rendering plants (fallen stock). Details concerning the French active surveillance programme are described in Cazeau [17]. Between 2002 and 2007, 859,157 samples were analysed within this programme, out of which 532,500 with the recommended tests for AS detection [18, 19].

Among these samples, 404 cases of AS and 395 cases of CS have been confirmed and the strain determined by the National reference laboratory of AFSSA Lyon [20]. The PRNP genotype at

codons 136, 141,154 and 171 has been determined only for a large part of these cases. DNA material was analysed for part at Labogena (Jouy en Josas, France) with a taqman probe method and for part at INRA (Jouy en Josas, France) by direct sequencing of the coding region of the PRNP gene.

In addition, during the TSE active surveillance programme 2002-2007, a subset of 3,347 animals was randomly selected for the genotyping of PRNP gene. We used those negative for TSE as controls. The genotyping of this control dataset was routinely conducted by Labogena at codons 136, 154 and 171 but AHQ and ARQ were not differentiated. The missing information on F141 and H171 in this control dataset was inferred using estimation of PrP alleles in the general French ovine population [21]. In fact, because no significant difference of PrP frequencies at codons 136 and 154 and 171 (H and Q merged) was observed between the present control dataset and the general French ovine population, we deemed these inferences possible at codons 141 and 171. Nevertheless, to take into account the uncertainty upon this estimation (external dataset and precision of estimation) the control dataset was bootstrapped 1000 times. Namely, any occurrence of ARQ allele was replaced by AFRQ, ALRH and ALRQ alleles according to beta-multinomial distributions with means and variances equalling those estimated from the external dataset.

We collected information on the stream of surveillance (healthy slaughter / fallen stock) and the dentition of the animals which is a poor proxy for age [22] but was the only information available. This led to further exclusions as information was occasionally missing.

For each type of scrapie we fitted multifactor logistic regression models to assess the risk, expressed in odds ratio (OR), associated to alleles and to genotypes with respectively ALRQ and ALRQ-ALRQ as references. This genotype was considered as reference because it is assumed to be the ancestral genotype. Because the HWE did not hold in the case populations we studied the effect of allele carriers instead of the risk associated to allele frequencies [23]. This method implies a dominant effect of the alleles but if it is not verified the bias is conservative which is the usual preferred way for biases. We adjusted the models on stream of surveillance, with the healthy slaughter stream as reference and on dentition, with the class corresponding to the youngest animals as reference. The values of the OR and their 95% confidence intervals for the 1,000 datasets were computed using Rubin method [24]. We could not obtain measurement of the effect associated with the genotypes in which no case was detected.

We estimated the prevalence of AS for each genotype; because the proportion of animals genotyped was different for cases and controls, we defined it as the national prevalence (404/532,500 for AS and 395/859,157 for CS) times the frequency of the genotype among cases, divided by the frequency of the genotype in the general population. Using a Bayesian approach, we considered that each of these proportions followed a beta distribution with mean and variance estimated by the observations. We derived the median and the 95% credibility interval of the prevalences based on 2000 iterations obtained after convergence. Genotype specific prevalences of CS in the general population would be misleading because only animals from infected flocks are exposed to the infectious agent, so we did not estimate them.

In addition, we considered the risk for a fully ALRR-ALRR flock to be detected positive for AS. We assumed that in any flock the individual risk of AS only depended on the genotype, the age and the stream of surveillance. Considering that the animals tested from a given flock had the

same distribution of age and stream of surveillance than the general population, the average individual risk for an ALRR-ALRR animal could be estimated by the prevalence previously estimated for this genotype. Since the occurrence of AS in a flock was defined as an independent event, the number of cases in a flock, X, followed a binomial distribution. The probability for at least one animal being AS positive among n animals tested was:

$$P(X \geq 1) = 1 - P(X = 0) = 1 - p^0.(1-p)^n = 1 - (1-p)^n \quad (1)$$

Using the previous methods to estimate the prevalence per genotype, we derived the median of the probability and its 95% credibility interval for n varying from 1 to 1000, based on 2000 iterations obtained after convergence.

All the statistical analyses were done in R for Windows [25] and Winbugs [26].

Results

After exclusion of missing information on genotypes and dentition, 248 AS cases, 245 CS cases and 3,317 controls were used for estimation of OR and prevalence (Tableau 28). None of the genotypes was spared by scrapie but not all were affected by both types of scrapie.

Within AS cases we have not detected ALRR-VLRQ, ALRQ-ALRH, ALRQ-VLRQ, and VLRQ-VLRQ genotypes. The OR associated to ALHQ-ALHQ, AFRQ-ALHQ and AFRQ-AFRQ were very high and were approximately ten times higher than the OR of ALHQ or AFRQ heterozygotes.

Within CS cases, the highest risk was for the VLRQ-VLRQ animals and their OR was approximately two times higher than the OR associated to AFRQ-VLRQ, ALRQ-VLRQ, and ALRH-VLRQ animals. Heterozygotes ALRR and in a lesser extent ALHQ were resistant to CS.

The average prevalence of AS for the most susceptible genotypes were more than 30 times higher than the prevalence for the general population (0.7‰ CI95%: 0.7-0.8) (Tableau 28)), and the lower limit of the credibility interval exceeded 1%. The average prevalence for ALRR-ALRR animals was not significantly different from the prevalence for the general population.

We found by multifactor logistic regression that the AFRQ and ALHQ carriers had the highest risk of AS. Indeed the ALRR carriers could be at higher risk than VLRQ carriers (Tableau 29). Whereas for CS cases, the VLRQ and AFRQ carriers had the highest risk and ALRR and ALHQ carriers the lowest one (Tableau 29).

There was no difference of risk of CS between AFRQ, ALRH and ALRQ carriers which supports pooling these alleles in one category. The animals tested at fallen stock were significantly more at risk for CS but not for AS and the oldest animals were more at risk for AS but not for CS.

The probability for a 100% ALRR-ALRR flock being classified positive for AS was not negligible as soon as 100 animals were tested (Figure 49). For instance, during a 10 year period, a flock with a constant size of 400 ALRR-ALRR ewes with an adult mortality rate of 5% and for which all fallen stock over 18 months would be tested would have more than a 10% chance of having at least one case of AS detected.

Discussion

This study is based on the sheep population submitted to active surveillance and we have considered the ancestral allele ALRQ as the reference. Under these assumptions, we detected a significant risk of AS for sheep carrying the ALRR-ALRR genotype and more generally sheep carrying the ALRR allele and a reduced risk for the VLRQ allele carriers. We also verified the

predominant risk of AS associated to carriers of the AFRQ and ALHQ alleles as previously described [13, 15, 21, 27].
We have ranked allelic susceptibilities for AS: VLRQ < ALRH ≈ ALRQ < ALRR < ALHQ ≈ AFRQ and for CS: ALRR < ALHQ < ALRH ≈ ALRQ ≈ AFRQ < VLRQ. These results are concordant with studies of AS from different countries [27-30].

The OR and prevalence of AS for AFRQ-AFRQ, AFRQ-ALHQ and ALHQ-ALHQ genotypes were strikingly high. Besides AFRQ-AFRQ and ALHQ-ALHQ homozygotes had a much higher risk than AFRQ-ALRQ and ALHQ-ALRQ heterozygotes which ruled out a dominant effect. Our prevalence estimation was congruent with a British study [31]. All these data underline that genotype is a very strong component for risk of AS along with age, unfortunately we missed data to estimate age-specific penetrance of the different alleles.

The maintenance of the polymorphism of the PRNP gene raises question. This could be explained by an absence of selection due to the late onset of clinical signs in the life of farm animals. Alternatively, it could be maintained by a balancing selection process (Slate, 2005; Woolhouse et al., 2001). The weak associations between PRNP alleles and the performance or health traits found so far [32] would hardly contribute to this selection. More likely explanations could be found in heterozygous advantage and/or frequency dependency. The frequency dependent selection is supported by the differences of genetic susceptibility associated to PRNP alleles towards the numerous strains of scrapie that prevail in the different subpopulations. This diversity includes AS and the many strains of CS [33]. There is also a possible advantage of heterozygous compared to homozygous individuals, specific to AS and suggested by the lower risk for AFRQ-ALHQ animals compared to ALHQ or AFRQ homozygous animals found in our study and in Great Britain (EFSA, 2006).

The susceptibility conferred by the ALRR allele questions the long term consequences of the breeding programme for CS resistance on AS prevalence in the sheep population. The AS prevalence estimated for the ALRR-ALRR subpopulation (0.6‰) was not significantly different from the current average national prevalence (0.7‰). Therefore increasing frequency of the ALRR allele in the general population should not result in an increase of the AS prevalence. Yet caution should be given to the fact that despite a low prevalence, the probability to detect a positive case in ALRR-ALRR is not negligible when the number of animals tested increases as shown by figure 1. Farms fully engaged in ALRR-ALRR selection tend to test more animals due to participation in a scrapie certification programme and face a real risk of being placed under restrictive measures because of the probability to detect AS in their flock. Therefore the legislator should take into account the risk of being in contradiction with the promoted selection strategy. Alternative breeding selection consisting of negative selection for AFRQ and ALHQ alleles is not relevant given the rarity of these alleles (5.4% for AFRQ and 2.9% for ALHQ in the French population (Moreno et al., 2007)),
The assumption of common risk of AS for farms is supported by the wide, homogenous distribution of the disease and similarities of prevalence per genotype in France and in Europe [12, 17, 31]. This was partly challenged by the existence of some factors, such as mineral feeding, modifying the detection or the occurrence of AS [10, 14]. However in a recent case-control study, the farm level risk factors were much less important than genetic factors [14]. Actually a number of studies argue for the hypothesis that AS could develop in the absence of exposure to an

infectious agent [4, 10-14, 34], even if a doubt persists given the limited knowledge on the physiopathology of AS.

Conclusion

Finally AS occurrence appears to be heavily dependant on the PRNP genotype, possibly modulated by some environmental risk factors which are to be further explored. Even if the open reading frame of the PRNP has a strong influence on the occurrence of AS it might not be the unique genetic factor of susceptibility. Other regions of the PRNP or other genes could be involved either independently or in synergy and this hypothesis is also worth to be investigated.

Authors' contributions

AF, PG, CD, DC and CM conceived the study, participated in its design and coordination. AF and CM performed the strategy of the selection of animals and carried out the statistical analysis. JNA performed the scrapie status confirmation and the strain determination. PL and KMG performed the polymorphism genotyping work by sequencing. AF, PG, CD, DC, CM, JNA and KMG helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgement

We thank the French Ministry of Agriculture (DGAl) for its financial and technical support. This work was financially supported by French funding (Groupement d'Intérêt Scientifique PRION and Agence nationale de la recherche).

References

1. Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD, Hunter N: **Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical Scrapie**. *Veterinary Record* 1998, **142**(23):623-625.
2. Palhière I, François D, Elsen J-M, Barillet F, Amigues Y, Perret G, Bouix J: A**llele frequencies of the prp gene in 29 french sheep breeds. possible use in selection for resistance to scrapie**. In: *7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production: August 19-23 2002; Montpellier, France*; 2002.
3. EFSA: **Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in Small Ruminants**. *The EFSA Journal* 2005, **276**:1-30.
4. Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schönheit J, Tranulis MA, Bratberg B: **Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type Nor98**. *The Veterinary Record* 2003, **153**:202-208.

5. EFSA: **Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards of the European Food Safety Authority on the Breeding programme for TSE resistance in sheep**. *The EFSA Journal* 2006, **382**:1-46.
6. Baylis M, McIntyre KM: **Transmissible spongiform encephalopathies: scrapie control under new strain**. *Nature* 2004, **432**(7019):810-811.
7. Detwiler LA, Baylis M: **The epidemiology of scrapie**. *Revue scientifique et technique de l'Office international des Epizooties* 2003, **22**(1):121-143.
8. Le Dur A, Beringue V, Andréoletti O, Reine F, Lai TL, Baron T, Bratberg B, Vilotte J-L, Sarradin P, Benestad SL *et al*: **A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005, **102**(44):16031-16036.
9. Simmons MM, Konold T, Simmons HA, Spencer YI, Lockey R, Spiropoulos J, Everitt S, Clifford D: **Experimental transmission of atypical scrapie to sheep**. *BMC Veterinary Research* 2007, **3**(1):20.
10. Hopp P, Omer MK, Heier BT: **A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks**. *Journal of General Virology* 2006, **87**(Pt 12):3729-3736.
11. Green DM, Del Rio Vilas VJ, Birch CP, Johnson J, Kiss IZ, McCarthy ND, Kao RR: **Demographic risk factors for classical and atypical scrapie in Great Britain**. *Journal of General Virology* 2007, **88**(Pt 12):3486-3492.
12. Fediaevsky A, Tongue SC, Nöremark M, Calavas D, Ru G, Hopp P: **A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries**. *BMC Veterinary Research* 2008, **4**:19.
13. Luhken G, Buschmann A, Brandt H, Eiden M, Groschup MH, Erhardt G: **Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases**. *Veterinary Research* 2007, **38**(1):65-80.
14. Fediaevsky A, Morignat E, Ducrot C, Calavas D: **A case-control study on the origin of atypical scrapie in sheep, France**. *Emerg Infect Dis* 2009, **15**(5):710-718.
15. Moum T, Olsaker I, Hopp P, Moldal T, Valheim M, Benestad SL: **Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases**. *Journal of General Virology* 2005, **86**(Pt 1):231-235.
16. Benestad SL, Arsac J-N, Goldmann W, Nöremark M: **Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology**. *Veterinary Research* 2008, **39**(4):19.
17. Cazeau G, Fediaevsky A, Calavas D: **Prévalence des formes classique et atypique de tremblante chez les petits ruminants en France entre 2002 et 2006**. *Revue de Médecine Véterinaire* 2008, **6**(159):348-356.
18. European Food Safety Autority: **Scientific Report of the European Food Safety Authority on the Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants**. *The EFSA Scientific Report* 2005, **31**:1-17.
19. European Food Safety Autority: **Scientific Report of the European Food Safety Authority on the Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants (2)**. *The EFSA Scientific Report* 2005, **49**:1-46.
20. Arsac JN, Andréoletti O, Bilheude JM, Lacroux C, Benestad S, Baron T: **Similar Biochemical Signatures and Prion Protein Genotypes in Atypical Scrapie and Nor98 Cases, France and Norway**. *Emerging Infectious Diseases* 2007, **13**(1):58-65.
21. Moreno CR, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Cazeau G, Andréoletti O, Chadi S, Elsen JM, Calavas D: **Which PrP haplotypes in a French sheep population are the most susceptible to atypical scrapie?** *Archives of virology* 2007, **152**(6):1229-1232.

22. Cocquyt G, Driessen B, Simoens P: **Variability in the eruption of the permanent incisor teeth in sheep**. *Veterinary Record* 2005, **157**(20):619-623.
23. Sasieni PD: **From genotypes to genes: doubling the sample size**. *Biometrics* 1997, **53**(4):1253-1261.
24. Roderick J. A. Little, Donald B. Rubin: **Statistical Analysis with Missing Data**, 2nd Edition edn. New York: Wiley; 1988.
25. R Development Core Team: **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** *R Found Stat Comput* 2008.
26. Lunn DJ, Thomas A, Best N, Spiegelhalter D: **WinBUGS - A Bayesian modelling framework: Concepts, structure, and extensibility**. *Statistics and Computing* 2000, **10**(4):325-337.
27. Saunders GC, Cawthraw S, Mountjoy SJ, Hope J, Windl O: **PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain**. *Journal of General Virology* 2006, **87**(Pt 11):3141-3149.
28. Baylis M, Chihota C, Stevenson E, Goldmann W, Smith A, Sivam K, Tongue S, Gravenor MB: **Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype**. *Journal of General Virology* 2004, **85**(Pt 9):2735-2740.
29. Dubois MA, Sabatier P, Durand B, Calavas D, Ducrot C, Chalvet-Monfray K: **Multiplicative genetic effects in scrapie disease susceptibility**. *C R Biol* 2002, **325**(5):565-570.
30. Tongue SC, Wilesmith JW, Nash J, Kossaibati M, Ryan J: **The importance of the PrP genotype in active surveillance for ovine scrapie**. *Epidemiology and infection* 2008, **136**(5):703-712.
31. McIntyre KM, Del Rio Vilas VJ, Gubbins S: **No temporal trends in the prevalence of atypical scrapie in British sheep, 2002-2006**. *BMC Veterinary Research* 2008, **4**(1):13.
32. Sweeney T, Hanrahan JP: **The evidence of associations between prion protein genotype and production, reproduction, and health traits in sheep**. *Veterinary Research* 2008, **39**(4):28.
33. Bruce ME: **TSE strain variation**. *Br Med Bull* 2003, **66**:99-108.
34. Simmons HA, Simmons MM, Spencer YI, Chaplin MJ, Povey G, Davis A, Ortiz-Pelaez A, Hunter N, Matthews D, Wrathall AE: **Atypical scrapie in sheep from a UK research flock which is free from classical scrapie**. *BMC Veterinary Research* 2009, **5**(1):8.

Tables

Tableau 28 : Sample sizes, estimated OR for AS and CS according to genotypes and covariates and their 95% confidence intervals (CI95%), estimates of prevalence of AS per genotype and 95% credibility intervals (ci 95%)

Genotype	No controls[4]	AS No cases	AS OR (CI 95%)	AS Prevalence ‰ (ci95%)	CS No cases	CS OR (CI 95%)
ALRR-ALRR	772	45	12.7 (2.9-55.1)[5]	0.6 (0.4 - 0.8)	0	NA[6]
ALRR-ALHQ	70	24	75.2 (16.6-340.6) [5]	3.6 (2.2 - 5.6)	0	NA[6]
ALRR-AFRQ	147.4	54	82.9 (13.6-506.5)[5]	3.8 (2.8 - 5.0)	0	NA[6]
ALRR-ALRQ	1003.4	10	2.2 (0.5-10.0)	0.1 (0.1 - 0.2)	2	0.0 (0.0-0.1)[5]
ALRR-ALRH	126.1	3	5.3 (0.6-46.4)	0.3 (0.1 - 0.7)	0	NA[6]
ALRR-VLRQ	188	0	NA[6]	0 (0.0 - 0.2)	16	0.5 (0.2-1.0)[7]
ALHQ-ALHQ	3	6	454.8 (61.2-3381.4)[5]	19.5 (5.6 - 75.1)	1	1.4 (0.1-15.7)
AFRQ-ALHQ	9.8	11	253.5 (29.0-2213.8)[5]	11.4 (5.1 - 27.5)	0	NA[6]
ALHQ-ALRQ	65.9	13	41.6 (9.0-192.2)[5]	2.1 (1.1 - 3.5)	1	0.1 (0.0-0.8)[7]
ALHQ-ALRH	8.4	2	54.1 (4.2-689.3) [7]	3.0 (0.6 - 10.0)	0	NA6
ALHQ-VLRQ	4	1	51.1 (3.7-709.0)[7]	3.6 (0.4 - 18.1)	2	2.0 (0.3-12.1)
AFRQ-AFRQ	11.6	28	724.3 (49.4-10625.1)[5]	23.6 (12.6 - 47.1)	2	1.5 (0.1-22.1)
AFRQ-ALRQ	126.4	43	76.9 (13.5-438.7)[5]	3.5 (2.4 - 4.7)	20	1.0 (0.3-3.2)
ALRQ-ALRQ	445.5	2	Reference	0.1 (0.01 - 0.2)	69	Reference
ALRQ-ALRH	106.7	0	NA[6]	0.1 (0 - 0.4)	8	0.5 (0.1-1.8)
AFRQ-ALRH	16.5	1	15.7 (0.7-335.4)	1.0 (0.1 - 3.6)	2	1.0 (0.1-12.2)
ALRH-ALRH	9.7	1	33.8 (1.1-1008.5) [7]	1.7 (0.3 - 6.6)	1	1.0 (0.0-24.6)
AFRQ-VLRQ	21.5	3	31.7 (3.4-293.4) [7]	1.7 (0.5 - 4.6)	6	1.7 (0.3-8.2)
ALRQ-VLRQ	147.1	0	NA[6]	0 (0 - 0.3)	85	3.6 (2.3-5.6)[5]
ALRH-VLRQ	18.4	1	12.7 (0.8-212.6)	0.9 (0.1 - 3.3)	9	3.2 (0.6-17.1)
VLRQ-VLRQ	16	0	NA[6]	0.4 (0 - 2.5)	21	7.8 (3.3-18.1)[5]
Healthy slaughter			Reference			Reference
Fallen stock			1.0 (0.7-1.3)			6.44 (4.43-9.37)[5]
2-4 DI			Reference			Reference
5-8 DI[8]			1.6 (0.4-6.5)			1.04 (0.43-2.49)
8 DI[9]			3.0 (0.8-11.4)			1.07 (0.46-2.50)

[4] Mean value for the 1,000 bootstraps

[5] p-value< 0.001

[6] Not available :,no case for that genotype

[7] p-value ≤0.05

[8] 5-8 definitive incisors : animals of 2 to 4 years old

[9] 8 definitive incisors : animals of 4 years old and more

Tableau 29 : Estimated OR for AS and CS according to allele carriers and covariates and their 95% confidence intervals (CI95%)

Genotype	No controls	AS		CS	
		No cases	OR (CI 95%)	No cases	OR (CI 95%)
ALRQ	1894	68	Reference	185	Reference
AFRQ	332	140	12.2 (4.7-32.0)[10]	30	1.0 (0.3-2.6)
ALHQ	161	57	9.7 (6.4-14.7)[5]	4	0.2 (0.1-0.7)[7]
ALRH	285	8	0.8 (0.2-2.8)	20	0.7 (0.2-2.3)
ALRR	2306	136	1.6 (1.2-2.3)[11]	18	0.1 (0.0-0.1)5
VLRQ	394	5	0.3 (0.1-0.9)[7]	139	3.5 (2.6-4.7)5
Healthy slaughter			Reference		Reference
Fallen stock			1.0 (0.8-1.2)		5.8 (4.4-7.7)5
2-4 DI			Reference		Reference
5-8 DI[12]			1.8 (0.6-5.1)		0.9 (0.5-1.6)
8 DI[13]			3.3 (1.1-9.2)[7]		0.9 (0.5-1.6)

[10] p-value< 0.001

[11] p-value ≤0.05

[12] 5-8 definitive incisors: animals of 2 to 4 years old

[13] 8 definitive incisors: animals of 4 years old and more

Figures

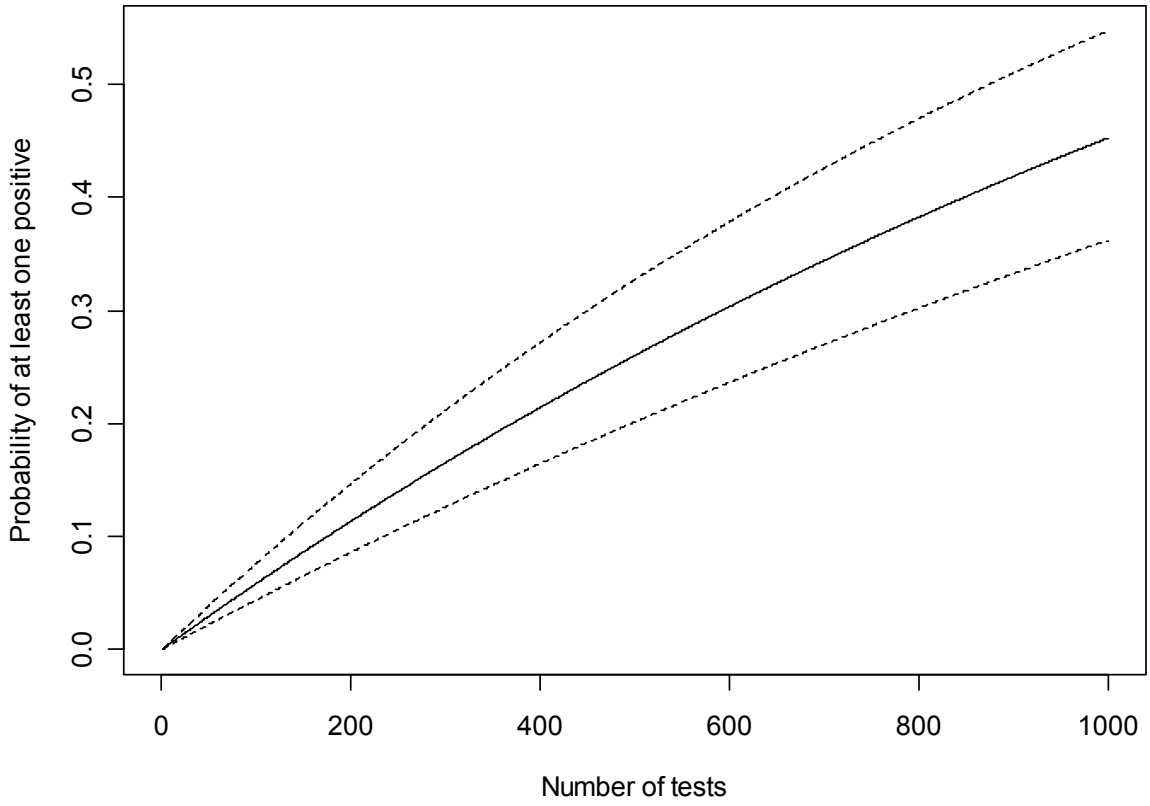


Figure 49: Probability for a 100% ALRR-ALRR flock to have at least one AS case detected according to the number of animals tested. Plain line: median of probability, dashed lines: 95% credibility interval of probabilty

Chapitre 4 : Etudes de l'agrégation des cas de tremblante atypique et de tremblante classique

4.1.Présentation des études

Les deux chapitres précédents ont contribué à montrer que la tremblante atypique était présente, mais rare, dans toutes les populations ovines, à un niveau pouvant varier faiblement en fonction de caractéristiques démographiques, notamment génétiques. Les facteurs de risque détectés n'évoquaient pas une origine infectieuse, ce qui nécessite d'être confirmé par d'autres approches.

L'objectif de cette partie est de rechercher des indices d'une contagiosité de la tremblante atypique. Une approche par modélisation comme en tremblante classique (Woolhouse, Stringer et al., 1998; Hagenaars, Donnelly et al., 2000 ; Kao, Gravenor et al., 2001 ; Touzeau, Chase-Topping et al., 2006; Kao, Green et al., 2007) n'était pas réalisable en raison des trop nombreuses incertitudes sur la maladie et sur les paramètres biologiques qui la caractérisent. En revanche, les études de cohortes sont bien adaptées, notamment si elles permettent d'intégrer des connaissances sur la filiation et la génétique des individus (Corbière, Barillet et al., 2007). Vu le faible niveau d'informations généralement disponibles en élevage ovin, il n'est pas possible de constituer des cohortes fiables de façon rétrospective. La meilleure solution serait alors de constituer des cohortes de façon prospective. Cependant, compte tenu de la rareté de la tremblante atypique et de l'âge élevé des cas, ces études imposent de suivre les individus pendant une longue période. De plus, étant donné le caractère réglementé de la tremblante atypique, la mise en place de cohortes implique de déroger au moins provisoirement à la réglementation, ce que n'a pas souhaité la DGAl. Une solution alternative consiste à chercher à mettre en évidence l'agrégation des cas au sein des troupeaux ou au niveau géographique en utilisant soit les données issues de la police sanitaire soit les données issues de la surveillance active. Cette agrégation n'est cependant pas forcément spécifique de la contagiosité et l'absence d'agrégation détectée ne signifie pas forcément qu'elle n'existe pas, notamment dans le temps.

L'agrégation de cas de tremblante atypique pourrait également traduire l'existence de facteurs de risques, démographiques ou environnementaux. La signification de tels agrégats, s'ils étaient détectés, devrait donc être discutée en fonction de leurs caractéristiques et des autres connaissances disponibles sur la tremblante atypique. L'étude de l'agrégation de la tremblante classique, dont l'origine infectieuse et la contagiosité sont établies, peut également servir de référence pour établir une comparaison et également explorer l'existence d'un lien épidémiologique entre les deux maladies.

La première approche (article 4) repose sur la distribution spatiale des cas index de tremblante atypique et de tremblante classique. Un article a été soumis le 25 mai 2009 à la revue *Epidemiology and Infection* en tant que *Original Article* et ce travail a été retenu pour une communication orale au congrès de l'ISVEE XII en août 2009 à Durban. Cette étude visait à rechercher des agrégats spatiaux compte tenu de la distribution de la population testée et à établir la répartition du risque de chacune des deux formes de tremblante. Nous avons utilisé les données

françaises de la surveillance active entre 2003 et 2007 pour analyser la distribution spatiale de la tremblante atypique et de la tremblante classique à une échelle allant de la commune à des hexagones de 40 km de large. Les agrégats spatiaux ont été recherchés par la méthode de scan par cercles de Kulldorff. La cartographie du risque lissé a été établie par des modèles hiérarchiques bayésiens autorégressifs. L'étude a montré que les distributions spatiales des deux maladies étaient différentes. Le risque relatif de la tremblante atypique était réparti de façon assez homogène sur l'ensemble du territoire, mise à part dans une zone de risque légèrement accru dans le sud de la France. En revanche, pour la tremblante classique, plusieurs zones présentaient un risque relatif accru ou au contraire réduit. Ces résultats montrent qu'il existe des différences dans la répartition des deux maladies et suggèrent que la tremblante atypique ne serait pas ou très peu contagieuse.

La deuxième approche comprend deux études (article 5 et article 6) et a porté sur la comparaison entre les prévalences de la tremblante atypique et de la tremblante classique estimées parmi les animaux issus des troupeaux soumis à la police sanitaire et celles estimées dans la population générale. Compte tenu de certaines réserves sur la qualité des données disponibles pour ces deux études, les hypothèses à tester et l'exploitation statistique des données sont restées simples.

L'article 5 est en cours de publication dans la revue *Veterinary Journal* en tant que *Short communication* et a été retenu pour une communication orale au congrès de l'ISVEE XII en août 2009 (associé à l'étude spatiale). L'étude a porté sur les foyers français de tremblante ovine. Nous avons comparé la prévalence des cas secondaires de tremblante atypique et de tremblante classique en provenance de 340 foyers de tremblante atypique et 296 foyers de tremblante classique. La prévalence de la tremblante atypique dans les foyers de tremblante atypique était de 0,46‰ chez les animaux soumis à l'abattage sanitaire et de 0,73‰ chez les animaux soumis à la surveillance renforcée, ces prévalences n'étaient pas différentes de celles détectées par la surveillance active ($p>0,5$). Les valeurs correspondantes pour la tremblante classique étaient beaucoup plus élevées (respectivement 36,72‰ et 2,53‰, $p<10^{-5}$). De plus, la distribution du nombre de cas de tremblante atypique dans les foyers était conforme à l'hypothèse d'une distribution binomiale du nombre de cas, qui implique que les cas sont des évenements aléatoires indépendants et équiprobables. Globalement, ces résultats suggèrent que la tremblante atypique pourrait être spontanée ou très peu contagieuse et que si les mesures de police sanitaire avaient pu contribuer au contrôle de la tremblante classique elles n'avaient en revanche pas été plus efficace que la surveillance active pour détecter des cas de tremblante atypique.

L'article 6 a été soumis le 20 avril 2009 à *BMC Veterinary Research* en tant que *Research article* et a été soumis pour une communication orale au congrès Neuroprion en septembre 2009, à Thessalonique. Le but de cette étude était d'étudier la survenue de cas secondaires dans les troupeaux atteints de tremblante atypique en s'appuyant sur les données de surveillance collectées en Europe. Des questionnaires ont été utilisés pour collecter, au niveau national, les résultats de la surveillance active et du dépistage de cas secondaires menés dans les troupeaux atteints auprès de 12 pays européens. La prévalence moyenne de la tremblante atypique était de six cas pour 10 000 tests à l'abattoir et de huit cas pour 10 000 à l'équarrissage. En utilisant une approche multicentrique pour 11 des 12 pays ayant participé, nous avons trouvé que la probabilité de détecter des cas secondaires de tremblante atypique dans les troupeaux positifs était similaire à la

probabilité observée parmi les animaux abattus pour la consommation humaine (odds ratio, OR=1,07, IC95%: 0,70-1,63) ou trouvés morts (OR=0,78, IC95%: 0,51-1,2). La probabilité de détecter des cas secondaires de tremblante classique dans les troupeaux atteints de tremblante classique était plus élevée que la probabilité de détecter des cas secondaires de tremblante atypique dans les troupeaux atteints de tremblante atypique (OR=32,4, IC95%: 20,7-50,7). Ces résultats suggèrent donc également que la tremblante atypique n'est pas contagieuse en conditions naturelles, ou très peu en comparaison à la tremblante classique. De plus, cette étude a souligné l'importance de collecter les données de façon standardisée afin de mieux valoriser les analyses conduites par les pays européens dans leurs efforts de lutte contre la tremblante classique et la tremblante atypique.

Les aspects méthodologiques de l'article 4 et de l'article 5 n'ont pas pu être présentés en détails dans les articles en raison des contraintes de taille, ils sont donc présentés en amont des articles. Les résultats et la discussion sont, par contre, présentés uniquement dans les articles.

4.2. Matériel et méthodes de l'étude de la distribution spatiale de la tremblante atypique et de la tremblante classique ovine en France (article 4)

4.2.1. Objectifs

L'objectif de cette étude était d'explorer la distribution spatiale des cas de tremblante atypique et de la comparer à celle des cas de tremblante classique afin de détecter les zones à risque et de discuter la possible contagiosité de la tremblante atypique et/ou la présence de certains facteurs de risque.
Plus précisément, nous nous sommes intéressés à la détection d'agrégats spatiaux compte tenu de la distribution de la population à risque et nous avons cartographié le risque relatif lissé des deux formes de maladie en tenant compte des paramètres démographiques disponibles.

4.2.2. Sources de données disponibles

Données sur les cas et la population

Les données sur les cas et la population provenaient des programmes de surveillance active de la tremblante menés de 2003 à 2007. L'année 2002 a été exclue en raison de l'inclusion de nombreux tests de police sanitaire dans la surveillance à l'équarrissage. Seuls les cas index ont été inclus. Tous les tests de dépistage effectués sur des animaux provenant de troupeaux placés sous mesures de contrôle et postérieurs à la détection du cas index ont été écartés.

Le choix de prendre comme dénominateur les animaux testés a permis d'étudier la distribution des cas malgré les biais possibles du programme de surveillance et notamment l'hétérogénéité spatiale du taux de sondage, accentuée pour la tremblante atypique par la répartition des tests *ad hoc.* Cela a également permis, dans une certaine mesure de prendre en compte, des paramètres ayant influencé la détection des cas par la surveillance active. Par ailleurs, la distribution de la population ovine en France était mal connue au moment où l'étude a été mise en place.

Un jeu de données différent a été constitué pour chacune des deux formes de tremblante. Pour la tremblante atypique, seuls les animaux dépistés avec un des tests BioRad ou Idexx ont été comptés. Pour la tremblante classique, en revanche, tous les tests ont été pris en compte.

Données démographiques

Les enregistrements pour lesquels les données sur la dentition, le type de plan de surveillance et l'immatriculation étaient manquantes ou erronées ont été exclus, ce qui représentait environ 20% des données.

Par ailleurs, en effectuant un recoupement entre les numéros de cheptel et les données compilées des recensements des petits ruminants de 2005 à 2007, il a été possible de déterminer le type de production du cheptel d'origine des animaux, laitier ou allaitant et mixte pour 83% des enregistrements.

Nous avons vérifié que les prévalences de tremblante atypique et classique restaient inchangées du fait des différents niveaux d'exclusion. Les prévalences étaient les mêmes que celles décrites dans le chapitre 2 (Prévalence, p. 85). Concernant le type de production qui n'avait pas été étudié dans

la partie sur la surveillance active, faute d'information disponible, nous avons détecté une prévalence supérieure parmi les animaux issus de troupeaux laitiers en tremblante atypique (OR=1,31, $IC_{95\%}$ = 0,99 – 1,71) et en tremblante classique (OR=1,66, $IC_{95\%}$ 1,26 – 2,20).

Nous n'avions pas de données utilisables sur les races ou la structure génétique des populations testées.

Pour chaque animal, les données disponibles étaient l'année de dépistage (2003 à 2007), le canal de surveillance (abattoir ou équarrissage), le statut (positif ou négatif), la dentition (2 à 4 ID, 4 à 8 ID, 8 ID), le type de production (laitier ou autre) et le cheptel d'origine.

Données géographiques

Les différentes couches de données géographiques administratives (communes, cantons, départements) provenaient de l'Institut géographique national (www.ign.fr) et ont été manipulées avec le logiciel ArcMap 9.1 (http://www.esri.com).

Les animaux ont été localisés au moyen de leur numéro d'immatriculation. Pour les animaux nés avant la réforme de l'identification ovine (juillet 2005), les huit premiers caractères du numéro d'immatriculation correspondent au numéro de cheptel de l'exploitation où l'animal a été immatriculé. Pour les animaux nés après la réforme de l'identification ovine, la correspondance entre le numéro d'immatriculation et le numéro de cheptel a été établie à l'aide du registre des indicatifs de marquage détenu par la DGAl. Dans tous les cas, les cinq premiers caractères du numéro de cheptel correspondaient au code INSEE de la commune du siège social de l'exploitation.

Les animaux ont été localisés au niveau du centroïde de la commune du cheptel dont ils portaient l'immatriculation. Sur les 36 222 communes françaises, au moins un test avait été réalisé dans 24 981 communes mais les données étaient très dispersées puisque le nombre d'animaux testés était inférieur à cinq dans 40% des communes.

4.2.3. Analyse statistique

Nous avons considéré deux techniques d'analyse adaptées aux données géographiques groupées.

Recherche de clusters

Nous avons basé notre recherche d'agrégats sur la méthode des scans de Kulldorff.
Selon cette méthode, l'hypothèse nulle est qu'il n'y a pas d'agrégats, la probabilité de trouver un cas est la même dans toute la zone étudiée. L'hypothèse alternative est qu'il y a au moins un agrégat dans lequel la probabilité de trouver un cas est supérieure (ou inférieure) à la moyenne nationale.
Le test propose de rechercher l'agrégat le moins conforme à l'hypothèse nulle. Pour cela, en chaque point du système étudié, en l'occurrence des communes, un nombre de cas théoriquement attendu est calculé en considérant que sous l'hypothèse nulle, le nombre de cas en un point donné dépend uniquement de l'effectif de la population et d'une loi de probabilité.
Le test permet l'utilisation de la loi binomiale ou d'une loi de Poisson dont la moyenne correspond à la prévalence globale de la maladie sur l'ensemble du territoire étudié. Nous avons choisi une distribution binomiale car les conditions d'approximation par la loi de Poisson n'étaient pas satisfaisantes compte tenu du faible nombre d'animaux testés par commune.

Le test consiste à créer ensuite des cercles concentriques, qui représentent des agrégats potentiels. Les cercles sont centrés sur les communes où des animaux ont été testés et leur rayon varie entre la distance des deux points les plus proches et une taille telle que le cercle contienne 10% de la population à risque. L'hypothèse alternative inclut donc un très grand nombre de clusters potentiels variant par la taille et la localisation.
Chaque agrégat est caractérisé par une fonction de vraisemblance, qui s'écrit dans le cas de la distribution binomiale :

$$\left(\frac{c}{n}\right)^{c}\left(\frac{n-c}{n}\right)^{n-c}\left(\frac{C-c}{N-n}\right)^{C-c}\left(\frac{(N-n)-(C-c)}{N-n}\right)^{(N-n)-(C-c)}$$

Où C est le nombre total de cas, c est le nombre de cas observés dans le cercle, n est le nombre d'animaux testés dans le cercle et N est le nombre total d'animaux testés.
L'agrégat qui s'éloigne le plus de l'hypothèse nulle est celui dont la vraisemblance est maximale (Kulldorff, 1997). Afin d'évaluer la significativité de cet agrégat, les localisations des cas observés sont permutées aléatoirement un grand nombre de fois (n=999), les vraisemblances sont recalculées pour chaque jeu de permutation et la vraisemblance de l'agrégat le plus probable, observée initialement, est comparée à la distribution de l'ensemble des vraisemblances maximales obtenues par permutation. La vraisemblance et la significativité des agrégats secondaires et de ceux présentant moins de cas qu'attendus sont également évaluées.

Il existe d'autres méthodes, notamment le test de Tango et le test de Besag et Newell. Cependant, la méthode des scans présente plusieurs avantages :

- elle permet de prendre en compte l'hétérogénéité spatiale de la population testée ;
- elle permet d'utiliser différentes lois de distribution pour les cas : distribution de Poisson ou binomiale ;
- elle permet de détecter des agrégats sans a priori sur leur taille ou le nombre de cas inclus, et les agrégats contenant moins de cas qu'attendus théoriquement ;
- elle permet de tester spécifiquement les agrégats détectés et fournit un niveau de significativité pour chacun d'entre eux.

De plus, la mise en œuvre de cette méthode est facilitée par la disponibilité d'un logiciel gratuit, Statscan (Kulldorff, 1997). Le principal inconvénient est que la puissance diminue lorsqu'il y a de nombreux agrégats ou lorsque ceux-ci présentent une forme non circulaire, par exemple le long d'une frontière naturelle comme un cours d'eau (Martin, Toshiro et al., 2003).

Les agrégats ont été recherchés de la même façon pour la tremblante atypique et la tremblante classique. La plus petite unité géographique disponible a été choisie, à savoir les communes, ce qui nous permettait d'être plus précis dans la définition des agrégats.

Cartographie du risque relatif

Afin de cartographier le risque spatial de tremblante atypique et de tremblante classique, nous avons considéré le risque relatif.

Etant donné la grande dispersion des données agrégées par commune et la très grande hétérogénéité du nombre de tests par commune, nous avons regroupé les unités géographiques. Contrairement à la recherche d'agrégats, nous n'avions pas intérêt à nous rapprocher d'un

processus ponctuel. Nous avons choisi un regroupement minimisant l'a priori géographique et basé sur un maillage régulier d'hexagones. L'avantage de l'hexagone par rapport au carré est de présenter des relations de voisinage simples et régulières entre unités adjacentes. La taille des hexagones a été fixée à 40km de large (rayon de 23 km), ce qui constituait un compromis entre la perte de précision géographique et l'augmentation du nombre de cas par unité géographique. Le maillage d'hexagones a été créé automatiquement à l'aide du logiciel ArcMap et les animaux ont été attribués aux hexagones en fonction du recouvrement des centroïdes des communes dans lesquelles ils étaient localisés. Les hexagones ne contenant aucun animal testé ont été éliminés, 441 hexagones ont été conservés pour l'étude de la tremblante atypique et 442 pour l'étude de la tremblante classique (Figure 50 et Figure 51).

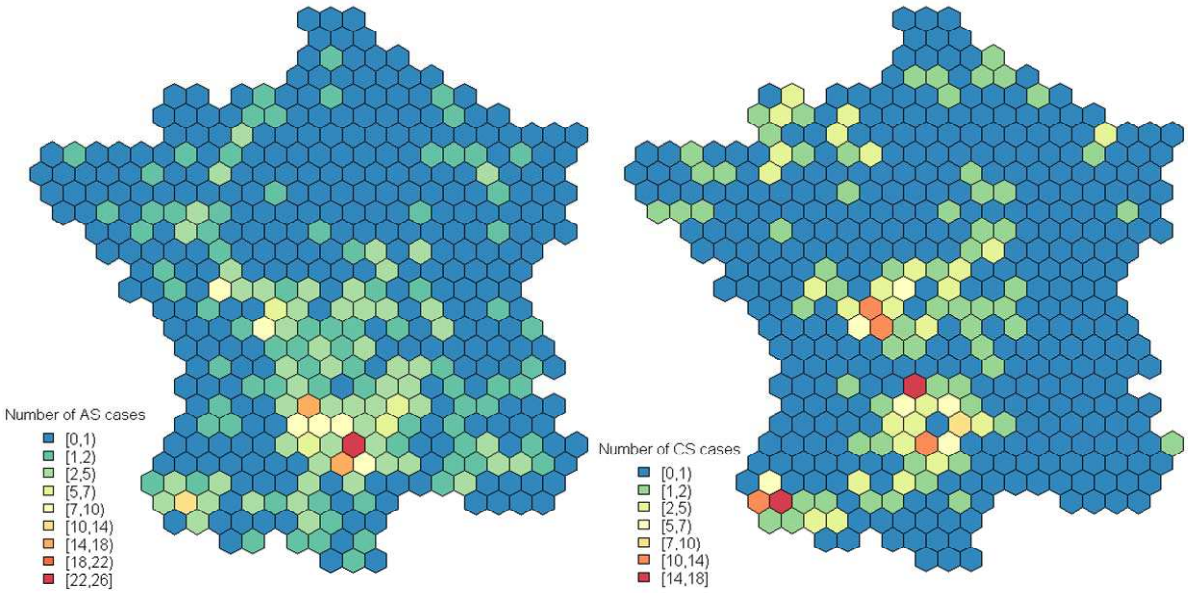


Figure 50 : Nombre de cas de tremblante atypique (à gauche) et de tremblante classique (à droite) par unité géographique

Number of AS cases : nombre de cas de tremblante atypique, Number of CS cases : nombre de cas de tremblante classique – pour la période 2003 - 2007

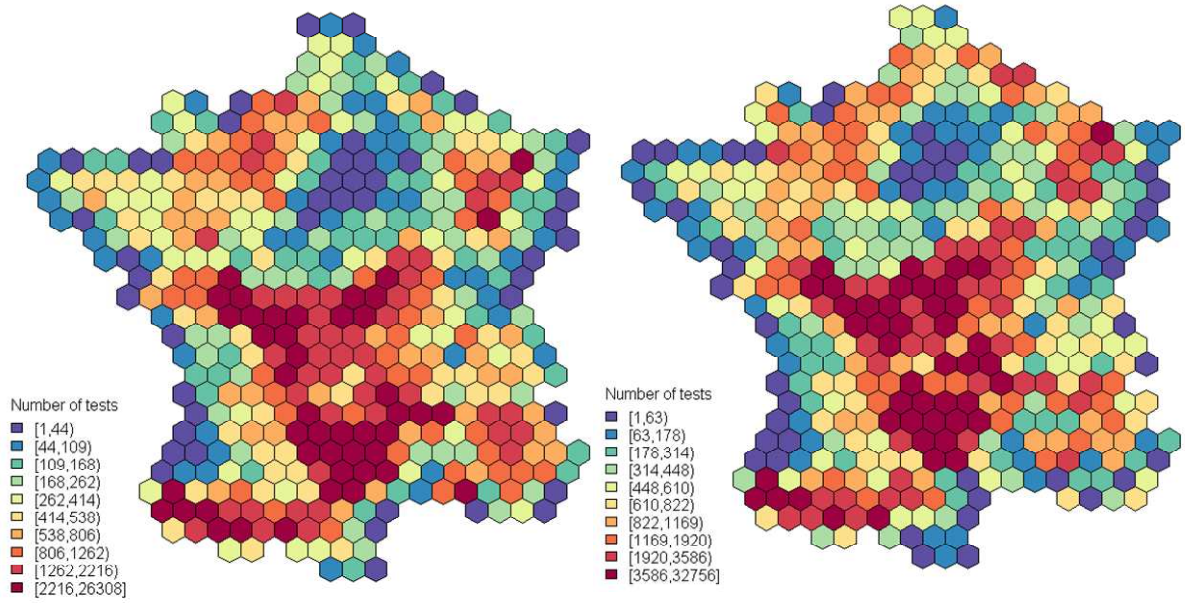


Figure 51 : Nombre de tests pour la détection de la tremblante atypique (à gauche) et de la tremblante classique (à droite) par unité géographique

Number of tests : nombre de tests – pour la période 2003 - 2007

Pour chaque zone géographique *i*, le risque relatif RR_i s'exprime en utilisant les mêmes notations que précédemment :

$$RR_i = \frac{c/n}{C/N}$$

Ce risque relatif brut est difficile à interpréter en raison des fluctuations d'échantillonnage (Figure 52), c'est la raison pour laquelle un lissage est mis en œuvre.

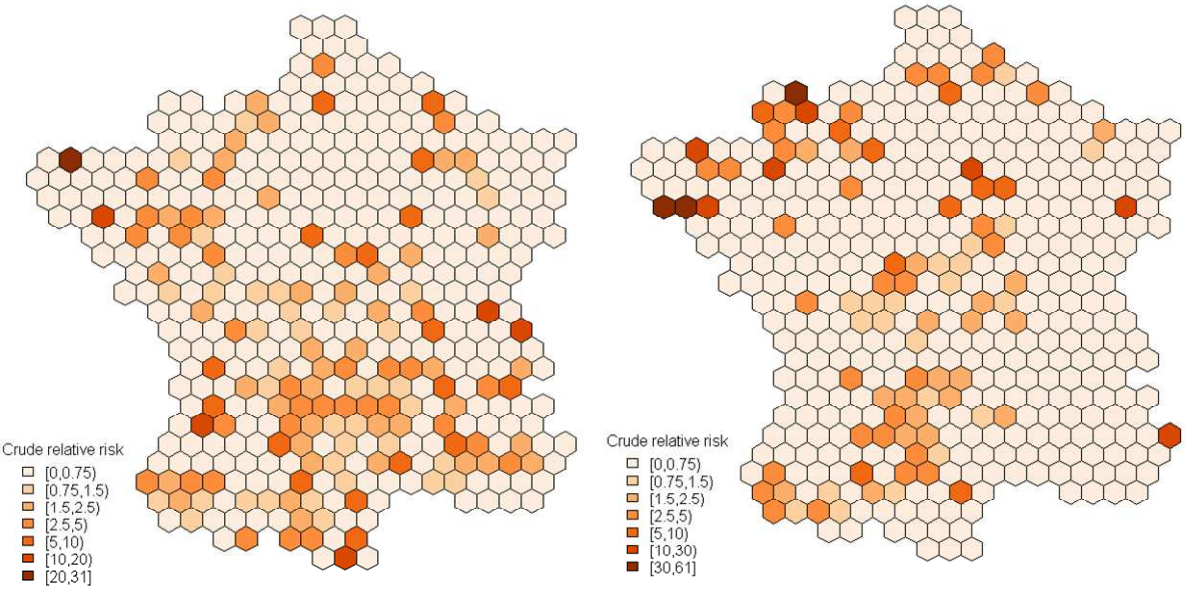


Figure 52: Risque relatif brut de tremblante atypique (à gauche) et de tremblante classique (à droite) par unité géographique

Crude relative risk : risque relatif brut – pour la période 2003 - 2007

Différentes méthodes de lissage existent dont les méthodes par kernel, les modèles autorégressifs bayésiens ou par effet aléatoire (Cressie, 1993).
Nous avons utilisé la méthode par modèle bayésien hiérarchique autorégressif car elle permettait de nombreuses paramétrisations et il était possible de s'appuyer sur l'expérience déjà acquise au sein de l'unité d'épidémiologie animale de l'INRA de Clermont-Theix (Abrial, Calavas et al., 2005b ; Abrial, Calavas et al., 2005a; Paul, Abrial et al., 2007).

Cette méthode suppose que le nombre de cas dans chaque unité géographique suive une loi de probabilité. Compte tenu du regroupement des animaux par hexagone, nous avons fait l'hypothèse que le nombre de cas suivait une distribution de Poisson. Nous avons vérifié l'adéquation de cette distribution pour les deux formes de tremblante en évaluant la surdispersion ou la sous-dispersion obtenues. Pour cela, nous avons effectué, pour chaque maladie, une régression de Poisson du nombre de cas en fonction du nombre d'animaux testés par unité, sans tenir compte des relations spatiales entre les unités, et nous avons vérifié que le rapport de la déviance résiduelle et du nombre de degrés de liberté était proche de un.

Le nombre, y_i, de cas par unité géographique *i*, s'écrit alors :

$$y_i \sim P(\lambda_i) = e^{-\lambda_i} \frac{\lambda_i^{y_i}}{y_i!} \text{ with } \lambda_i = e_i . r_i$$

Où λ_i représente le paramètre de la loi de Poisson, r_i représente le risque relatif dans l'unité i, e_i le nombre de cas attendus dans l'unité *i*. On décompose r_i en une composante spatiale, u_i, et une composante non spatiale, v_i, qualifiée de « bruit blanc » et qui regroupe les variations extra–poissonniennes (Besag, York et al., 1991).

$$\ln \lambda_i = \ln e_i + u_i + v_i$$

$$u_i \sim N(\overline{u}_{\partial i}, \tau_{u_i})$$

$$v_i \sim N(0, \tau_v)$$

La composante spatiale suit une loi normale autorégressive, de moyenne $\overline{u}_{\partial i}$ dépendant de la valeur *∂i* des unités adjacentes de l'unité *i* (voisinage d'ordre un) et de variance τ_{u_i} (Richardson, 1995). Le bruit blanc a une moyenne nulle et une variance τ_v .
Les variances de u_i et de v_i sont des hyper paramètres dont on assume qu'ils suivent des lois Gamma de paramètres 0,5 et 0,005.

L'expression la plus simple du nombre de cas attendus par unité est le produit de la prévalence globale par l'effectif dans l'unité. Ce nombre de cas attendus peut être standardisé afin de prendre en compte des paramètres dont on connaît l'influence et qui présentent un niveau de variation spatiale. Nous avons donc pris en compte les paramètres influençant les résultats de la surveillance active afin d'observer au mieux la composante spatiale du risque relatif lié à la distribution de la maladie et non pas à celle de sa détection. Les variables intégrées ont été l'année de détection (*year* de 2003 à 2007), le canal de détection (*stream* HS et FS), l'âge des animaux (via la dentition en trois classes) et le type de production (*dairy* ou *non dairy*) :

$$e_i = \sum_{year=2003}^{2007} \sum_{stream=HS}^{FS} \sum_{dentition=1}^{3} \sum_{production=Dairy}^{Nondairy} p_{year,stream,dentition,production} \cdot N_{year,stream,dentition,production}$$

L'hétérogénéité spatiale des variables dentition et plan de surveillance a été considérée de façon descriptive au moyen de cartes et de variogrammes (Figure 53 et Figure 54).

Le choix de standardiser plutôt que d'ajuster a pour inconvénient de ne plus observer l'effet des variables de standardisation. Cependant, celles-ci avaient été étudiées indépendamment et la prise en compte des variables sous forme d'ajustement aurait été moins satisfaisante puisque l'on aurait dû calculer une variable synthétique, basée sur le pourcentage d'animaux réalisant telle ou telle modalité, ce qui n'aboutit pas au même niveau d'information.

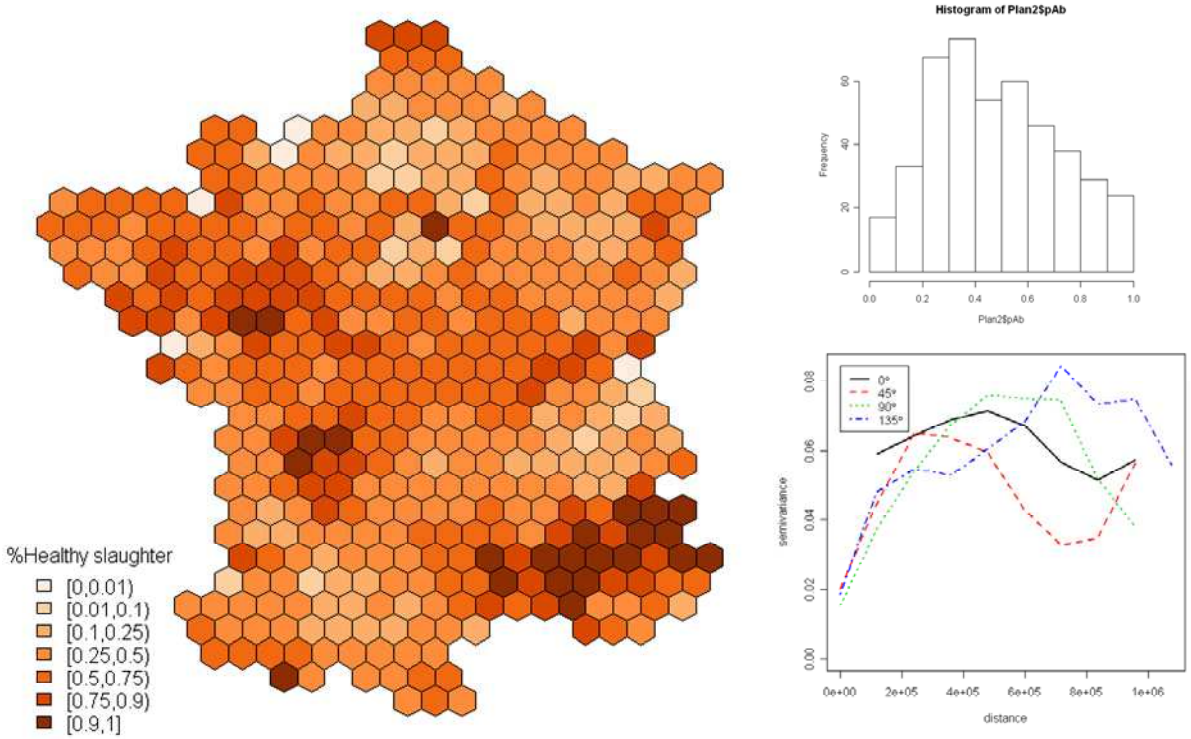


Figure 53 : Hétérogénéité géographique de l'importance relative de la surveillance à l'abattoir entre 2003 et 2007

La carte représente la proportion d'animaux testés à l'abattoir parmi tous les animaux testés pour chaque unité géographique (% Healthy slaughter). L'histogramme en haut à droite représente le la distribution de ce pourcentage pour l'ensemble des unités et le variogramme en bas à droite montre une mesure de la variabilité de ce pourcentage en fonction de la distance séparant les unités suivant quatre directions définies par une rotation de 45° dans le plan.

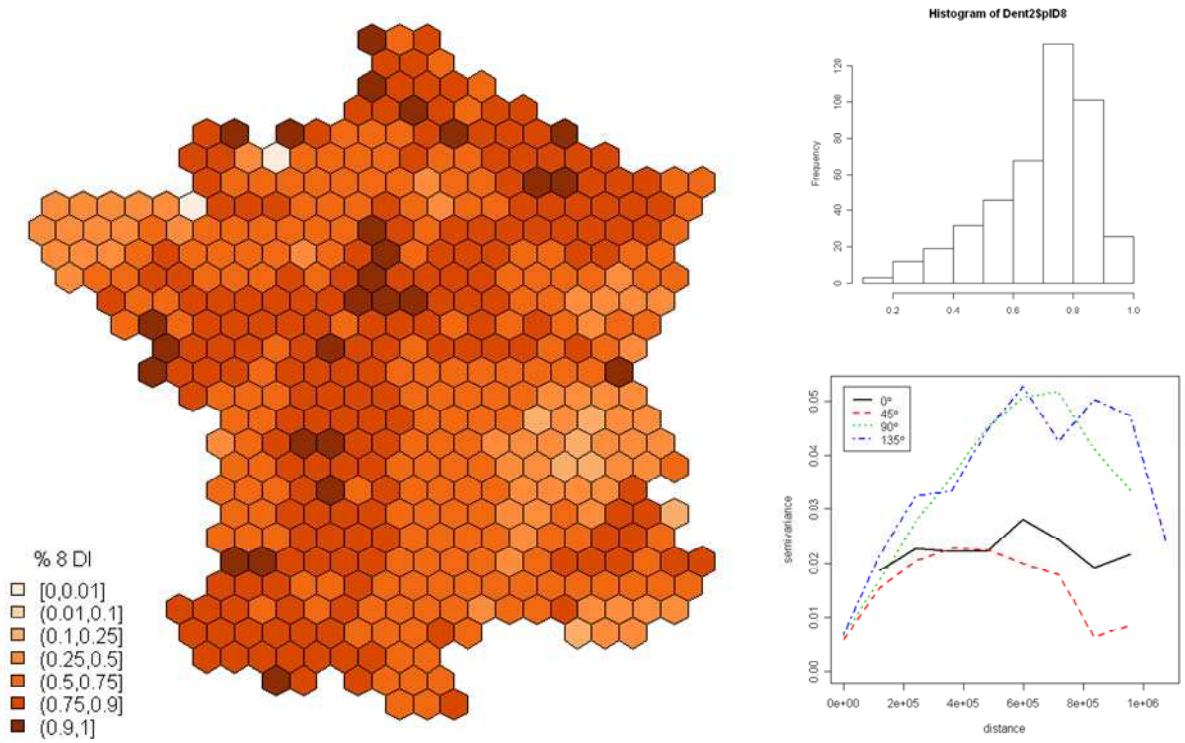


Figure 54 : Hétérogénéité géographique de l'importance relative de la classe d'âge la plus avancée (8 DI) entre 2003 et 2007

La carte représente la proportion d'animaux testés correspondant à la classe d'âge 8ID pour chaque unité géographique (% DI). L'histogramme en haut à droite représente le la distribution de ce pourcentage pour l'ensemble des unités et le variogramme en bas à droite montre une mesure de la variabilité de ce pourcentage en fonction de la distance séparant les unités suivant quatre directions définies par une rotation de 45° dans le plan.

L'ajustement du modèle n'est pas fait pas méthode analytique mais repose sur des méthodes par simulation de Monte Carlo par chaînes de Markov implémentées dans le logiciel WinBUGS1.4 qui se base sur une méthode d'échantillonnage de Gibbs adaptée de l'algorithme de Metropolis (Gilks, Richardson et al., 1996). Environ 400 000 itérations ont été nécessaires à l'obtention de la convergence du modèle. La convergence a été vérifiée à partir de chaînes de 5 000 itérations échantillonnées toutes les trois itérations afin d'éviter les autocorrélations à l'aide du test de Heidelberger-Welch (Heidelberger and Welch, 1983). Ces chaînes de 5000 itérations obtenues après convergence du modèle ont également servi à établir la distribution du risque relatif de chaque unité géographique.

Les rôles respectifs du bruit blanc gaussien et de la composante spatiale ont été évalués en comparant les Deviance Information Criteria (DIC), dont l'interprétation est semblable au critère de Akaike, des modèles avec et sans ces termes (Spiegelhalter, 2002). L'absence de différence de DIC entre le modèle avec et sans v_i a conduit à ne pas conserver le bruit blanc.

La valeur médiane du risque relatif de chaque unité a été représenté graphiquement sur une carte et les unités pour lesquelles 95% des itérations différaient de un ont été signalées par un surlignage en noir.

4.3. Article 4 : Distribution spatiale de la tremblante atypique et de la tremblante classique ovines en France

Exploring the geographic pattern of atypical and classical scrapie in French sheep reveals contrasts

Authors: A. Fediaevsky[1,2], D. Abrial[1], D. Calavas[2], C. Ducrot[1,*]

[1] INRA, Centre de Clermont-Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France

[2] AFSSA-Lyon, 31 Avenue Tony Garnier, 69364 Lyon Cedex 07, France

Author for correspondence and request for reprints:

A. Fediaevsky, Centre de Clermont-Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France,

Email : afediaevsky@clermont.inra.fr

Summary

The recently discovered atypical scrapie (AS) exhibits phenotypic and epidemiological differences from classical scrapie (CS) but whether AS is contagious or not remains an issue. So far the comparative distribution of the two diseases has only been considered at country or region levels. We used the French active surveillance data from 2003 to 2007 to analyse the spatial distribution of AS and CS at a medium resolution level. This included the use of cluster analysis and Bayesian conditional autoregressive regression hierarchical models. The two diseases presented different spatial distribution patterns. The spatial relative risk of AS was diffuse across the whole country except in one area of moderately increased risk. In contrast, several areas with a high or low relative risk of CS were identified. These results demonstrate that there are differences in the epidemiological pattern of AS and CS and imply that AS may not be contagious.

Introduction

Scrapie is a transmissible spongiform encephalopathy (TSE) of sheep and goats that has been recognised since, at least, the eighteen century (1). The disease is transmissible and tissue infectivity is associated with the presence of a specific prion protein (PrP^{Sc}) that is an isomer of a normal cellular prion protein (PrP^{C}) (2). In sheep polymorphism of the prion protein gene (prnp) coding for the PrP^{C} influences the host susceptibility to scrapie (3). We focused our study on sheep because scrapie is much rarer in goats than in sheep and because the two species are too different to be merged.

In its classical form, scrapie (CS) is a contagious disease that transmits mostly from ewes to lambs through infectious placenta (4) or milk (5, 6). Other infectious tissues have been described or suspected and could contribute to transmission (7). This rare disease principally spreads between flocks through introduction of infected animals (7) or even contaminated environment (8). However, some feed contamination could have occurred before the meat and bone meal ban for ruminant feed (9) or possibly through feed recycling of milk product from infected ewes (6).

The motivation for the introduction of large TSE surveillance and control programmes at the turn of the XX^{th} century was the threat that bovine spongiform encephalopathy (BSE), a fatal zonoosis, prevailed in sheep and goat populations and was masked by scrapie (10, 11).

Since then, an atypical form of scrapie (AS) has been described in Norway (12). It was later recognised in most European countries through active surveillance, with an average prevalence of six cases per ten thousand animals tested (13). This form of scrapie exhibits clear phenotypic differences from CS and BSE in small ruminants (14) with respect to the location of the brain lesions; the biochemical properties of the associated PrP^{Sc}, the age of cases and the genetic susceptibility (13, 15). AS is experimentally transmissible to sheep (16) but there are doubts about whether AS is contagious in natural conditions (12, 15, 17-19).

If AS has an infectious origin, one would expect that the risk of disease would not be homogenous because the chances of transmission of the disease would increase with the relationship between animals, such as family, flock, locality, which are not randomly spatially distributed. On the other hand, the presence of a spatial pattern in the distribution of AS should be discussed in the light of possible demographic variations (age, genetics, stream of surveillance (abattoir or fallen stock), presence of environmental (sensu lato) risk factors or the contagiousness of the disease. A case-control study in France identified that sheep from dairy flocks were more at risk of AS than sheep from meat flocks (19). However it was difficult to clarify if these effects were genuinely associated to the measured exposure or if they resulted from unconsidered confounding factors. Such potential confounding factors could possibly be linked to the geographical distribution and/or genetic susceptibility of populations, although complementary analyses did not detect confounding effects.

During the 1970's clinical cases of scrapie were detected throughout France and in virtually every region where sheep were raised (20). Such studies were, however, based on clinical report, ignored the underlying population and took place before the distinction between AS and CS. The active surveillance programme has provided a means to consider the geographical pattern of scrapie in France and to investigate if AS and CS could be spatially linked.

The primary objective of this study was to detect if the spatial distribution of AS was random and, if not, to examine how the risk was spatially distributed taking into account aspects of the surveillance programme that might have an influence. The secondary objective was to describe the spatial distribution of CS and to compare it to the distribution of AS.

Methods

After a description of the dataset, the two types of analyses used, cluster analyses and Bayesian spatial autoregressive models are described. Database management was done with MySQL7.0, management of geographic objects was done with ArcMap 9.1 (http://www.esri.com) and statistical analyses were performed with R 2.6.1 (21), WinBUGS 1.4.3 (http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml) and SaTScan 7.0 (22) with a significant threshold for all p-values of 0.05.

We used the results of the TSE active surveillance in mainland France for the period 2003 to 2007. The organisation of the surveillance programme was described in (23). Briefly, surveillance consisted of sampling of the brainstem of adult sheep that were randomly selected at slaughterhouses (healthy slaughter: HS) or at rendering plants (fallen stock: FS). The samples were screened for TSEs using rapid diagnostic tests. Animals were aged and classified according to their dentition. Following the discovery of a TSE positive case, the animals from the flock(s) of origin of the case were subjected to TSE control measures and were excluded from active surveillance, so they were not included in our data. Some of the rapid diagnostic tests validated for use in the active surveillance programme were not recommended for the detection of AS in brainstem samples (24, 25). To study the spatial distribution of AS we only considered the analyses performed with a rapid test recommended by the European Food Safety Agency for the detection of AS in brainstem samples (24, 25). To study the distribution of CS we considered all the rapid tests, so we had a separate dataset for each disease.

The epidemiological unit was the animal. The cases were only the index cases (first case ever detected in a flock) that have been confirmed and classified as AS or CS by the animal TSE national reference laboratory (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Lyon).

In the first part of the analysis, we excluded doubtful and samples not analysed due to poor conservation state or inappropriate tissue sampled, analyses with incorrect identification number and analyses on animals with missing information on dentition. In the second part of the analysis, we merged our dataset with the sheep annual census surveys to identify animals from dairy flocks. Since some farms did not answer the census, further records were excluded. We checked that the prevalence rates were not statistically different because of the exclusion of records at the different steps of the analysis.

The animals were located by their identification number. This indicated the municipality of origin. The number of positive and negative results were summed by municipality. Sixty-nine percent of the 36,222 French municipalities (15 square km on average) had at least one animal tested. The coordinates of the centroids of the municipalities were available from the Institut National Géographique (www.ign.fr, France).

We searched for spatial clusters using the Kulldorff scan statistic (22) at the municipality level. We assumed a binomial distribution of the cases and looked for high and low risk clusters. We

restricted the size of circles to include, at the most, 10% of the population tested. Estimation of the likelihood of the circles was based on 999 simulations and only clusters with a p-value lower than 5% were selected.

We used a hierarchical Bayesian model to map the relative risk of each disease using the same model as that presented by Abrial (26). This technique provides a smoothed relative risk by taking into account the spatial structure of the geographical units through a spatial prior named Conditional Autoregressive (CAR) component based on Gaussian distributions (27). The number of cases y_i in each geographical unit $_i$, was assumed to follow a Poisson distribution with parameter λ_i (mean of cases) defined as the product of the expected number of cases e_i and the local relative risk r_i. The relative risk, r_i, represented the variation of the risk of disease in each geographical unit compared to a baseline risk evaluated for mainland France. It was composed of a spatial CAR prior u_i based on the spatial contiguities between geographical units which followed a normal distribution with parameters $\overline{u}_{\partial i}$, mean of the spatial components in the set ∂i of geographical units adjacent to geographical unit i (neighbouring) and variance τ_{u_i}.

In order to take into account the influencing parameters of the surveillance, we standardised the expected number of cases using the inter strata prevalence rates so the total number of expected cases equated the total number of observed cases:

$$e_i = \sum_{year=2003}^{2007} \sum_{stream=HS}^{FS} \sum_{dentition=1}^{3} \sum_{production=Dairy}^{Nondairy} p_{year,stream,dentition,production} \cdot N_{year,stream,dentition,production} \qquad (2)$$

Where $p_{year, stream, dentition, production}$ and $N_{year, stream, dentition, production}$ were respectively the prevalence rate and the number of animals tested in the strata defined by each year from 2003 to 2007, each stream of surveillance (HS and FS), each category of dentition (two to four definitive incisors, five to seven definitive incisors and eight definitive incisors) and each category of production (dairy production only or not).

The data were aggregated in larger geographical units because there were less than five animals tested in 40% of the municipalities,. A grid of hexagonal cells of 40km wide was created to cover mainland France. The hexagonal shape was chosen because of the even neighbourhood relationship of this figure compared with squares. The size of the cells was a trade-off between the minimisation of geographical units with denominator zero and spatial scale of the disease, on average each cell included 80 municipalities. The number of cases and tests of AS and CS from all the municipalities with centroids included in the same cell were summed. Because not all the tests accounted for AS detection, there were 441 cells for AS and 442 cells for CS.

Hierarchical models were fitted by Markov chain Monte Carlo method based on Gibbs sampling (28). We ran 400,000 iterations and we sampled the parameter simulations for the last 5,000 Markov chains with a thin of three, the convergence was checked graphically and tested using the Heidelberger-Welch convergence diagnostic (29).

The relative risks were displayed using chloropleth maps. Categories were defined by classes of same amplitudes. The units with 95% credible intervals not including one were outlined.

Results

A simplified map of France is displayed in Figure 55. For the cluster analysis there were 359 cases of AS from 648,879 tests and 257 cases of CS from 1,108,817 tests (Tableau 30). The cases appeared

widespread in France and were concentrated in zones with a higher number of tests (Figure 56 and Figure 57). We detected high and low risk clusters for AS (Figure 56) and for CS (Figure 57), which ruled out a random spatial distribution (Tableau 30). All the clusters were significant with p-values lower than 0.01. The cluster 3 of AS was the only cluster of increased risk of AS with a relative risk (RR) of 3.3. It was located to the north and west of the Aveyron department, which is the main dairy sheep production area in France. It overlapped a smaller cluster of CS (cluster 8) with a RR of 6.5. Cluster 9 was a small cluster of CS with a RR of 7.3 that was located in the Pyrénées Atlantique department, which is the second main dairy sheep production area in France. Cluster 4 of CS was located in the Manche department and was associated with a high RR of 10.5.

The low risk clusters (1, 2 for AS and 5, 6 for CS) overlapped and were located in the Poitou, which is an area of intensive meat sheep production.

The low risk cluster 7 of CS covered the large region of Alpes-Provence-Côte d'Azur (PACA) where there are extensive sheep grazing systems.

For the Bayesian CAR model, there were 302 cases of AS out of 416,724 tests and 224 cases of CS out of 647,384 tests available. The RR of AS presented small variations only (Figure 58). A zone associated with a higher RR was located from west of Aveyron department to the south of the PACA region, with exclusion of the Aveyron department, and matched cluster 3. There was also a small area of risk in the Pyrénées-Atlantiques department and an area of moderately reduced risk in North East France. The magnitude of variation of the relative risk was limited since the RR ranged from 0.25 to 0.75 in 9 cells, from 0.75 to 1.25 in 392 cells, from 1.25 to 1.75 in 39 cells and from 1.75 to 2.25 in only one cell. Only five cells had more than 95% of simulated RR higher than one.

In contrast with AS, CS presented with important geographical variations throughout the country (Figure 59). There were several areas of higher risk. These were in similar locations to those areas detected in the cluster analysis. They occurred in the North West region from Bretagne to Manche, in the Pyrénées-Atlantiques, in the Lot, in the North East and in the Central region. There was a large zone of low risk in the East to South-East. The RR varied. They ranged from 0.25 to 0.75 in 121 cells, from 0.75 to 1.25 in 213 cells, from 1.25 to 1.75 in 57 cells, from 1.75 to 2.25 in 19 cells, from 2.25 to 2.75 in eight cells, from 2.75 to 3.25 in 17 cells and from 3.25 to 3.85 in seven cells. There were 28 cells that had more than 95% of simulated RR higher than one and one cell had a RR with more than 95% of simulations below one.

Discussion

Whereas at a first glance AS and CS appeared widespread in France and predominantly in sheep production areas, spatial analysis revealed important differences in the distribution pattern of these two diseases. Taking into account the tested population, AS and CS were not randomly distributed and low and high risk clusters were detected for both diseases. After standardisation by demographic risk factors, the spatial structure of the RR of AS was weak and only a large zone appeared slightly more at risk.

By comparison, the distribution of CS presented three main areas with high RR and one area of low RR. The contrast between the spatial distribution of the RR of AS and CS has two implications. First, the differences in the location, number and size of the risk areas suggest that

the two diseases might not have the same determinants. Second, the low RR of AS compared with CS suggests that AS had weaker spatial determinants than CS and was more evenly distributed.

These results are in line with the study by Green et al. (30) who found that the incidence of AS was not statistically significantly different in the six main regions of Great Britain. This is also supported by the prevalence found across European countries, which was similar for AS but not for CS (13).

Before further discussing the origin of the spatial patterns, some important related aspects of the design should be considered: the possible underestimation of the RR, the uncertainty of the location of the animals linked with the animal identification and the age of animals.

Geographical selection biases in the active surveillance programmes are likely, because submission of animals to rendering plant (low in PACA region) and to healthy slaughter (animals possibly younger in Poitou) are not homogenous (13, 23). To overcome that difficulty we standardised the population on major factors of influence of the surveillance system, although we are aware that no methodological technique will correct perfectly for any biases. Because secondary cases of positive flocks were not included, there is a possible under-estimation of the RR compared with the general population. The bias is probably substantial for CS but probably minor for AS, given the rarity of secondary cases in positive flocks (unpublished observations)(15). If we carried out the analysis at the flock level, the bias would have been less important but we could not have standardised the tested population on major factors as we did. Finally, the prevalences of AS and CS are possibly underestimated because of the lack of sensitivity of the method of analysis. This should not affect the RR since standardised sampling and laboratory analysis were implemented throughout the country.

The animals were located by their identification number, which usually corresponded to the flock of birth; because of animal trade, some animals could have been allocated to a flock different from the flock where they stayed most of their life. Based on the identification number of animals inventoried in positive flocks, we estimated that in AS positive flocks, an average of 15% of the animals were tagged with an identification number from another flock and 25% in CS positive flocks. However for AS and CS, respectively 64% and 61% of the animals came from a flock located at less than 40km and 88% and 85% came from a flock located at less than 120km. It indicates that trade mostly occurs in the same vicinity and it supports the assumption that hexagons of 40km are an appropriate unit to study the geographical distribution of scrapie in mainland France.

For CS, it is generally considered that contamination occurs during the first months of life (31, 32). Although lateral transmission between adults is possible it is not usually considered as an epidemiologically significant pathway (7). In addition sheep are usually not sold for breeding before six months of age. Thus it is better to locate the animals at their flock of birth rather than at the flock from where they were tested. We can reasonably assume that this source of error had a negligible effect.

The situation for AS is less clear since the origin of the disease and the period of incubation in natural conditions are unknown. Three scenarios can be considered. The first scenario is that AS has an infectious origin: if so, infection would be more likely to occur early in life and with a

period of incubation was longer than that of CS. The argument for this is that if the incubation period of AS were comparable to CS, we should observe younger cases of AS unless the susceptibility to the disease and /or exposure increases with age, which is not in line with current knowledge on prion diseases (recently discussed in 33). The second scenario is that AS is spontaneous and mainly genetically determined: in this case there is no period of exposure to account for. The third scenario is that AS has an endogenous origin with some genetic influence but also with potential environmental components (19). The effects of such exposure could be cumulative, or not. If it was cumulative, the global exposure history of the animals should be considered. This would be extremely difficult even if the exact nature of the exposure was known. In this last situation, between flock movements could lead to underestimation of the relative risks of AS because of misclassification of about 15% of the animals at the flock level and 5% at the cell level. If adverse hypothetical exposures were linked to some agricultural conditions, the effect of the bias would be tempered by the fact that most movements occur within the same vicinity where agricultural conditions can be expected to be homogenous. Overall we consider that the impact of these different biases on our result was limited.

With these considerations in mind, the origin of these different distribution patterns can be discussed. Because it naturally transmits, the most important source of spread of CS between flocks would definitely be animal trade (7, 30). Purchase of infected animals between neighbouring flocks should be a major component of local increased risk, resulting in areas with high RR. One could also speculate that distant trades could contribute to the wider spread of disease and the emergence of the far CS outbreaks. For AS, trade networks and the purchase of animals have not been found to be risk factors (18, 19, 30), which indicates that the disease is not or very little contagious. If the observed distribution of the disease was due to natural transmission, the means and rate of transmission would be particularly homogenous and inefficient, compared with CS, since AS is present in most areas at similar low levels.

Feeding proprietary concentrates was found to be a significant risk factor for scrapie in a case control study. This was interpreted as being due to an exposure to meat and bone meal (MBM) contaminated with TSE infectious agent (9). However the epidemiological link is difficult to establish since the exposure should have stopped with the ban on the use of MBM in ruminant feed in 1994, which was reinforced by the total MBM feed ban in 2000. It is interesting to notice that two regions with high RR for CS, Bretagne and South West, were the regions with the highest risk of BSE in cattle born after 1996, indicating possible MBM exposure through cross species feed contamination (26). If there was an association between a recent risk of CS (animals born after 2000) and an historical feed exposure it would imply the maintenance of the disease after the past feed exposure. This is possible through natural transmission but it would be very difficult to document. It is likely that if a feed exposure existed for CS it existed also for AS, although it could have been lower due to limited infectious material in AS cases compared with CS cases. In addition, the oral transmission of AS in sheep has not yet been documented. Such exposure would not explain cases born after 2000 unless the disease was maintained via natural transmission. In addition, feed contamination has appeared an unlikely factor in two case-control studies carried out so far (18, 19). The different locations of the risk areas for AS and CS does not indicate that they have common risk factors.

In the two case control studies both a positive (18) and a negative (19) association between AS and the feeding of vitamin and mineral intakes was detected. Beyond the divergence in the direction

of the association, it suggests that minerals could influence the occurrence of AS. The exposure to minerals through feeding, water, or soil composition have been considered as a possible risk factor in the epidemiology of scrapie (34-36) but associations are often unclear. This may be due to methodological difficulties.

In France, dairy sheep production farms were at risk compared to non dairy farms (19). One explanation could be a confounding effect of the genetic risk of sheep dairy breed found in mainland France, however, this bias was explored and not found not to be significant. The area of increased RR of AS intersected but did not exactly match the dairy production areas, which suggests that, if a genuine risk factor existed, it was not specific to dairy farming.

Among the important demographic variables that we could not take into account was the genetics. The geographic distribution of the sheep breeds and the different crossbreeds that make up the general French sheep population is not known precisely; some breeds are geographically located and some are widespread. This makes it difficult to adjust for breed in the analysis (37). We were not able, therefore, to quantify the role of the genetics in the spatial variation of the risk of CS and AS.

In this study, CS presented important clusters in contrast to AS. The geographical distribution of AS suggested a non-contagious disease and the absence of a link between AS and CS. Some areas presented a moderate increased risk of AS and would be worth further investigation. This would be difficult to conduct given the rarity of the disease.

Acknowledgment

We thank the French ministry of agriculture for its technical and financial support (DGAl). We thank Dr Petter Hopp and Dr Rene Ecochard for their participation in the steering committee of this project. We thank Séverine Bord, Myriam Garrido and Patrick Gasqui for their methodological advice. We thank Dr Sue Tongue for her kind assistance in editing the manuscript.

References

(1) Comber T, Morborne H. A letter to Dr Hunter, physician in York, concerning the rickets in sheep. In: Real Improvements in Agriculture, Letters to Reade Peacock. London, 1772: 73-83.

(2) Prusiner SB. Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. Science 1982; 216: 136-44.

(3) Hunter N, Hope J, McConnel I, Dickinson A. Linkage of the Scrapie-associated Fibril Protein (PrP) Gene and Sinc Using Congenic Mice and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. Journal of General Virology 1987; 68: 2711-6.

(4) Race R, Jenny A, Sutton D. Scrapie Infectivity and Proteinase K-Resistant Prion Protein in Sheep Placenta, Brain, Spleen, and Lymph Node: Implications for Transmission and Antemortem Diagnosis. The Journal of Infectious Diseases 1998; 178(4): 949-53.

(5) Konold T, Moore SJ, Bellworthy SJ, Simmons HA. Evidence of scrapie transmission via milk. BMC veterinary research 2008; 4(1): 14.

(6) Lacroux C, Simon S, Benestad SL, et al. Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. PLoS pathogens 2008; 4(12): e1000238.

(7) Detwiler LA, Baylis M. The epidemiology of scrapie. Revue scientifique et technique de l'Office international des épizooties, 2003; 22(1): 121-43.

(8) Georgsson G, Sigurdarson S, Brown P. Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years. Journal of General Virology 2006; 87(Pt 12): 3737-40.

(9) Philippe S, Ducrot C, Roy P, Remontet L, Jarrige N, Calavas D. Sheep Feed and Scrapie, France. Emerging Infectious Diseases 2005; 11(8): 1274-9.

(10) European Commission. Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. In. Official Journal of European Communities, 2001: 1-40.

(11) Baylis M, Houston F, Kao RR, McLean AR, Hunter N, Gravenor MB. BSE - a wolf in sheep's clothing? Trends in Microbiology 2002; 10(12): 563-70.

(12) Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schönheit J, Tranulis MA, Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type Nor98. The Veterinary Record 2003; 153: 202-8.

(13) Fediaevsky A, Tongue SC, Nöremark M, Calavas D, Ru G, Hopp P. A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. BMC veterinary research 2008; 4: 19.

(14) EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in Small Ruminants. The EFSA Journal 2005; 276: 1-30.

(15) Benestad SL, Arsac J-N, Goldmann W, Nöremark M. Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. Veterinary Research 2008; 39(4): 19.

(16) Simmons MM, Konold T, Simmons HA, et al. Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. BMC veterinary research 2007; 3(1): 20.

(17) Simmons HA, Simmons MM, Spencer YI, et al. Atypical scrapie in sheep from a UK research flock which is free from classical scrapie. BMC veterinary research 2009; 5(1): 8.

(18) Hopp P, Omer MK, Heier BT. A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. Journal of General Virology 2006; 87(Pt 12): 3729-36.

(19) Fediaevsky A, Morignat E, Ducrot C, Calavas D. A case-control study on the origin of atypical scrapie in sheep, France. Emerg Infect Dis 2009; 15(5): 710-8.

(20) Chatelain J, Cathala F, Brown P, Raharison S, Court L, Gajdusek DC. Epidemiologic comparisons between Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie in France during the 12-year period 1968-1979. Journal of the Neurological Sciences 1981; 51: 329-37.

(21) R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing 2008.

(22) Kulldorff M. A spatial scan statistic. Theory and Methods 1997; 26(6): 1481-96.

(23) Cazeau G, Fediaevsky A, Calavas D. Prévalence des formes classique et atypique de tremblante chez les petits ruminants en France entre 2002 et 2006. Revue de Médecine Véterinaire 2008; 6(159): 348-56.

(24) European Food Safety Autority. Scientific Report of the European Food Safety Authority on the Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants. The EFSA Scientific Report 2005; 31: 1-17.

(25) European Food Safety Autority. Scientific Report of the European Food Safety Authority on the Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants (2). The EFSA Scientific Report 2005; 49: 1-46.

(26) Abrial D, Calavas D, Jarrige N, Ducrot C. Spatial heterogeneity of the risk of BSE in France following the ban of meat and bone meal in cattle feed. Preventive Veterinary Medicine 2005; 67(1): 69-82.

(27) Clayton D, Kaldor J. Empirical Bayes Estimates of Age-standardized Relative Risks for use in disease Mapping. Biometrics 1987; 43: 671-81.

(28) Mollié A. Bayesian and Empirical Bayes Approaches to Disease Mapping. In: Lawson AB, Biggeri A, Böhning D, Lesaffre E, Viel J-F, Bertollini R, eds. Disease Mapping and Risk Assessment for Public Health: John Wiley & Sons Ltd, 1999: 15 -29.

(29) Heidelberger P, Welch PD. Simulation run length control in the presence of an initial transient. Operations Research 1983; 31: 1109-44.

(30) Green DM, Del Rio Vilas VJ, Birch CP, et al. Demographic risk factors for classical and atypical scrapie in Great Britain. Journal of General Virology 2007; 88(Pt 12): 3486-92.

(31) van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. Pathogenesis of natural scrapie in sheep. Archives of virology 2000(16): 57-71.

(32) Andréoletti O, Berthon P, Marc D, et al. Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. The Journal of general virology 2000; 81(Pt 12): 3115-26.

(33) St Rose SG, Hunter N, Matthews L, et al. Comparative evidence for a link between Peyer's patch development and susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies. BMC infectious diseases 2006; 6: 5.

(34) Imrie CE, Korre A, Munoz-Melendez G. Spatial correlation between the prevalence of transmissible spongiform diseases and British soil geochemistry. Environmental Geochemistry and Health 2008.

(35) Chihota CM, Gravenor MB, Baylis M. Investigation of trace elements in soil as risk factors in the epidemiology of scrapie. The Veterinary Record 2004; 154(26): 809-13.

(36) Gudmundsdóttir KB, Sigurdarson S, Kristinsson J, Eiríksson T, Jóhannesson T. Iron and iron/manganese ratio in forage from Icelandic sheep farms: relation to scrapie. Acta Veterinaria Scandinavica 2006; 48(1): 16.

(37) Babo D. Races ovines et caprines françaises. Tours: Editions France Agricole, 2000: 302.

Tables

Tableau 30 : Characteristics of the AS and CS clusters and of baseline population detected by active surveillance programme between 2003 and 2007 in mainland France. Relative risk (RR) is estimated as the ratio of the number of observed cases by the number of expected cases.

Scrapie	Level	No cases observed	No cases expected	No tests	Relative risk	p-value	Radius (km)
AS	Baseline	359		648879	-	-	
	cluster 1	0	14.68	26729	0.0	0.003	51
	cluster 2	5	31.29	62302	0.2	0.001	64
	cluster 3	46	14.08	25485	3.3	0.001	56
CS	Baseline	257		1108817	-	-	0
	cluster 4	21	2.36	12574	8.9	0.001	118
	cluster 5	0	15.32	89909	0.0	0.001	68
	cluster 6	0	16.46	88406	0.0	0.001	63
	cluster 7	0	17.89	87378	0.0	0.002	321
	cluster 8	26	3.83	18373	6.8	0.001	26
	cluster 9	29	3.65	15746	7.9	0.001	31

Figures

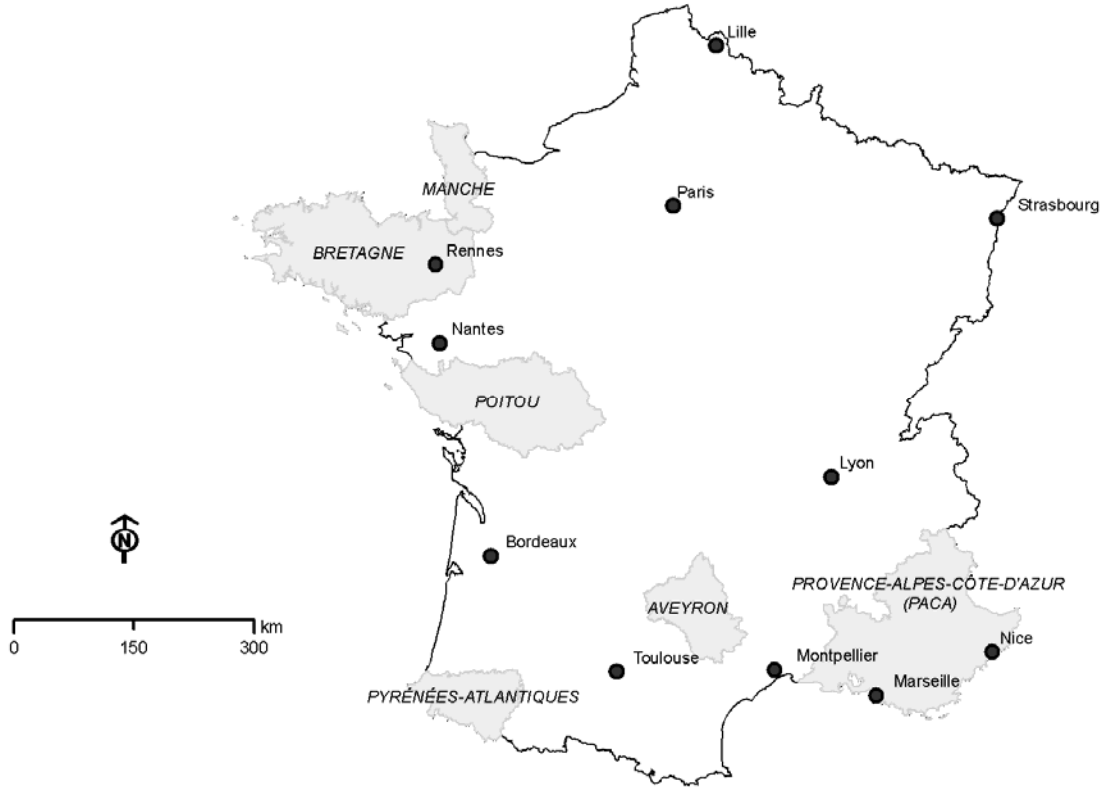


Figure 55: Map of France displaying the main areas referred to in the text and the main cities

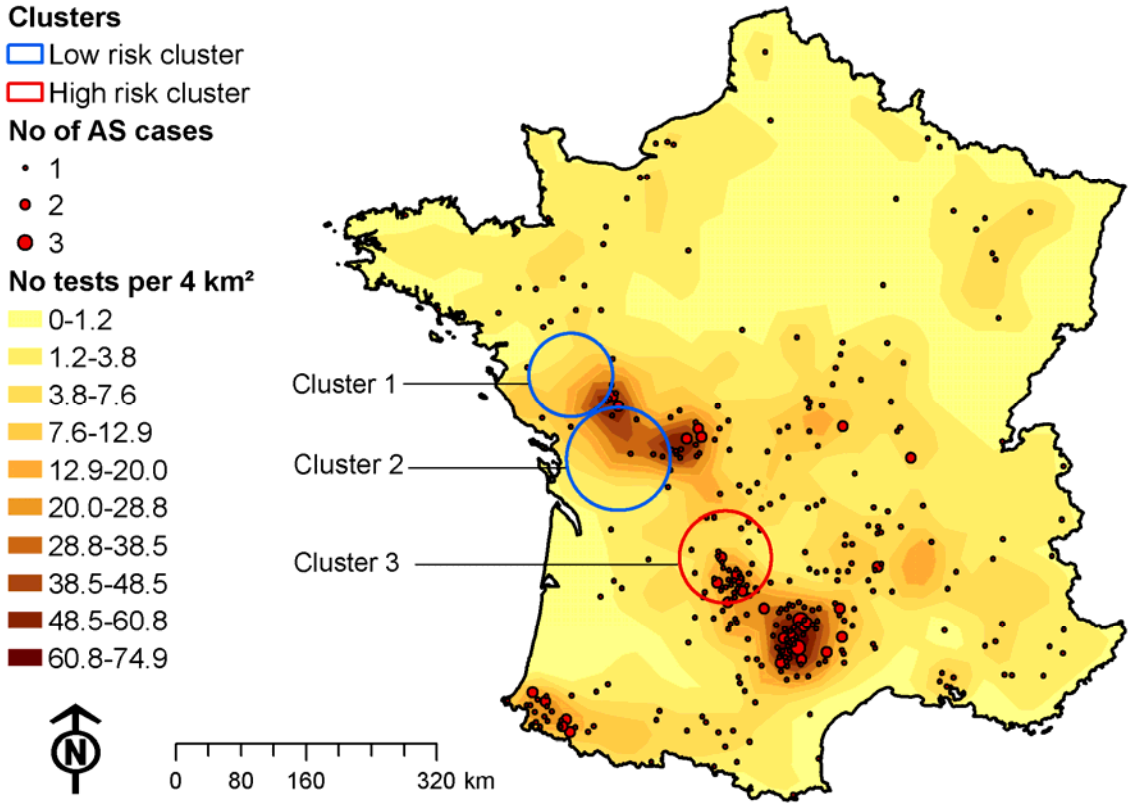


Figure 56: Distribution of AS cases, density of tests for AS in number per grid of 2x2km and significant clusters of AS (all p-values<0.01) detected by active surveillance programme between 2003 and 2007 in mainland France.

The distribution of animals tested was smoothed by kernel density function with a bandwidth of 20km and a grid of 2x2 square-km.

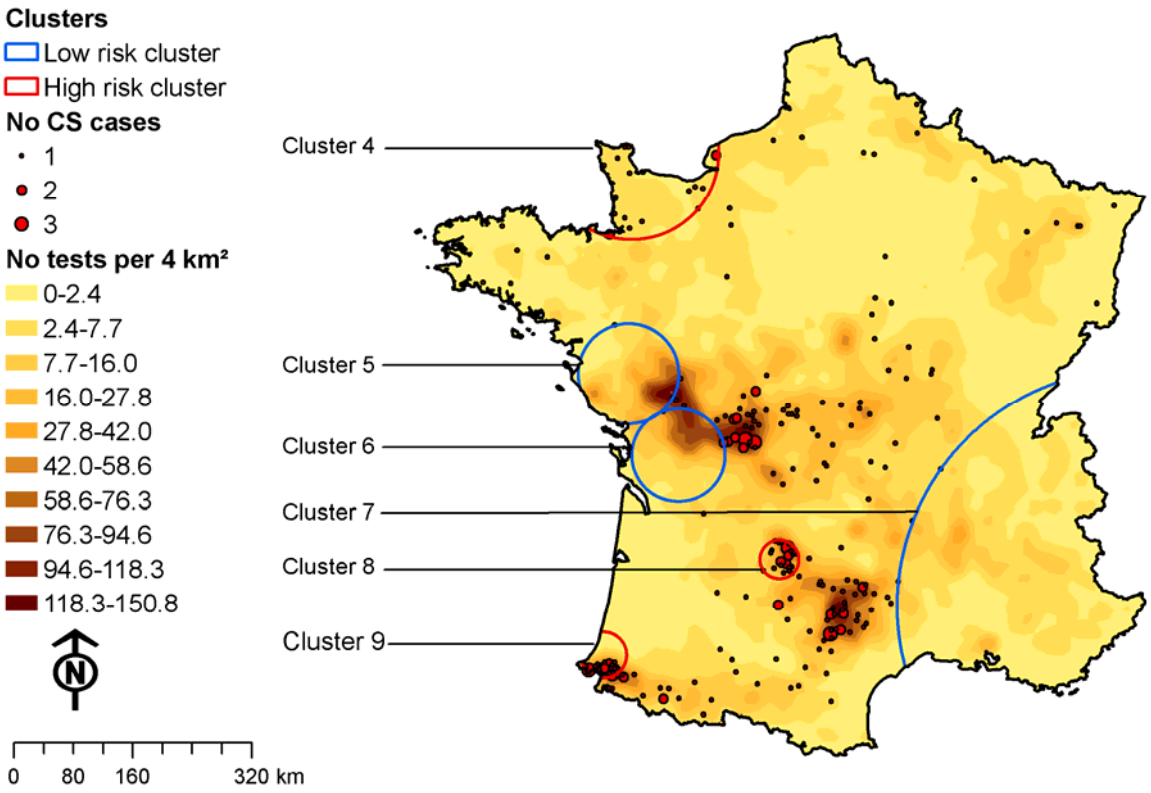


Figure 57: Distribution of CS cases, density of tests for CS in number per grid of 2x2km and significant clusters of CS (all p-values<0.01) detected by active surveillance programme between 2003 and 2007 in mainland France.

The distribution of animals tested was smoothed by kernel density function with a bandwidth of 20km and a grid of 2x2 square-km.

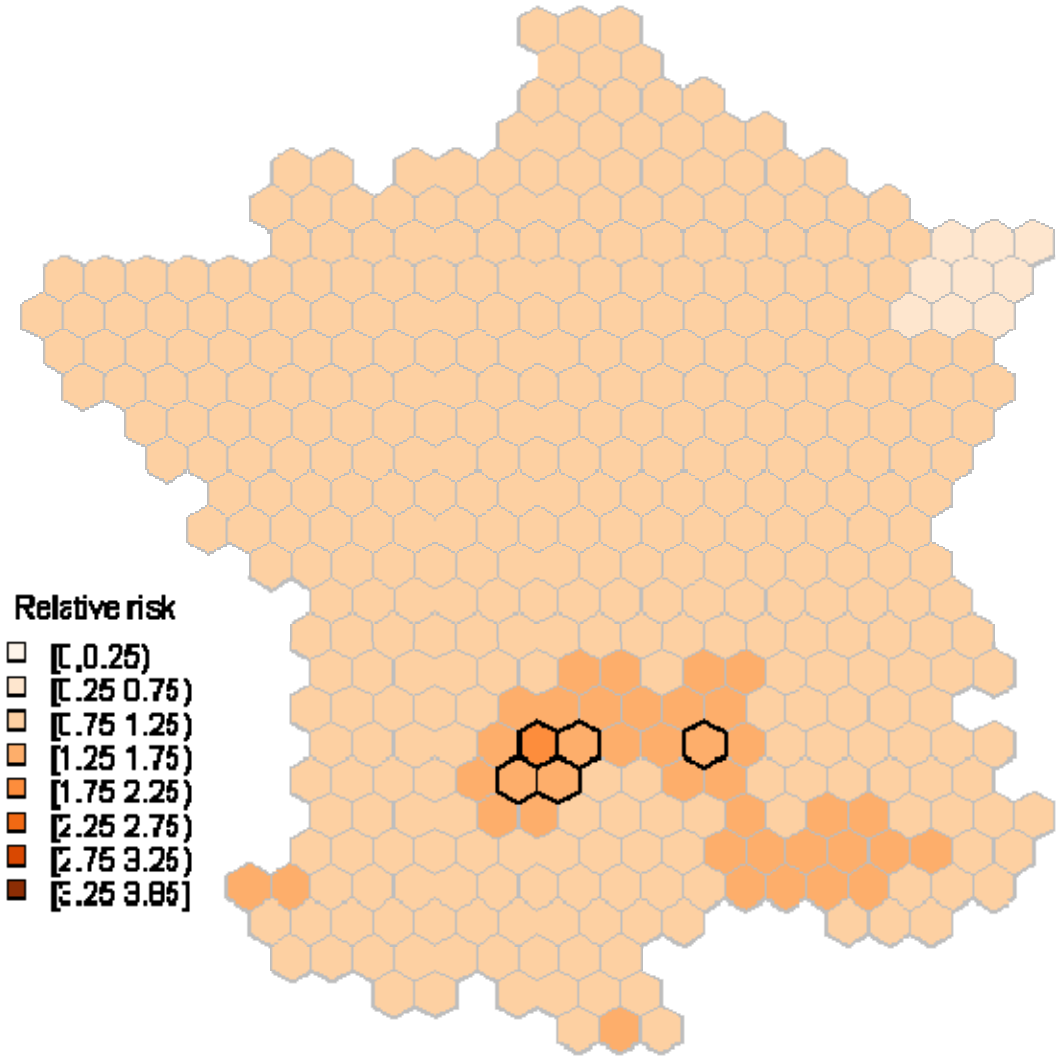


Figure 58: Smoothed relative risk of AS detected by active surveillance in mainland France between 2003 and 2007.

The hexagons cells are 40km wide. Median of relative risk after 400,000 iterations, the cells for which the 95% credibility intervals did not include 1 are outlined in black.

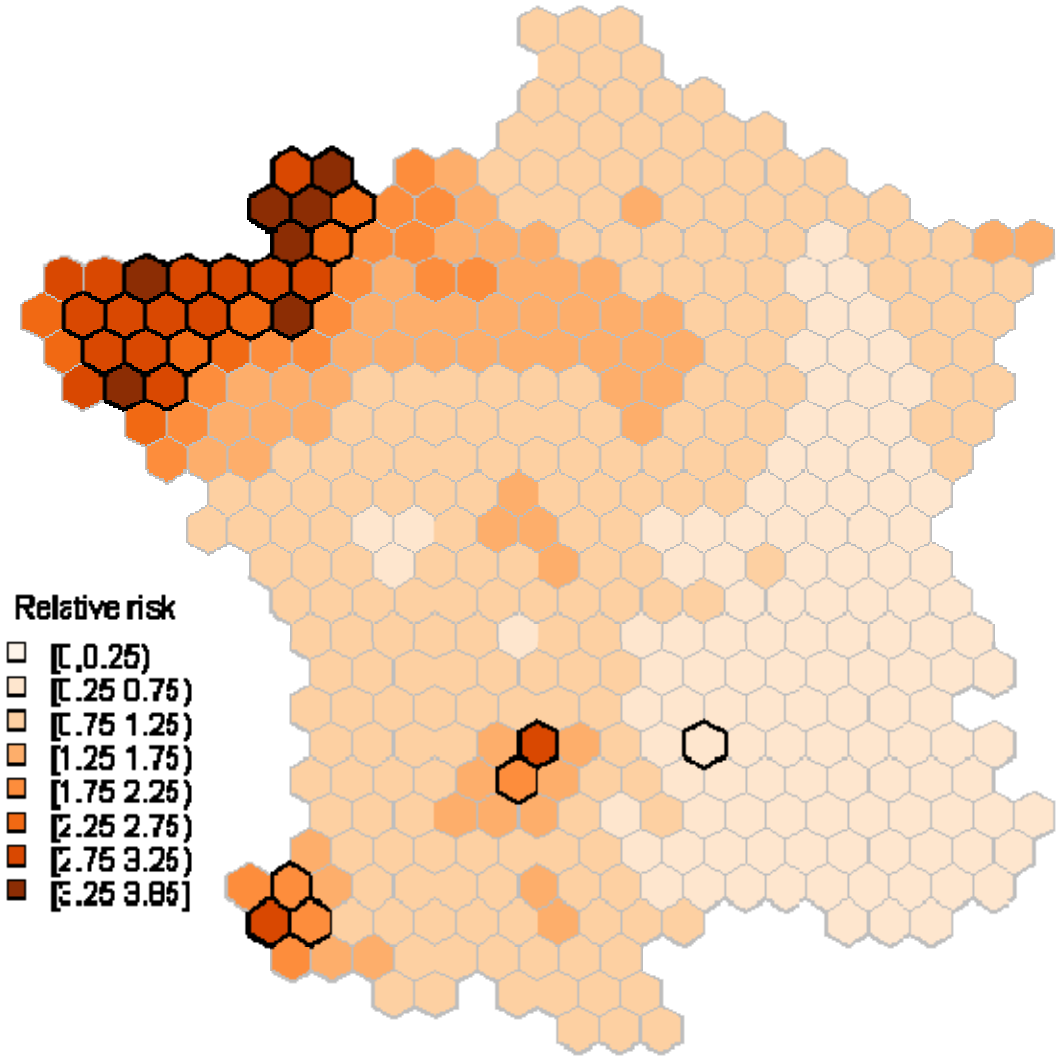


Figure 59: Smoothed relative risk of CS detected by active surveillance in mainland France between 2003 and 2007.

The hexagons cells are 40km wide. Median of relative risk after 400,000 iterations, the cells for which the 95% credibility intervals did not include 1 are outlined in black.

4.4.Matériel et méthodes de l'étude des prévalences de tremblante dans les troupeaux ovins français soumis à des mesures de contrôle des EST (article 5)

4.4.1. Objectifs

Les objectifs de cette étude étaient d'étudier la distribution des cas secondaires de tremblante atypique et classique dans les troupeaux atteints afin d'en tirer des conclusions sur l'indication d'une contagiosité éventuelle de la tremblante atypique, plus spécifiquement :

- de comparer les prévalences de la tremblante atypique et de la tremblante classique, observées parmi les animaux soumis aux mesures de police sanitaire de la tremblante, aux prévalences estimées à partir de la surveillance active à l'abattoir et à l'équarrissage ;
- d'étudier la différence de distribution des cas secondaires de chaque type de tremblante dans les foyers en fonction du nombre d'animaux testés, du type de mesure et du type de cas index ;
- de comparer la distribution du nombre de foyers présentant un cas secondaire de tremblante atypique à une distribution théorique simulée à partir d'une distribution binomiale du nombre de cas par foyer.

4.4.2. Sources de données

Les données de surveillance active utilisées pour l'analyse sont celles déjà présentées pour la période 2002-2007 (p. 73). Les données issues de la police sanitaire ont été extraites à partir de la BNEST et du fichier de suivi des foyers, administré par la DGAl.

En raison d'un nombre important de doublons et d'erreurs d'identification, les données de la base ont fait l'objet d'un traitement préalable à leur analyse. L'objectif de ce traitement était d'éliminer les doublons, de repérer les erreurs portant sur l'identification des animaux et de recoder le plan de surveillance dans le cadre duquel les tests ont été effectués.

Pour chaque foyer, le premier cas détecté d'après la date de prélèvement a été considéré comme étant le cas index et le type de tremblante de ce cas, atypique ou classique, a déterminé le type de foyer. Un seul foyer présentait plusieurs cas détectés le même jour qui correspondaient tous à de la tremblante classique, par conséquent, il n'y avait pas d'ambiguïté sur le type de foyer.

Les foyers dont le cas index n'a pas été détecté par la surveillance active ou n'a pas été typé comme tremblante atypique ou tremblante classique ont été exclus pour des raisons de comparabilité (trois foyers détectés par le CSO et 20 foyers détectés par la surveillance clinique).

Pour chaque foyer, les prélèvements effectués après la détection du cas index ont été consignés dans la BNEST par type de mesure de police sanitaire. La variable type de mesure de police sanitaire (APMSAB et APMSEQ pour surveillance renforcée respectivement à l'abattoir et à l'équarrissage, POLICE pour abattage sanitaire) et le code de mortalité (abattoir : animal abattu pour la consommation humaine, inconnu : animal collecté à l'équarrissage, euthanasie : pour suspicion clinique et abattage : police sanitaire) étaient parfois incohérents et certains dépistages étaient identifiés comme correspondant à la surveillance active alors que les animaux provenaient de foyers déjà identifiés. Ces incertitudes n'existaient que pour les tests négatifs, en effet, lors de résultat positif, la DGAl a systématiquement mené une enquête pour déterminer l'origine du cas et

a corrigé les informations enregistrées dans la BNEST si celles-ci étaient erronées. Les analyses identifiées comme correspondant à l'abattage sanitaire ont été considérées comme fiables. Cependant, des analyses effectuées dans le cadre de la surveillance renforcée et ayant un résultat négatif, ont pu être identifiées comme issues de la surveillance active. Les prélèvements correspondants étant effectués lieu dans les mêmes sites et aux mêmes moments. Afin d'éviter une surestimation des prévalences observées dans le cadre de la surveillance renforcée, les animaux issus de troupeaux impliqués dans un foyer, testés pendant les trois ans suivant la découverte du cas index, ont été affiliés aux foyers correspondants. Les foyers présentant des anomalies de suivi manifestes (moins de cinq animaux testés, doute sur l'attribution du cas index ou cas index détecté par la police sanitaire) ont été écartés de l'analyse. Entre 2002 et 2007, le programme de surveillance active a permis de détecter 402 foyers avec un cas index de tremblante atypique, dont 340 présentaient des données exploitables et 359 foyers avec un cas index de tremblante classique, dont 296 présentaient des données exploitables.

Les données ont été regroupées par foyer en fonction du type de cas index, du type de mesure ayant conduit au dépistage (abattage sanitaire ou surveillance renforcée), du type de test rapide et du résultat de l'analyse.

Pour les foyers avec un cas index de tremblante atypique, tous les cas secondaires ont été typés. En revanche, pour les foyers avec un cas index de tremblante classique, seuls les cas secondaires détectés à partir du 1er janvier 2007 ont été systématiquement typés. Une partie des cas secondaires détectés entre 2002 et 2006 a été typée à des fins de recherche. Nous avons fait l'hypothèse que les cas secondaires non typés correspondaient à des cas de tremblante classique. Par conséquent, nous n'avons pas cherché à estimer la prévalence de la tremblante atypique à partir des foyers avec un cas index de tremblante classique, hormis pour 2007.

4.4.3. Analyse statistique

Les populations issues des différents foyers ont été regroupées par type de cas index et par type de mesure de police sanitaire. Les différentes prévalences de tremblante ont été estimées par les rapports du nombre de cas sur le nombre de tests rapides. Pour la TA, seuls les tests *ad hoc* ont été pris en compte.
Afin d'évaluer la stabilité des résultats à l'égard de l'âge des animaux testés, nous avons ré-estimé les prévalences pour le sous-ensemble des animaux ayant la classe de dentition (8 ID) correspondant à la classe d'âge la plus élevée (4 ans et plus).

L'hypothèse d'homogénéité des prévalences des foyers par type de cas index et par type de mesure de police sanitaire a été testée par un test de Chi-deux. Nous avons ensuite comparé les distributions des prévalences de cas secondaires dans les foyers atypiques et classiques par un test de Kolmogorov Smirnov en ne considérant que les animaux testés dans le cadre de la surveillance renforcée, puisqu'ils représentent une population non biaisée du point de vue de la résistance génétique.

Nous avons également cherché à tester l'hypothèse selon laquelle le nombre de cas de tremblante atypique dans chaque foyer était la somme d'évènements indépendants de type Bernoulli et suivait une loi binomiale dépendant d'un paramètre p, probabilité d'être malade, considérée identique pour tous les animaux, et du nombre n d'animaux testés par foyers. Nous nous sommes limités aux

animaux testés avec un test recommandé pour la détection de la tremblante atypique dans le cadre de la surveillance renforcée :

$$P(X = k) = C_n^k p^k (1-p)^{n-k}$$

En prenant pour valeur de p, la prévalence de la tremblante atypique à l'abattoir, nous avons construit par simulation la distribution du nombre de foyers ayant détecté zéro, un et plus d'un cas secondaire de tremblante atypique en effectuant un grand nombre de fois (n=10 000) un tirage aléatoire de la loi de probabilité du nombre de cas secondaires en fonction des effectifs connus d'animaux testés dans les différents foyers. Cette distribution théorique a été comparée à la distribution observée.

Nous avons également calculé la distribution théorique obtenue si p valait deux fois la valeur de la prévalence de la tremblante atypique à l'abattoir, ce qui correspond à un risque deux fois plus élevé dans les troupeaux atteints que dans la population générale.

4.5. Article 5 : Etude des prévalences de tremblante dans les troupeaux ovins français soumis à des mesures de contrôle des EST

Discrepant epidemiological patterns between classical and atypical scrapie in sheep flocks under French TSE control measures

Alexandre Fediaevsky[a,b,*], Patrick Gasqui[b], Didier Calavas[a], Christian Ducrot[b]

[a] Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Unité Epidémiologie, 31 avenue Tony Garnier, F69364 Lyon cedex 07, France

[b] INRA, UR 346 Unité d'Epidémiologie Animale, F63122 Saint-Genes-Champanelle, France

*Corresponding Author. tel.: +33473624050, fax.: +33473624548
E-mail address: afediaevsky@clermont.inra.fr

Abstract

The occurrence of secondary cases of atypical and classical scrapie was examined in 340 outbreaks of atypical and 296 of classical sheep scrapie detected in France during active surveillance programmes between 2002 and 2007. The prevalence of atypical scrapie in these flocks was 0.05% under selective culling and 0.07% under intensified monitoring i.e. not significantly different from that detected during active surveillance of the general population (P >0.5), whereas these figures were much higher for classical scrapie (3.67% and 0.25% respectively, P <10^{-5}). In addition the number of atypical scrapie cases per outbreak did not indicate clustering. These results suggest that atypical scrapie occurs spontaneously or is not particularly contagious, and that the control measures in force allowed appropriate control of classical scrapie but were not more efficient than active surveillance in detecting cases of atypical scrapie.

Keywords: Scrapie; Sheep; Transmissible Spongiform Encephalopathy; Epidemiology; Communicable Disease Control.

The ability of sheep to transmit transmissible spongiform encephalopathies (TSE) in natural conditions, as demonstrated for classical scrapie (CS), caused fear of a possible spread of bovine spongiform encephalopathy in sheep (Baylis et al., 2002) and concerns that scrapie could hide BSE. The current European TSE surveillance programme in small ruminants led to the discovery of atypical scrapie (AS), an ubiquitous though rare disease which occurs mostly in old animals and preferentially those carrying certain PRNP genotypes (Benestad et al., 2008; Benestad et al., 2003; Fediaevsky et al., 2008). The epidemiological and pathological features of AS are considered by most authors to indicate that this disease would not be contagious under natural conditions or only at a very low level (Benestad et al., 2008). However no formal evidence has been put forward and, in many countries, stringent control measures are still applied to flocks following the detection of a single AS case.

The prevalence of secondary cases of AS and CS, in sheep from French flocks subjected to scrapie control measures between 2002 and 2007, was investigated in this study. Two type of measures, depending on the history of the case could apply following the detection of an index case of scrapie, whatever its type : i) selective culling when the case had stayed in the same flock for its entire life; this culling of sheep genetically susceptible to CS is applied to case flock mates, to any sheep from the birth cohort of the case which had been reared with the case during its first year of life and to all offspring when the case was a female; ii) intensified monitoring when the case had stayed in different flocks ;this monitoring is applied in the flocks where the case had stayed. It consisted of testing all adult sheep leaving these flocks for the slaughterhouse or rendering plant, for a three years period. It could be replaced by selective culling if further cases were detected in those flocks.

All TSE tests related to the same index case were linked to the number of outbreaks and held in a national database. Some outbreaks were excluded from the analysis because of poor record-keeping. Before 2007, secondary cases detected within CS outbreaks were not always typed by the National reference laboratory and undetermined cases were assumed to be CS. This was confirmed by data obtained from 2007 onwards, in which AS accounted for fewer than 2% of the scrapie cases detected in CS outbreaks. All statistical analyses were performed with R 2.6.1 for Windows (R Development Core Team, 2008).

The estimated prevalence of secondary scrapie cases was determined as described in (Fediaevsky et al., 2008) and computed, together with the 95% binomial confidence interval, for each outbreak and for outbreaks pooled according to type of index case and type of control measure. These prevalences were compared by Chi-Square tests with those obtained from the active surveillance programmes for the same period. The distribution of prevalence of AS in AS outbreaks was compared to the distribution of CS in CS outbreaks for each type of control measure using a Kolmogorov-Smirnov test and the prevalences compared by Chi-square tests. The observed distribution of the number of AS cases in AS outbreaks subjected to intensified monitoring was then compared to a theoretical distribution assuming that the total number of cases in each outbreak followed a binomial distribution depending on the number of animals tested and on an individual probability of disease, p. The hypothesis where p equalled the average prevalence of AS in active surveillance (0.07%) was compared with a hypothesis where p was two times higher in AS outbreaks (0.14%) than in active surveillance. The number of secondary cases per outbreak was

randomly generated and the distribution of the number of outbreaks with respectively 1 and >1 AS secondary cases was computed for 10,000 simulations.

In total, 340 outbreaks of AS and 296 outbreaks of CS were included in the study. The prevalence of AS was not significantly different under both control measures and under active surveillance (all $P>0.5$) (Tableau 31 and Figure 60). The prevalence of CS in CS outbreaks was higher when the culling strategy was applied compared to intensified monitoring, both prevalences being higher than under active surveillance (all $P<10^{-5}$).

The distributions of the prevalence of AS and CS in AS and CS outbreaks respectively, were significantly different (all $P<0.05$) (Figure 61), being uniform for AS (all $P>0.9$) and variable for CS (all $P<10^{-5}$).

Among the 334 flocks where intensified monitoring was applied, one AS secondary case was detected in 11 flocks and no AS secondary case in 225 flocks. The same distribution was obtained for 7.44% of the simulations and was close to the most frequently simulated distribution (Figure 62). Assumption of a binomial distribution with uniform probability was consistent with the figures observed in outbreaks but this assumption can be discussed since the individual risk of disease is modified by genetic susceptibility (Moreno et al., 2007), which can in turn be modulated by certain risk factors at the farm level (Hopp et al., 2006). However with an hypothesis of an individual risk of 0.14%, the observed distribution was obtained for only 0.24% of the simulations and was far from the most frequently observed distribution (Figure 62).

In contrast with AS, the prevalence of secondary cases of CS was much higher than under active surveillance, as already reported (Tongue et al., 2005) and as expected due to the contagiousness of CS. The variability in CS prevalence could be due to differences in genetic structure of the affected flocks, the time elapsed since contamination of the flock with CS and the effect of certain farming practices on infectious disease spread (Corbière et al., 2007). As different types of measures could apply to animals from the same outbreak, the observed differences in prevalence according to type of measure should not be over-interpreted and could be mostly due to difference in genetic resistance.

These results confirm the view that AS is not or only minimally contagious. Irrespective of the type of control measure applied in AS outbreaks, they did not lead to the detection of a higher proportion of AS cases than active surveillance and the appropriateness of such measures is therefore questionable. In contrast the same control measures led to significant elimination of infected animals in CS outbreaks.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgment

The authors would like to thank Dr Thierry Baron (AFSSA Lyon) and his team for typing historical secondary scrapie cases and Patrice Chasset (Ministry of Agriculture) for excellent technical assistance in data sourcing. This study was partially funded by the French Ministry of Agriculture.

References

Baylis, M., Houston, F., Kao, R.R., McLean, A.R., Hunter, N., Gravenor, M.B., 2002. BSE - a wolf in sheep's clothing? Trends in microbiology 10, 563-570.

Benestad, S.L., Arsac, J.N., Goldmann, W., Nöremark, M., 2008. Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. Veterinary Research 39, 19.

Benestad, S.L., Sarradin, P., Thu, B., Schönheit, J., Tranulis, M.A., Bratberg, B., 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type Nor98. The Veterinary Record 153, 202-208.

Corbière, F., Barillet, F., Andréoletti, O., Fidelle, F., Laphitz-Bordet, N., Schelcher, F., Joly, P., 2007. Advanced survival models for risk-factor analysis in scrapie. Journal of General Virology 88, 696-705.

Fediaevsky, A., Tongue, S.C., Nöremark, M., Calavas, D., Ru, G., Hopp, P., 2008. A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. BMC Veterinary Research 4, 19.

Hopp, P., Omer, M.K., Heier, B.T., 2006. A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. Journal of General Virology 87, 3729-3736.

Moreno, C.R., Moazami-Goudarzi, K., Laurent, P., Cazeau, G., Andréoletti, O., Chadi, S., Elsen, J.M., Calavas, D., 2007. Which PrP haplotypes in a French sheep population are the most susceptible to atypical scrapie? Archives of Virology 152, 1229-1232.

R Development Core Team, 2008. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statical Computing.

Tongue, S.C., Webb, P., Simmons, M.M., Gubbins, S., 2005. Prevalence of scrapie infection in cull animals from 14 scrapie-affected flocks in Great Britain. The Veterinary Record 157, 480-482.

Tables

Tableau 31 : Prevalence per type of scrapie and origin of sheep tested in France, together with 95% binomial confidence intervals, for the period 2002-2007.

Type of scrapie	Origin of sheep tested	Number of cases	Number of tests	Prevalence (%)	CI 95% (%)
AS	AS outbreak – Selective culling	5	10,883	0.05	0.02 – 0.11
	AS outbreak – Intensified monitoring	11	15,045	0.07	0.04 – 0.13
	Active surveillance at slaughterhouse	183	308,298	0.06	0.05 - 0.07
	Active surveillance at rendering plant	232	290,936	0.08	0.07 - 0.09
CS	CS outbreak – Selective culling	1152	30,223	3.67	3.47 – 3.89
	CS outbreak - Intensified monitoring	148	58,407	0.25	0.21 – 0.30
	AS outbreak – Selective culling	11	18,988	0.06	0.03 – 0.10
	AS outbreak – Intensified monitoring	0	20,900	0.00	0.00 – 0.02
	Active surveillance at slaughterhouse	70	430,692	0.02	0.01 - 0.02
	Active surveillance at rendering plant	387	523,924	0.07	0.07 - 0.08

AS: Atypical scrapie; CS: Classical scrapie

Figures

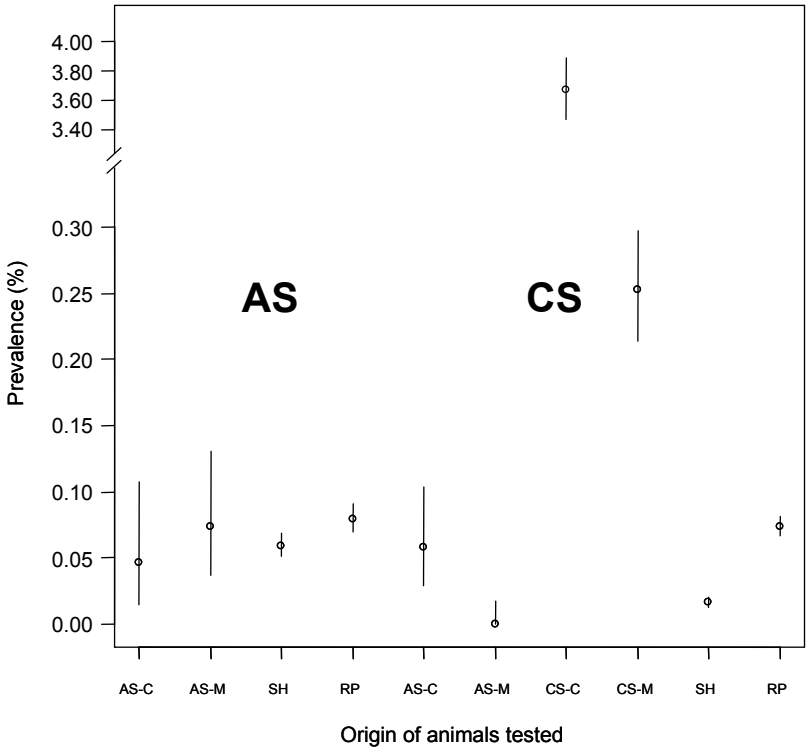


Figure 60 : Prevalence per type of scrapie and origin of sheep tested in France, together with 95% binomial confidence intervals, for the period 2002-2007

AS: Atypical scrapie outbreak, CS: classical scrapie outbreak, C: Selective culling, M: Intensified monitoring, SH: active surveillance at slaughterhouse, RP: active surveillance at rendering plant

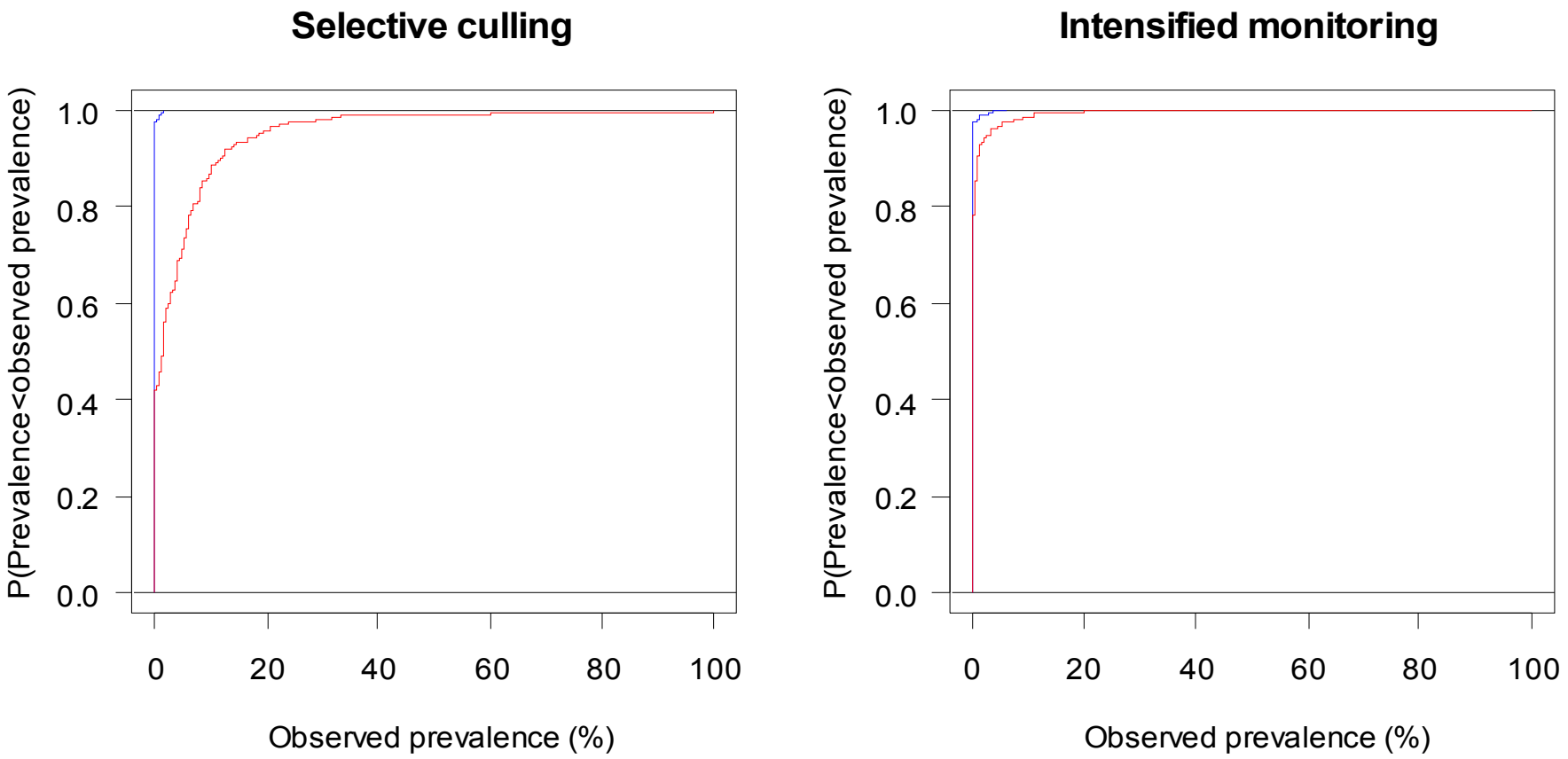


Figure 61 : Distributions of the prevalence of secondary cases in AS outbreaks (bold blue line) and in CS outbreaks (thin red line).

For instance, the probability for the prevalence of secondary cases of CS in CS outbreak subjected to selective culling to be lower than 20% was 0.95.

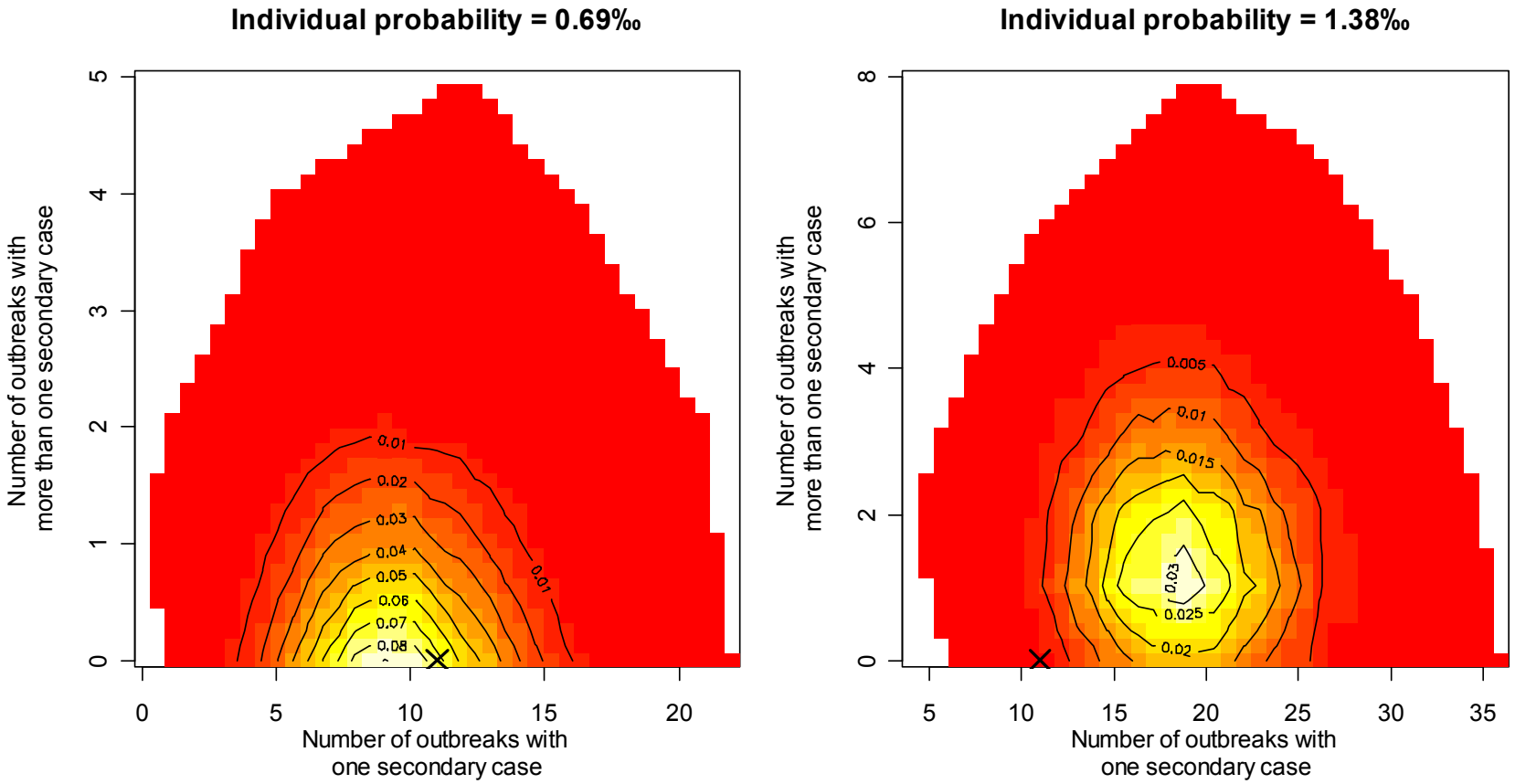


Figure 62 : Density of probability of the distribution, for 10,000 simulations, of the number of outbreaks with 1 or more secondary cases

Calculated by assuming a binomial distribution assuming an individual probability of AS of 0.07% (left panel) and 0.14% (right panel) and g given the number of animals tested per outbreak. The black cross indicates the observation (11 outbreaks with 1 secondary case and 0 outbreak with >1 secondary cases).

4.6. Article 6 : Etude européenne de la prévalence de cas index et de cas secondaires de tremblante atypique ovine

The prevalence of atypical scrapie in sheep from positive flocks is not higher than in the general sheep population in 11 European countries

Author list

Alexandre Fediaevsky [1,2], Cristiana Maurella[3], Maria Nöremark[4], Francesco Ingravalle[3], Stefania Thorgeirsdottir[5], Leonor Orge[6], Renaud Poizat[7], Maria Hautaniemi[8], Barry Liam[9,] Didier Calavas[1], Giuseppe Ru[3], Petter Hopp[10,*]

Affiliations

[1] AFSSA-Lyon, Unité Epidémiologie, 31 Avenue Tony Garnier, 69364 Lyon, France

[2] INRA Clermont-Theix, Unité épidémiologie animale, F63122 Saint Genès Champanelle, France

[3] Italian Reference Centre for Animal TSEs-Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Italy

[4] Department of Disease Control and Epidemiology, SVA, National Veterinary Institute, 751 89 Uppsala,Sweden

[5] Institute for Experimental Pathology, University of Iceland, Keldur v/Vesturlandsveg, IS-112 Reykjavík, Iceland

[6] Sector de diagnóstico de EETs, Laboratório de Patologia - Unidade de Sanidade Animal, Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, INRB, I.P., Estrada de Benfica 701, 1549-011 Lisboa, Portugal

[7] AFSCA, DG Politique de Contrôle, Bd du Jardin Botanique, 55, 1000 Bruxelles, Belgium

[8] Veterinary Virology, Finnish Food Safety Authority, 00790 Helsinki, Finland

[9] DAFF Administration Building,Backweston Campus, Stacumney Lane, Young's Cross,Celbridge, Co. Kildare, Ireland

[10] Section of epidemiology, National Veterinary Institute, P.O. Box 750 Sentrum, 0106 OSLO, Norway

[*] Corresponding author

Email addresses

afediaevsky@clermont.inra.fr, cristiana.maurella@izsto.it, maria.noremark@sva.se, francesco.ingravalle@izsto.it, stef@hi.is, leonor.orge@lniv.min-agricultura.pt, renaud.poizat@afsca.be, maria.hautaniemi@evira.fi, liam.barry@agriculture.gov.ie, d.calavas@afssa.fr, giuseppe.ru@izsto.it, petter.hopp@vetinst.no

Abstract

Background: During the last decade, active surveillance of transmissible spongiform encephalopathies in small ruminants has been intensive in Europe. In many countries this has conducted to the detection of cases of atypical scrapie which, unlike classical scrapie, might not be contagious. According to EU regulation, the detection of a scrapie case leads to control measures and further testing in the flock of origin, which can result in the detection of secondary cases. The aim of this study was to investigate if the occurrence of secondary cases in flocks affected by atypical scrapie could help in clarifying the potential contagious nature of the disease by using surveillance data collected in Europe.

Results: Questionnaires were used to collect, at country-level, the results of active surveillance and of the within-outbreaks testing from 12 European countries. The mean prevalence of atypical scrapie was six cases per ten thousand in abattoir surveillance and eight cases per ten thousand in fallen stock. By using meta-analysis, on 11 out of the 12 countries, we found that the probability of detecting secondary cases of atypical scrapie in positive flocks was similar to the probability observed in animals slaughtered for human consumption (odds ratio, OR=1.07, $CI_{95\%}$: 0.70-1.63) or among fallen stock (OR=0.78, $CI_{95\%}$: 0.51-1.2). In contrast, when comparing the two scrapie types, the probability of detecting secondary cases in classical scrapie positive flocks was significantly higher than the probability of detecting secondary cases in AS positive flocks (OR=32.4, $CI_{95\%}$: 20.7-50.7).

Conclusions: These results suggest that atypical scrapie is not contagious or has a very low transmissibility under natural conditions compared with classical scrapie. Furthermore this study stressed the importance of standardised data collection to make good use of the analyses undertaken by European countries in their efforts to control atypical and classical scrapie.

Background

Scrapie is a fatal neurodegenerative disease affecting sheep and goats which belongs to the group of diseases called transmissible spongiform encephalopathies (TSE). In its classical form, it is a contagious disease with susceptibility influenced by punctual mutations on the prion gene (*prnp*) coding for the prion protein (PrP) [1]. In 1998, a new type of scrapie called scrapie Nor98 was detected [2] and in 2005 the European Food Safety Authority (EFSA) defined diagnostic criteria for classical scrapie (CS) and for atypical scrapie (AS), including Nor98, based on the results of Western blot pattern of the pathogenic prion protein (PrP^{Res}) [3]. Since the diagnostic of AS poses some specific difficulties because of the proteinase K susceptibility and the variable distribution of PrP^{Res} [4], EFSA also evaluated the sensitivity of the different TSE rapid tests to detect AS on different biological material (table 1) [5, 6].

As a contagious disease, CS is often clustered within flocks and regions. Infected animals usually die at the end of the clinical course of the disease when they are between two to four years of age. Animals carrying PrP genotypes with a $V_{136}R_{154}Q_{171}$ and/or an $A_{136}R_{154}Q_{171}$ alleles are considered most susceptible to the disease [1]. In contrast to CS, AS is usually detected in older animals (mean age of five to six years) [4] and the PrP genotypes including the alleles $A_{136}H_{154}Q_{171}$ and/or $A_{136}F_{141}R_{154}Q_{171}$, are more at risk [7]. Although the disease has been shown to be experimentally transmissible by intracerebral inoculation to mice [8] and sheep [9], transmission between animals under natural conditions has not yet been demonstrated. AS has been reported to have scattered geographical appearance [10, 11] and usually only a single affected animal in a flock has been detected [4]. Nevertheless, the occurrence of more than one AS case in individual flocks, so-called secondary cases, has been reported [4, 11-13]. No factor indicating horizontal transmission was found neither in case control studies in Norway [10] or France [14] nor by network analysis of movement data in the UK [15]. Furthermore, there have been three cases occurring in an experimental flock presumed free from scrapie without explanation on a possible source of contamination [16]. Due to the different features of AS compared to CS it has been suggested that AS could develop without exposure to an infectious agent [4].

Since 2002, intensive active surveillance for TSE in healthy slaughter, *ie* sheep slaughtered for human consumption, and fallen stock *ie* animals which have died or been killed but not slaughtered for human consumption, has been performed within the European Union (EU). It has previously been shown that the prevalence of AS in slaughtered animals and fallen stock is similar throughout Europe [13]. When positive cases have been detected through active surveillance there have been legal requirements to implement, in the flock of origin, control measures and testing of animals [17]. Despite the common European regulation always proposed choice for different options of control strategies and had numerous amendments, specific provisions for AS were only introduced in July 2007 [18]. It should be emphasised that as regards the animal health aspect, the relevance of any measure applied for the control of AS will depend on whether the disease is contagious or not.

The aim of this study was to investigate if the occurrence of secondary cases of atypical scrapie could help in clarifying the potential contagious nature of the disease. Insight may be gained by using data available in different European countries and comparing the prevalence in different streams of surveillance. Thus, the prevalence of AS among the animals tested due to control measures in AS positive flocks was compared with 1) the prevalence of AS in the healthy slaughter

surveillance, 2) the prevalence of AS in fallen stock surveillance and 3) the prevalence of CS and AS among sheep tested due to control measures in CS positive flocks.

Results

From the seventeen countries that had reported at least one case of atypical scrapie from 2002 to 2007, twelve countries answered the questionnaire, three countries declined participation and two countries did not answer. Finally, the following eleven countries were included in the analysis: Belgium, Denmark, Finland, France, Greece, Iceland, Italy, Netherlands, Norway, Portugal and Sweden. The data from Ireland were presented but could not be included in most analyses for various reasons: AS prevalence was not estimated because only group 3 analyses (see Tableau 32) were used, CS prevalence was not estimated because some uncertainty prevailed on the number of animals tested from CS positive flocks, prevalence in positive flocks and active surveillance were not compared because the diagnostic procedures in active surveillance and in positive flocks differed and thus the results were not comparable.

Control strategies

The applied control strategies by country are shown in Tableau 33. Three main categories were defined for each type of scrapie: i) stamping out: all animals from the positive flocks were destroyed and either all or a sample of the adults were tested, ii) selective culling: animals were genotyped and animals carrying certain genotypes were destroyed and tested, and iii) intensified monitoring: the flocks were not culled, but adults leaving the flocks as healthy slaughter or fallen stock were tested. Italy applied an extended selective culling in flocks with AS, and this was reported separately. Within each of the three categories, differences existed between countries *ie* if the animals tested from suspect flocks and contact flocks were included in the reporting, the minimum age of the tested animals, the proportion of animals tested among destroyed animals and which genotypes were tested in selective culling. There were also changes over time within the countries. Stamping out was applied in five countries for CS and seven countries for AS, selective culling was applied in six countries for CS and eight countries for AS and intensified monitoring was applied in one country for CS and seven countries for AS (Tableau 33).

AS in active surveillance

Out of eleven countries that used combinations of rapid tests and samples recommended to detect AS (group 1 analyses in Tableau 32) for active surveillance (Ireland was excluded), ten countries had detected at least one positive case of AS in active surveillance of healthy slaughter while no positive case had been detected in The Netherlands. The prevalences, with a mean value of six cases per ten thousand, are shown in Tableau 34. In fallen stock, eight countries had detected at least one positive case of AS, with no cases found in Greece, Iceland and The Netherlands. The prevalences, with a mean value of eight cases per ten thousand are shown in Tableau 34. The prevalences were significantly higher in fallen stock compared to healthy slaughter (odds ratio (OR) = 1.57, 95% confidence interval, ($CI_{95\%}$): 1.36 - 1.82). In The Netherlands, 1 AS case was detected out of 43,346 group 3 tests in healthy slaughter and 3 cases of AS were detected out of 42,622 group 3 tests in fallen stock. No other countries detected AS case in active surveillance

with group 3 tests. In Ireland, 3 AS cases were detected with group 3 tests but based on clinical surveillance.

AS and CS in positive flocks

All the answering countries had detected at least one case of AS and had subsequently tested sheep from AS positive flocks. Four countries (France, Iceland, Italy and Portugal) had detected secondary cases with group 1 tests using the same diagnostic procedure in positive flocks and active surveillance. The prevalences of secondary AS cases in positive flocks were in average six cases per ten thousand. The prevalences from the different control strategies were not significantly different (selective culling versus intensified monitoring: OR=0.7, $CI_{95\%}$: 0.33 – 1.84; stamping out versus intensified monitoring: OR = 1.58, $CI_{95\%}$: 0.36 – 6.94) (Tableau 35).

CS cases were also detected in flocks with an index case of AS in France and Italy (Tableau 36), with a mean of three cases per ten thousand. Except in Ireland, no secondary AS case was detected by group 3 tests. In Ireland, the samples collected in positive flocks included material from the cerebellum which was not collected in the active surveillance [12] so results could not be compared with those from active surveillance. In this country, one secondary case was detected out of 19 animals tested in stamping out and no secondary case was detected out of 66 animals tested in selective monitoring.

Nine countries also applied control strategies in CS positive flocks during the study period (Belgium, France, Greece, Iceland, Ireland, Italy, The Netherlands and Norway). All these countries detected CS secondary cases (Tableau 36) and the mean prevalence for the eight countries included in the analysis (Ireland excluded) was 280 cases per ten thousand. The prevalences were significantly higher in selective culling compared to stamping out (OR=2.27, $CI_{95\%}$: 2.19 – 3.02) and were also higher in selective culling compared to intensified monitoring (applied only in France, OR=8.08, $CI_{95\%}$: 6.90 – 9.46). AS cases were also detected in flocks with index case of CS in France, Greece and Italy (Tableau 36), with a mean of two cases per ten thousand. The prevalence rates were not significantly different between the different control strategies.

The prevalences of secondary AS cases in AS positive flocks were significantly higher than the prevalences of secondary CS cases in CS positive flocks (OR = 0.03, $CI_{95\%}$: 0.02 – 0.05).

Comparison of prevalence between the surveillance streams

Because of small number of secondary AS cases, only data from four countries (France, Greece, Italy and Portugal) actually contributed to the meta-analysis and French data contributed the most. None of the comparisons showed any significant heterogeneity among the countries (I-square statistic was never significantly different from zero). The prevalences of secondary AS cases in AS positive flocks were not significantly different from prevalences of AS in healthy slaughter (Figure 63, Odds ratio (Dersimonian and Laird random effects method, ORDL=1.07, 95% confidence limits (CI95%): 0.70-1.63) or in fallen stock (Figure 64, ORDL=0.78, CI95%: 0.51-1.20).

There was a significantly higher probability of detecting secondary AS cases in AS positive flocks compared to CS positive flocks (Figure 65) in Italy and in France (ORDL=2.54, CI95%: 1.24-5.19). The prevalence of AS among sheep tested due to control measures in CS positive flocks was lower than the AS prevalence in active surveillance (Figure 66 and Figure 67). This result was statistically significant for the Mantel-Haenszel (MH) fixed effects models and for the Dersimonian and Laird random effects models applied to fallen stock (Figure 66). The funnel plots

(not shown) did not reveal association between results and size of tested national sheep populations but few countries contributed to the construction of the plots.

Discussion

AS is probably not contagious or much less contagious than CS

Through a large multicentric study, we found that the prevalence of AS among sheep tested due to control measures in positive flocks was not significantly different from the prevalence of AS in the general sheep population tested through active surveillance. These results suggest that AS do not cluster in positive flocks, and consequently that AS is not contagious or far less contagious than CS. The low odds ratio of prevalence of AS secondary cases in AS positive flocks compared with the prevalence of secondary CS cases in CS positive flocks illustrated the lower propensity of AS to aggregate in positive flocks compared with CS. The hypothesis that AS is not contagious have also been supported by other reports which focused on case descriptions [11, 12, 16, 19]. Other epidemiological studies have also concluded that AS is probably not contagious given the risk factors detected [10, 14, 15] and one study that considered scrapie within flock prevalence [20]. Furthermore, a spontaneous origin of AS has been suggested based on histopathological features [2, 4, 21]. A non-contagious nature of AS does not exclude the role for genetics influence [4] and/or environmental factors [10, 14]. In this situation, more AS cases could be expected in flocks, in which the animals are exposed to the same factors or have similar genetic background.

In Ireland one secondary AS case was found among a limited number of examined animals, however only one flock was investigated with this control strategy so no reliable inference can be drawn from this single event. The occurrence of secondary AS case in a small flock could suggest clustering for AS, however it could also have occurred due to chance. In addition, no comparisons could be made with prevalence in active surveillance. The fact that this secondary Irish case was detected after careful examination of the cerebellum [12], stressed the possible underestimation of AS when the cerebellum is not analyzed. As long as the same diagnostic procedures are used in the different streams that are compared, the odds ratio of the prevalence in the different streams should not be affected by an underestimation of the prevalence. For the other countries, the same procedures were used and these comparisons could be made, and as already mentioned there were no indication of a higher prevalence of AS in animals from positive flocks. To progress on the knowledge of AS it is important that the test procedures are as sensitive as possible to ensure the detection of cases. In this regard, some improvements could be achieved through sampling and testing cerebellum as recommended by EFSA [5, 6]. Notwithstanding enhancement of the methods of analysis, the collection of data relative to the flock and the animals tested should also be improved to allow proper interpretation of the results.

Some countries did detect CS cases in AS positive flocks, but not at a higher prevalence compared to the prevalence of CS detected in active surveillance. Thus there was no indication of a link between the two diseases which was also supported by a study in Great Britain [20].

There was no significant difference of secondary cases prevalence among the different AS control strategies

We did not detect any significant difference in prevalence of secondary AS cases related to the type of control measure applied. However the statistical comparison was only based on data from two countries and thus had low power. Despite absence of significant differences, the control

strategies might theoretically lead to different detected prevalences and these will be discussed in theory. The most important difference between strategies is probably whether the animals, which were culled and tested, were selected based on their genotype or not. For classical scrapie all countries had chosen the same genotypes to cull, (based on the genotypes known to be at high risk for classical scrapie). All countries applying selective culling in AS positive flocks (except for Italy and Portugal) culled and tested the same genotypes as in CS positive flocks, even though these do not include all the genotypes at risk for AS (Tableau 33). Each type of genetic selection should conduct to different prevalences but possibly within similar ranges and statistical differences could be difficult to detect. In addition there might be a different age structure of the animals tested in different control strategies. When the whole flock or parts of the flock is culled at one point in time, the culled animals are probably younger compared to intensified monitoring when animals leave the flock at the end of their productive life. Since AS often is found in older animals, this could have an effect on detected prevalence with a theoretically higher prevalence in intensified monitoring. Further there were different age limits for minimum age of animals tested (12 months or 18 months); if the sample contains a large proportion of young animals this could further affect the estimation of prevalence by lowering it. Furthermore some countries reported that it was possible that there was some potential misclassification of some of the samples in the data provided (e.g. assigned wrong type of control strategy). However, we have no indication suggesting a differential misclassification leading to bias. To quantify the possible effect of these factors, we would have needed data on the demographic structure (age and genotype) of each flock, which we did not have access to. Theoretically, we would consider the intensified monitoring in positive flocks to be the stream most comparable to active surveillance.

Study at the European level

One strength of our study is that data from several countries were included. That was facilitated by the common EU regulation. However, it only gives provisions for the collection of data on cases and not on tested animals [18]. Therefore we collected data directly from countries and there was some heterogeneity in data quality. To conduct the comparison of prevalence in the different streams of surveillance, we assumed that they were similar. Yet, this was not completely true for at least two reasons. First, despite the lack of significant differences, the control measures were not completely equivalent as theoretically discussed above. Second, the prevalence of AS within the healthy slaughter and fallen stock streams were not exactly the same between countries, even though they were within a similar range. The difference was still pointing out some heterogeneity between the sheep population and/or the implementation of the active surveillance programme as discussed in [13] and [22]. To take these different sources of heterogeneity into account, we considered the use of fixed effect (MH) as well as random effect regression (ML). We found that heterogeneity was limited and the two methods conducted to similar results. We tried to take into account the results from the countries without secondary AS cases by adding a continuity correction and we implemented different types of continuity correction. In any of the settings, the results were similar and the contribution of the countries without any secondary AS case was negligible so that we could display more readable results without need to show them after the continuity corrections applied.

Because important data on the animals tested such as age, PrP genotype and the flock of origin were not available, and because of the difficulty to diagnose AS [4], the AS prevalence could have been underestimated. Even though bias might occur, the results for CS, based on data collected in the same way, showed a clear clustering of cases in positive herds.

Since July 2007, the EU regulation authorises control measures in AS positive flocks to be limited to two years of intensified surveillance; requirements to sample fallen stock and animals leaving the flock for slaughter, but without movement restrictions [18]. The rationale is the assumption that AS is far less contagious than CS, which is supported by our results. However, it cannot be excluded that AS is naturally transmissible at a low level and the continued monitoring of animals leaving the flock might still be a sound precautionary measure. The results of this surveillance could also contribute to assess the necessity and the nature of control measures in the future. However, data collection and diagnostic procedures need to be improved and standardized throughout the EU to enable analyses of testing due to control measures and surveillance activities, which will then have a better return to cost ratio.

Conclusion

Within Europe, scrapie surveillance has been intensive for several years. EU legislation requires additional testing in positive flocks, but the results have not been collected in a fully standardised way. In this study we collected data on active surveillance and surveillance in positive flocks and found that the prevalence of secondary AS cases in positive flocks did not differ from the prevalence in active surveillance (healthy slaughter and fallen stock). These results indicate that atypical scrapie does not seem to cluster in positive flocks supporting the hypothesis that atypical scrapie, in contrast to classical scrapie, is not a contagious disease.

Material and methods

Data collection

Since 2002, 28 European countries (25 EU member states plus Iceland, Norway and Switzerland) have been involved in scrapie surveillance in accordance with EC regulation 999/2001 [17] for at least one year. Seventeen countries that had reported at least one case of atypical scrapie from 2002 to 2007 were solicited to participate to the study: Belgium, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, The Netherlands, Norway, Portugal, Spain, Sweden, Switzerland and the United Kingdom. In June 2008, a questionnaire was sent to both the Chief Veterinary Officer and the contact persons in the EU Network of Excellence Neuroprion or the former Small Ruminant TSE Network for each country. They were requested to co-ordinate the completion and return of the questionnaire. Two reminders were sent in September and the data collection was closed in October 2008.

The questionnaire, which is available on request from the first author, covered information for the period 2002 to 2007 on i) the methods and material used for the detection of AS and CS, ii) the control measures applied in positive flocks, iii) the sampling of animals from flocks under TSE control measures and iv) the sampling of animals in the two streams of active surveillance in the EU; healthy slaughter and fallen stock. The test results were reported by method of detection of AS, grouped according to EFSA recommendation of use of rapid tests on different biological material (Tableau 32) [5, 6]. For each stream and year of the active surveillance programme the numbers of animals tested and the numbers of AS, CS and undetermined TSE index cases were collected. For each type of control measure and each scrapie type of index case (AS or CS), the number of animals tested and the number of AS, CS and undetermined TSE secondary cases were collected.

The control measures strategies were defined as follows: i) stamping out which included the strategies where all animals from the positive flocks were destroyed and a sample of the carcasses of the adults tested, ii) selective culling which included the strategies where animals from the positive flocks were genotyped and only the animals carrying certain genotypes destroyed and in part tested, and iii) intensified monitoring which included the strategies where adults leaving the positive flocks as healthy slaughter or fallen stock were systematically tested but were not culled for the purpose of the control strategy (Tableau 33).

Data management

The questionnaires were designed as electronic PDF form (Adobe 8.0 Copyright 1993-2008 Lextek International). When data on active surveillance were available from a previous study on prevalence of scrapie [13], the data were pre-filled but could be updated. The questionnaire data were collected in a MS Access database (Microsoft® Access 2003 SP2 Microsoft corporation, WA, USA), whereas the statistical analyses and all graphics including maps were performed with R 2.6 [23] or Stata (Stata Corp. 2007. Statistical Software: Release 10.0. College Station, TX: Stata Corporation). For all statistical tests performed, the significance level was set to 5%.
When the countries returned questionnaires that were partially answered, they were asked to complete their response. If important questions could not be answered, the country was excluded from the analysis.

The different control strategies applied by countries to the positive flocks with AS or CS, were grouped in three main categories (Tableau 33). The control strategies that did not fit these categories were reported as separate categories.

The starting point of active surveillance for AS was identified for each country as the year from when AS could be detected and confirmed. For all the statistical analyses, the prevalence of AS was calculated on data referring to group 1 analyses.

In France, in some CS positive flocks, secondary cases were reported as undetermined TSE. However, by examining a random sample of these it was determined that AS cases would represent less than 2% of these cases and it was decided to treat the undetermined TSE cases as CS in the analyses.

Statistical analysis

Prevalences

The prevalence defined as the proportion of cases per number of tests, from group 1 for AS and all groups for CS, were estimated with their 95% confidence interval ($CI_{95\%}$) using exact binomial method and was expressed per ten thousand of tests. The prevalences were estimated separately for AS and CS per country and surveillance stream (active surveillance streams and control strategies).

We tested if the prevalences of AS differed between healthy slaughter and fallen stock by using a generalised linear regression mixed model (GLMM), setting healthy slaughter as the reference stream and taking into account the heterogeneity between countries as a random effect.

We checked if the secondary AS case prevalences detected by the different control strategies applied in AS positive flocks were significantly different using a GLMM taking into account heterogeneity between countries as a random effect and setting intensified monitoring as the

reference stream. We conducted the same analysis for secondary AS cases detected in CS positive flocks and for secondary CS cases detected in CS positive flocks.

Since the prevalences of AS in positive flocks were not significantly different according to control strategies we merged them in the rest of the analyses.

We compared the prevalences of secondary AS cases in AS positive flocks and in CS positive flocks to the prevalences of AS in the two active surveillance streams and we compared the prevalences of secondary AS cases in AS positive flocks to the prevalences of secondary AS cases in CS positive flocks. The results were compared by using the OR estimated for each country. The comparison was not done for Ireland because different diagnostic procedures applied in active surveillance and in positive flocks, the examination of the latter being more careful and because only group 3 tests were used.

Eventually we compared the risk of having secondary cases of the same scrapie type as the index case, all control strategies being merged, using a GLMM with the countries as random effect and with CS as the reference.

Meta-analysis

We used a meta-analytic approach [24] to estimate the summary probability of disease measured by OR. First we used a MH method assuming homogeneity between countries and we checked the homogeneity among countries by I^2 statistic, *ie* the percentage of variation attributable to heterogeneity, derived by Cochran's Q [24, 25]. Secondly, we fitted random-effects models even when the homogeneity test did not detect significant heterogeneity among countries: we used DL method taking into account the country as a random effect [26]. This last method had the advantage to make obvious the weight of the relative contribution of each country. We summarized the results in forest plots. We also checked the presence of biases dependant on the number of animals tested using the Egger's regression test and funnel plots [25, 27].

We considered the use of continuity correction to include countries that had not detected any secondary case. According to the literature, two options were tried, the first one consisted in adding systematically a small constant (k=0.01) to all counts, the other one consisted in adding an empirical continuity correction based on the ratio between the size of the two groups to be compared and the crude ORs as proposed in [28]. In both cases the constant added were small in order to restrain the biases on the estimation of the true OR [26]. Since the estimates of the overall OR with continuity correction differed by less than 1% of the value without continuity correction and because the contributions of countries with zero case were negligible, the results using continuity correction were not presented.

AS data were limited to group 1 analyses and all groups of analyses were considered for CS. Again, Ireland was not included in this analysis because different diagnostic procedures applied in active surveillance and in positive flocks and because only group 3 analyses were used.

Authors' contributions

The project was led by PH and coordinated by AF. The design was decided collectively by all the authors; all the authors contributed to the data collection; AF, MN and ST reviewed the control

policy programs; AF, FI and CM analyzed the data; DC, AF, PH, CM, MN, GR discussed the results and all the authors contributed to the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Neuroprion surveillance and control group for funding and generating a meeting place and the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments for hosting a meeting.

We would like to thank all the people in addition to the authors who have been responsible for the data collection and their affiliated institutions.; Stefan Roels Veterinary and Agrochemical Research Centre, Belgium; Søren Bach Rasmussen, Danish Veterinary and Food Administration, Denmark; Peter Lind, National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, Denmark; Patrick Chasset, French ministry of Agriculture, France; Géraldine Cazeau, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, France; Christian Ducrot, Institut National de Recherche Agronomique, France; Helen Koutsoukou-Hartona and Vaia Palaska, National Reference Laboratory for TSEs, Greece; Maire Mc Elroy, TSE National Reference Laboratory of the Department of Agriculture, Fisheries and Food, Ireland;; Maria Cristina Bona, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Italy; Liguria e Valle d'Aosta, Italy; Fred van Zijderveld, Central Veterinary Institute of Wageningen UR, The Netherlands; Leonor Orge, Dr Agrela Pinheiro, Dr Maria José Marques Pinto and Dr Ana Oliveira, Direcção Peral de Veterinária, Portugal.

We thank PL Acutis, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Italy, for sharing his point of view on the results of the survey.

References

1. Detwiler LA, Baylis M: **The epidemiology of scrapie**. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 2003, **22**(1):121-143.
2. Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schönheit J, Tranulis MA, Bratberg B: **Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type Nor98**. *The Veterinary Record* 2003, **153**:202-208.
3. EFSA: **Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in Small Ruminants**. *The EFSA Journal* 2005, **276**:1-30.
4. Benestad SL, Arsac JN, Goldmann W, Nöremark M: **Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology**. *Veterinary Research* 2008, **39**(4):19.
5. European Food Safety Autority: **Scientific Report of the European Food Safety Authority on the Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants**. *The EFSA Scientific Report* 2005, **31**:1-17.
6. European Food Safety Autority: **Scientific Report of the European Food Safety Authority on the Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants (2)**. *The EFSA Scientific Report* 2005, **49**:1-46.
7. Moum T, Olsaker I, Hopp P, Moldal T, Valheim M, Moum T, Benestad SL: **Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases**. *J Gen Virol* 2005, **86**(Pt 1):231-235.
8. Le Dur A, Béringue V, Andréoletti O, Reine F, Lai TL, Baron T, Bratberg B, Vilotte J-L, Sarradin P, Benestad SL *et al*: **A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes**. *PNAS* 2005, **102**(44):16031-16036.
9. Simmons MM, Konold T, Simmons HA, Spencer YI, Lockey R, Spiropoulos J, Everitt S, Clifford D: **Experimental transmission of atypical scrapie to sheep**. *BMC Veterinary Research* 2007, **3**(1):20.
10. Hopp P, Omer MK, Heier BT: **A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks**. *Journal of General Virology* 2006, **87**(Pt 12):3729-3736.
11. Lühken G, Buschmann A, Brandt H, Eiden M, Groschup MH, Erhardt G: **Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases**. *Veterinary Research* 2007, **38**(1):65-80.
12. Onnasch H, Gunn HM, Bradshaw BJ, Benestad SL, Bassett HF: **Two Irish cases of scrapie resembling Nor98**. *Veterinary Record* 2004, **155**:636-637.
13. Fediaevsky A, Tongue SC, Nöremark M, Calavas D, Ru G, Hopp P: **A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries**. *BMC Veterinary Research* 2008, **4**(1):19.
14. Fediaevsky A, Morignat E, Ducrot C, Calavas D: **A case–control study on the origin of atypical scrapie in sheep, France**. *Emerging Infectious Diseases* 2009, **15**(5):710-718.
15. Green DM, Del Rio Vilas VJ, Birch CP, Johnson J, Kiss IZ, McCarthy ND, Kao RR: **Demographic risk factors for classical and atypical scrapie in Great Britain**. *J Gen Virol* 2007, **88**(Pt 12):3486-3492.
16. Simmons HA, Simmons MM, Spencer YI, Chaplin MJ, Povey G, Davis A, Ortiz-Pelaez A, Hunter N, Matthews D, Wrathall AE: **Atypical scrapie in sheep from a UK research flock which is free from classical scrapie**. *BMC Vet Res* 2009, **5**(1):8.

17. European Commission: **Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies**. In. Official Journal of European Communities; 2001: 1-40.
18. European Commission: **Commission Regulation (EC) No 727/2007 of 26 June 2007 amending Annexes I, III, VII and X to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies (Text with EEA relevance)**. *Official Journal of the European Union* 2007, **L165**:8-20.
19. Konold T, Davis A, Bone G, Bracegirdle J, Everitt S, Chaplin M, Saunders GC, Cawthraw S, Simmons MM: **Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report**. *BMC Veterinary Research* 2007, **3**:1-27.
20. Ortiz-Pelaez A, Del Rio Vilas VJ: **Within-holding prevalence of sheep classical scrapie in Great Britain**. *BMC Vet Res* 2009, **5**(1):1.
21. Buschmann A, Biacabe A-G, Ziegler U, Bencsik A, Madec J-Y, Erhardt G, Lühken G, Baron T, Groschup MH: **Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests**. *Journal of Virological Methods* 2004, **117**(1):27-36.
22. Del Rio Vilas VJ, Bohning D, Kuhnert R: **A comparison of the active surveillance of scrapie in the European Union**. *Vet Res* 2008, **39**(3):37.
23. R Development Core Team: **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** *R Foundation for Statistical Computing* 2008.
24. Rothman K.J., Greenland S.: **Meta-analysis**. In: *Modern epidemiology.* 2nd edn. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1998: 643- 673.
25. Higgins JP, Thompson SG: **Controlling the risk of spurious findings from meta-regression**. *Statistics in medicine* 2004, **23**(11):1663-1682.
26. **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions** [www.cochrane-handbook.org]
27. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C: **Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test**. *BMJ (Clinical research ed* 1997, **315**(7109):629-634.
28. Sweeting MJ, Sutton AJ, Lambert PC: **What to add to nothing? Use and avoidance of continuity corrections in meta-analysis of sparse data**. *Statistics in medicine* 2004, **23**(9):1351-1375.

Tables

Tableau 32 : Groups of detection of atypical scrapie according to rapid tests and material usually analysed (according to EFSA 2005)

Group	Sample	Rapid test
1	Brainstem with or without cerebellum or cerebrum	Either BioRad Te-SeE/BioRad Platelia, or BioRad Te-SeE Sheep and Goat, or Idexx HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit, EIA
2	Brainstem and either cerebellum or cerebrum	Either Prionics-Check Western Small Ruminant, or Enfer TSE Version 3, or Enfer TSE Kit version 2.0 or Beckman Coulter InPro CDI, or POURQUIER - LIA Scrapie
3	Brainstem and either cerebellum or cerebrum	Prionics Check LIA Small Ruminants
	Brainstem only	Neither BioRad Te-SeE/BioRad Platelia, nor BioRad Te-SeE Sheep and Goat, nor Idexx HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit, EIA

Tableau 33 : Grouped control strategies reported by countries

§ BE: Belgium, DK: Denmark, FI: Finland, FR: France, GR: Greece, IE: Ireland, IS: Iceland, IT: Italy, NL: Netherlands, NO: Norway, PT: Portugal, SE: Sweden, !: HS: Healthy slaughter, FS: Fallen stock * all males not ARR/ARR and all females carrying a VRQ allele or not carrying an ARR allele, except in Italy where animals with AHQ and AFRQ were also culled and in Portugal where animals with ARR/AHQ genotype were culled but not those with ARH/ARH, ARH/ALRQ or ALRQ/ALRQ, ** all males carrying AHQ or AFRQ alleles, *** all males not ARR/ARR and all females carrying a VRQ allele or not carrying an ARR allele

		Intensified monitoring	Selective culling*	Other selective culling**	Stamping out
AS	Countries§	FR, GR, DK, FI, NO, PT, SE	FR, BE, IE, IT, NL, DK, NO, PT	IT	IE, IT, IS, DK, FI, NO, SE
	Suspect flocks included	FR, GR, DK, FI, PT	FR, BE, IT, DK,	IT	IE, IT, DK, FI
	Contact flocks included	FI, PT	BE, PT		FI, IS
	Stream under surveillance!	HS and FS: all countries	Culled animals: all countries HS in all countries except NL and DK and BE in some years FS in all countries	HS, FS and culled animals	Culled animals in all countries except IE no other stream except HS and FS in FI and FS in DK
	Animals above age limit tested	All animals	All animals except in BE (FS): only some animals	All animals	All animals except in IS: only some animals
	Age limit for testing	18 months except in FR and in the first years in PT and in SE: 12 months	Culled animals: 12 months except in NO: 18 months and in BE (unspecified) other stream 18 months except in FR, IT, NL and in the first years in PT: 12	18 months	12 months except in DK, FI and NO: 18 months
CS	Countries§	FR	FR, BE, GR, IE, IT, NL		GR, IE, IT, IS, NO
	Suspect flocks included	FR	FR, BE, GR, IT		GR, IE, IT
	Contact flocks included		BE		IS
	Stream under surveillance!	HS and FS	Culled animals in all countries HS and FS in all countries except HS in NL and in BE in some years		Culled animals in all countries no other stream except HS and FS in GR
	Animals above age limit tested	all animals	Culled animals: all countries except in BE, IT, NL: only some animals other stream: all countries except in BE: only some animals		All animals except in IE, IT, IS: only some animals
	Age limit for testing	12 months	Culled animals: 12 months except in BE (unspecified) Other stream: 18 months except in FR, IT and NL(FS): 12 months		12 months except in NO: 18 months

Tableau 34 : Prevalence of atypical scrapie (AS) in active surveillance from starting year for detection of AS in active surveillance to 2007

Surveillance stream	Starting year	Country	Cases	Tests	Prevalence (per 10,000)	CI 95%
Fallen stock	2004	Belgium	4	3238	12.4	3.4 - 31.6
	2006	Denmark	3	8177	3.7	0.8 - 10.7
	2004	Finland	4	3924	10.2	2.8 - 26.1
	2002	France	225	304832	7.4	6.4 - 8.4
	2006	Greece	0	7913	0	0 - 4.7
	2005	Iceland	0	152	0	0 - 239.8
	2005	Italy	11	27945	3.9	2.0 - 7.0
	2004	The Netherlands	0	1000	0	0 - 36.8
	2002	Norway	27	21137	12.8	08.4 - 18.6
	2004	Portugal	77	48662	15.8	12.5 - 19.8
	2004	Sweden	7	12434	5.6	2.3 - 11.6
Healthy slaughter	2004	Belgium	2	16109	1.2	0.2 - 4.5
	2006	Denmark	1	2476	4.0	0.1 - 22.5
	2004	Finland	1	5618	1.8	<0.1 – 9.9
	2002	France	190	318333	6.0	5.2 - 6.9
	2006	Greece	3	20467	1.5	0.3 - 4.3
	2005	Iceland	0	10931	0	0 - 3.4
	2005	Italy	32	86745	3.7	2.5 - 5.2
	2004	The Netherlands	0	2719	0	0 - 13.6
	2002	Norway	24	87753	2.7	1.8 - 4.1
	2004	Portugal	168	213923	7.9	6.7 - 9.1
	2004	Sweden	5	12359	4.0	1.3 - 9.4

Tableau 35 : Prevalences of secondary atypical scrapie (AS) cases by control strategy and country from flocks in which the first scrapie animal had either AS or classical scrapie (CS)

Strategy	Country	Cases	Tests	Prevalence (per 10,000)	CI 95%
Intensified monitoring in AS positive flocks	Finland	0	36	0	0 - 973.9
	France	11	14965	7.4	3.7 - 13.1
	Greece	0	67	0	0 - 535.7
	Norway	0	75	0	0 - 480.0
	Portugal	3	4612	6.5	1.3 - 19.0
	Sweden	0	47	0	0.0 - 754.9
Intensified monitoring in CS positive flocks	France	7	31113	2.2	0.9 - 4.6
Selective culling in AS positive flocks	Belgium	0	223	0	0 - 164.1
	Denmark	0	168	0	0 - 217.2
	France	5	10462	4.8	1.6 - 11.1
	Italy	1	2260	4.4	0.1 - 24.6
	The Netherlands	0	60	0	0 - 596.3
	Norway	0	1033	0	0 - 35.6
	Portugal	2	1763	11.3	1.4 - 40.9
Selective culling in CS positive flocks	Belgium	0	295	0	0 – 124.3
	France	4	12087	3.3	0.9 - 8.5
	Greece	3	10310	2.9	0.6 - 8.5
	Italy	2	8565	2.3	0.3 - 8.4
Special genetic selection in AS positive flocks	Italy	0	351	0	0 - 104.5
Stamping out in AS positive flocks	Denmark	0	17	0	0 - 1950.6
	Finland	0	173	0	0 - 211.0
	Iceland	1	467	21.4	0.5 - 118.7
	Italy	1	1309	7.6	0.2 - 42.5
	Norway	0	1156	0	0 - 31.9
	Sweden	0	195	0	0 - 187.4
Stamping out in CS positive flocks	Iceland	0	367	0	0 - 100.0
	Italy	0	3231	0	0 - 11.4
	Norway	0	343	0	0 - 107.0

Tableau 36 : Prevalence of secondary classical scrapie (CS) cases by control strategy and country from flocks in which the first scrapie animal had either atypical scrapie (AS) or CS.

Strategy	Country	Cases	Tests	Prevalence (per 10,000)	CI 95%
Intensified monitoring in AS positive flocks	Finland	0	36	0	0 - 973.9
	France	0	20720	0	0 - 1.8
	Greece	0	67	0	0 - 535.7
	Norway	0	75	0	0 - 480.0
	Portugal	0	4612	0.	0 - 08.0
	Sweden	0	47	0	0 - 754.9
Intensified monitoring in CS positive flocks	France	203	51760	39.2	34.0 – 45.0
Selective culling in AS positive flocks	Belgium	0	223	0	0 - 164.1
	Denmark	0	168	0	0 - 217.2
	France	3	18061	1.7	0.3 - 4.9
	Ireland	0	66	0	0 – 543.6
	Italy	6	2260	26.5	9.7 - 57.7
	The Netherlands	0	120	0	0 - 302.7
	Norway	0	1033	0	0 - 35.6
	Portugal	0	1763	0	0 – 20.9
Selective culling in CS positive flocks	Belgium	7	295	237.3	95.9 – 482.8
	France	658	21438	306.9	284.2 - 330.9
	Greece	1054	10310	1022.3	964.5 - 1082.4
	Ireland	230	11441	201.0	176.1 – 228.4
	Italy	728	11750	619.6	576.6 - 664.7
	The Netherlands	181	4003	452.2	389.9 - 521.2
Special genetic selection in AS positive flocks	Italy	8	352	227.3	98.6 – 442.9
Stamping out in AS positive flocks	Denmark	0	17	0	0 - 1950.6
	Finland	0	173	0	0 - 211.0
	Iceland	0	467	0	0 - 78.7
	Ireland	0	19	0	0 – 1764.7
	Italy	1	1309	7.6	0.2 - 42.5
	Norway	0	1156	0	0 - 31.9
	Sweden	0	195	0	0 - 187.4
Stamping out in CS positive flocks	Iceland	81	3290	246.2	196.0 - 305.1
	Ireland	31	42768	7.2	4.9 – 10.3
	Italy	184	7415	248.1	213.9 - 286.2
	Norway	8	343	233.2	101.2 - 454.4

Figures

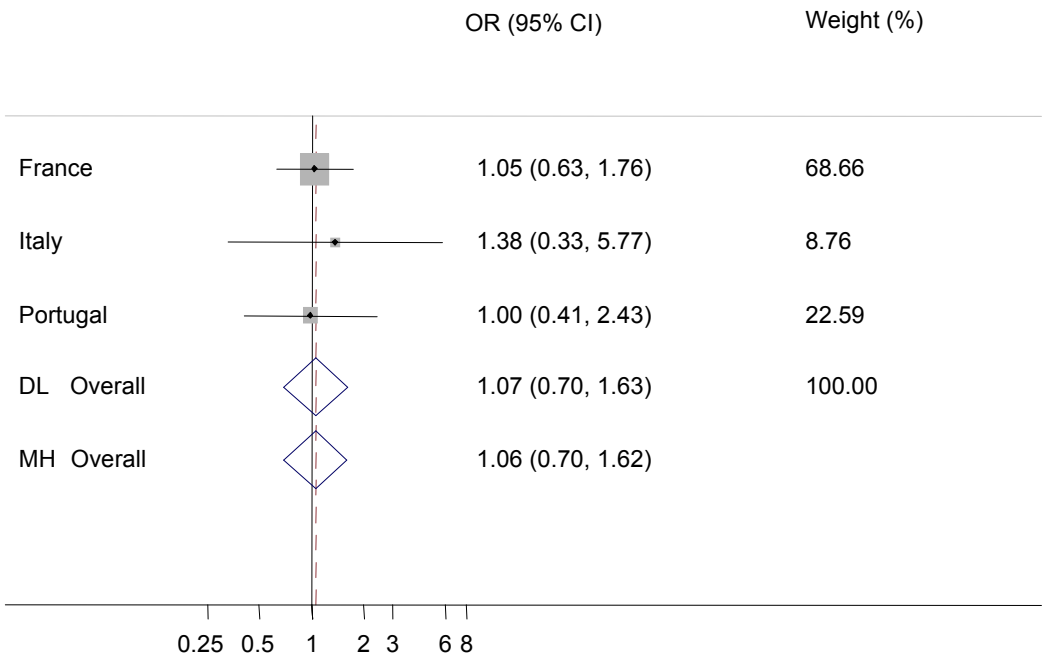


Figure 63: Forest plot for the probability of atypical scrapie (AS) secondary cases in AS positive flocks versus active surveillance in healthy slaughtered animals.

DL: Dersimonian and Laird random effects model, MH: Mantel-Haenszel fixed effects model, Weights are from DL analysis, black dot: country OR, horizontal lines: 95% CI for country OR, grey boxes: country weight, diamond: overall OR with 95% CI, dashed vertical red line: DL overall OR, vertical black line: reference value (1)

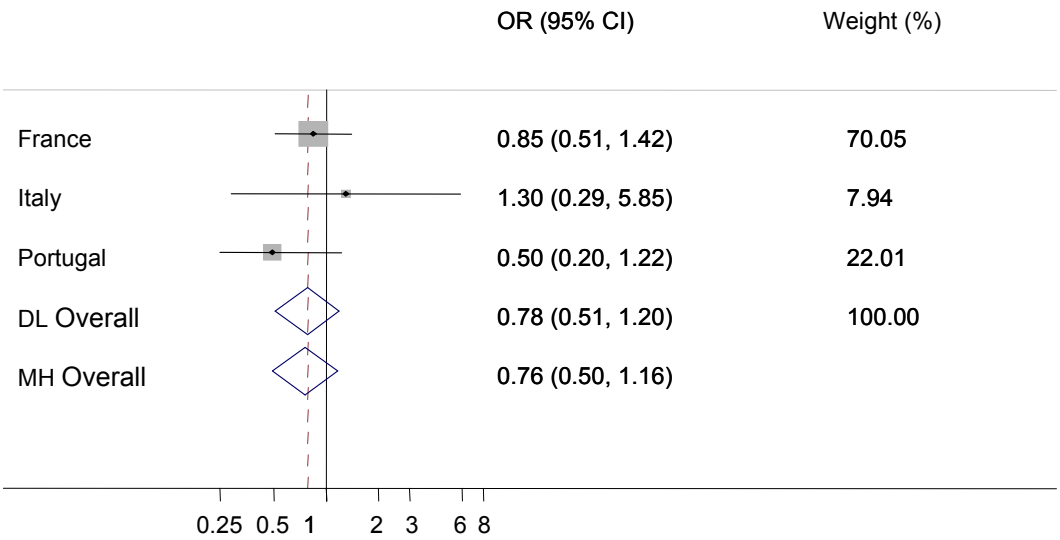


Figure 64: Forest plot for the probability of atypical scrapie (AS) secondary cases in AS positive flocks versus active surveillance in fallen stock animals.

DL: Dersimonian and Laird random effects model, MH: Mantel-Haenszel fixed effects model, Weights are from DL analysis, black dot: country OR, horizontal lines: 95% CI for country OR, grey boxes: country weight, diamond: overall OR with 95% CI, dashed vertical red line: DL overall OR, vertical black line: reference value (1)

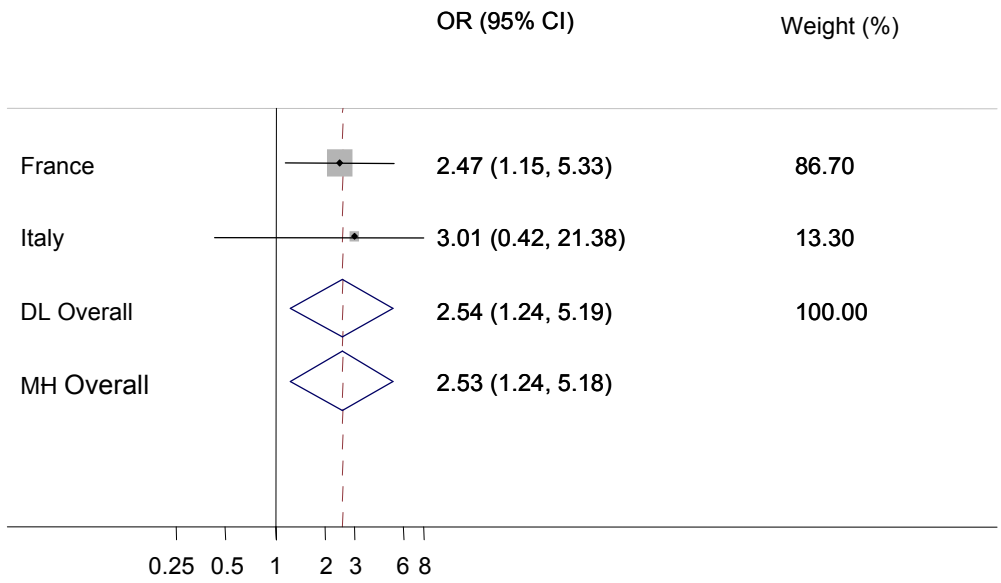


Figure 65: Forest plot for the probability of atypical scrapie (AS) secondary cases in AS positive flocks versus secondary AS cases in classical scrapie (CS) positive flocks.

DL: Dersimonian and Laird random effects model, MH: Mantel-Haenszel fixed effects model, Weights are from DL analysis, black dot: country OR, horizontal lines: 95% CI for country OR, grey boxes: country weight, diamond: overall OR with 95% CI, dashed vertical red line: DL overall OR, vertical black line: reference value (1)

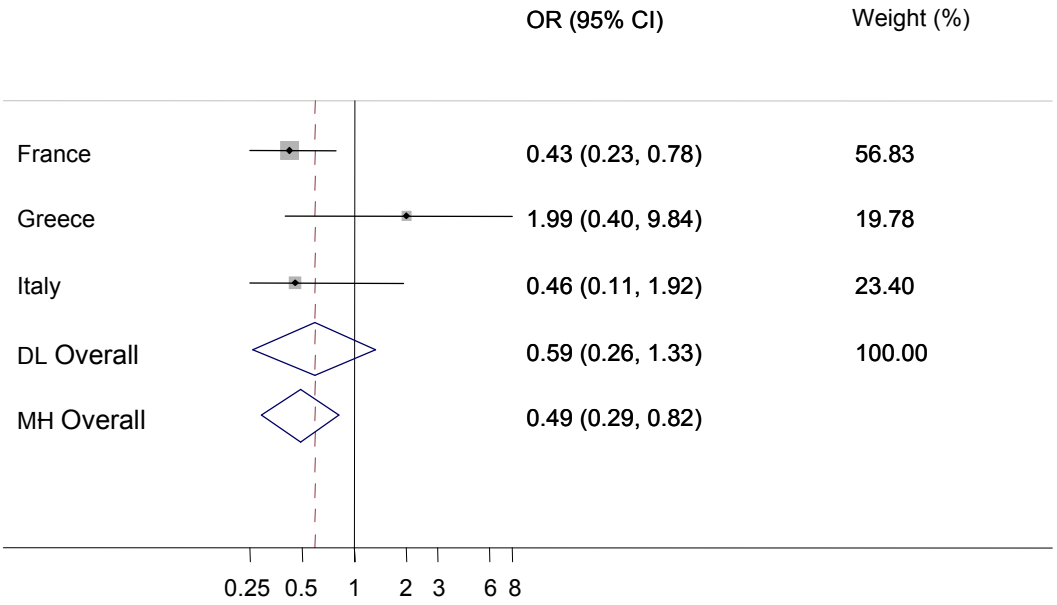


Figure 66: Forest plot for the probability of atypical scrapie (AS) secondary cases in classical scrapie (CS) positive flocks versus active surveillance in healthy slaughtered animals.

DL: Dersimonian and Laird random effects model, MH: Mantel-Haenszel fixed effects model, Weights are from DL analysis, black dot: country OR, horizontal lines: 95% CI for country OR, grey boxes: country weight, diamond: overall OR with 95% CI, dashed vertical red line: DL overall OR, vertical black line: reference value (1)

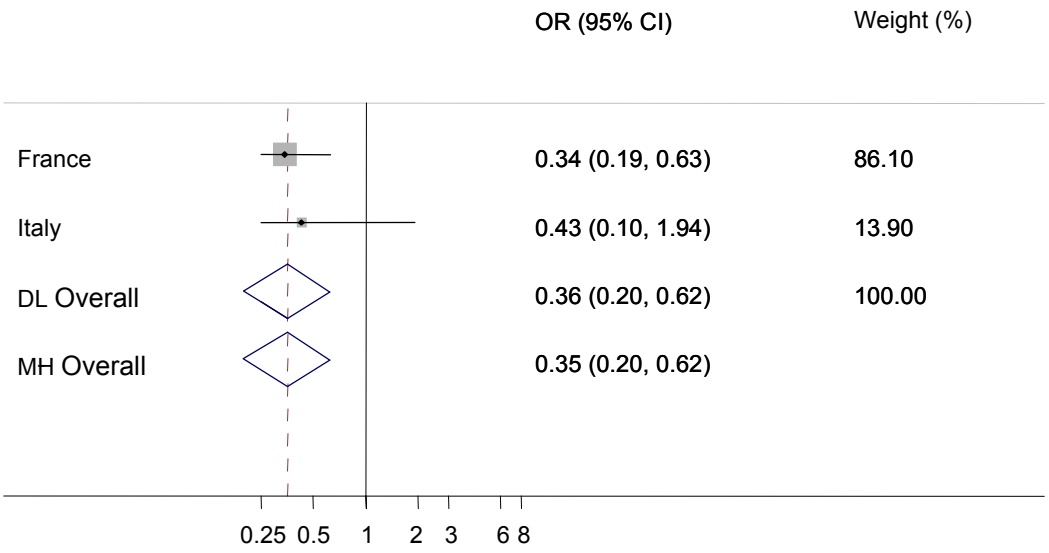


Figure 67: Forest plot for the probability of atypical scrapie (AS) secondary cases in classical scrapie (CS) positive flocks versus active surveillance in fallen stock animals.

DL: Dersimonian and Laird random effects model, MH: Mantel-Haenszel fixed effects model, Weights are from DL analysis, black dot: country OR, horizontal lines: 95% CI for country OR, grey boxes: country weight, diamond: overall OR with 95% CI, dashed vertical red line: DL overall OR, vertical black line: reference value (1)

Chapitre 5 : Discussion générale

5.1. La tremblante atypique, une maladie sporadique ?

Tout semble indiquer que la tremblante atypique est une maladie sporadique qui, si on s'en réfère à la définition du dictionnaire Littré : « *se dit par opposition à épidémique et à endémique, des maladies qui ne sont pas particulières à un pays, qui attaquent des individus et non des masses, et qui sont indépendantes de toute influence épidémique* ».

Il est vrai que la prévalence vraie de la tremblante atypique (de même que celle de la tremblante classique), ne peut pas être correctement déterminée en raison de la sensibilité imparfaite et méconnue des analyses pratiquées (combinaison méthode - type de prélèvement), de la nature particulière des populations échantillonnées (animaux de réforme ou trouvés morts) et de l'existence possible de biais de sélection des animaux dans les programmes. Il n'est pas non plus possible d'utiliser les différents plans de surveillance pour estimer la prévalence par méthode de capture-recapture (Del Rio Vilas, Sayers et al., 2005) car les foyers identifiés par un canal de surveillance (par exemple équarrissage) sont exclus de l'autre canal (par exemple abattoir) du fait des mesures réglementaires. Cependant, les estimations de la prévalence que l'on a obtenues constituent des ordres de grandeur qui reflètent une certaine approximation de la réalité, de l'ordre de six cas pour 10 000 à l'abattoir et de sept à huit cas pour 10 000 à l'équarrissage. Sans être tout à fait identique, la prévalence de la tremblante atypique est assez homogène entre les différentes populations ovines européennes (article 1 et article 6) et au sein de la population française (article 4), y compris dans les troupeaux atteints (article 5 et article 6).

La prévalence de la tremblante atypique est relativement stable dans le temps, contrairement à celle de la tremblante classique (chapitre 2). Le fait que la prévalence de la tremblante classique diminue fortement au cours du temps pendant la période d'étude invite à penser que les mesures de contrôle, pourtant appliquées aux deux maladies, n'ont eu un effet que sur cette forme de tremblante. D'ailleurs, ces mesures n'ont pas permis de détecter plus de cas de tremblante atypique dans les troupeaux qui y ont été soumis que dans la population générale (article 5 et article 6). Rien n'indique que la tremblante atypique soit émergente ou véritablement en déclin. Les fluctuations de la prévalence observées au cours du temps sont de faible amplitude et ne sont pas en faveur d'une augmentation, sauf au Portugal. Une étude au Royaume-Uni a trouvé également qu'il n'y avait pas d'évolution dans le temps de la prévalence de la tremblante atypique dans ce pays (McIntyre, Del Rio Vilas et al., 2008).

La description la plus ancienne d'un isolat de tremblante atypique remonte à 1989 et correspond à une suspicion clinique de tremblante qui n'a que récemment été reclassée comme tremblante atypique (Bruce, Nonno et al., 2007). Ce rapport illustre le fait que la tremblante atypique ait pu coexister avec la tremblante classique sans que l'on s'en soit aperçu. Cependant, la description clinique de la tremblante atypique diffère assez nettement de celle de la tremblante classique (Konold, Davis et al., 2007; Simmons, Konold et al., 2007 ; Benestad, Arsac et al., 2008) pour qu'on puisse s'étonner que l'on n'ait pas fait la distinction au préalable. Plusieurs raisons, non mutuellement exclusives, peuvent être invoquées pour expliquer cela. Tout d'abord, les animaux pourraient être réformés avant l'apparition de signes cliniques, autres que l'amaigrissement et un discret changement de comportement, ou mourir d'une autre cause. Cela est en accord avec la

similitude des prévalences à l'abattoir et à l'équarrissage. Par ailleurs, des signes cliniques non spécifiques comme l'amaigrissement et le changement de comportement pourraient également accélérer la réforme des animaux et contribuer à rapprocher la prévalence à l'abattoir de la prévalence à l'équarrissage, sans qu'il y ait nécessairement d'intention malveillante. Quoi qu'il en soit, il est vraisemblable que les animaux atteints de tremblante atypique, pour leur plus grande part, n'en soient pas morts et cela est à rapprocher de la longue durée de la période d'incubation, de la période de latence clinique et éventuellement de la lente vitesse d'évolution de la maladie, trois paramètres essentiels que l'on ne connaît pas. Il est également possible que certains cas de tremblante atypique aient pu être détectés sur une base clinique mais n'aient pas été confirmés en raison des particularités physiopathologiques et/ou diagnostiques (type de test) que nous avons signalées. Ensuite, il est possible que la tremblante atypique ne fasse pas l'objet d'un diagnostic en élevage parce qu'elle est trop rare et que l'éleveur ne s'inquiète pas d'un seul animal maigre ou au comportement étrange. La maladie étant rare, elle peut également passer simplement inaperçue. Le fait que des tableaux cliniques évocateurs de tremblante classique ont été décrits pour des formes sporadiques ne plaide pas en faveur d'une absence de détection des maladies sporadiques mais les signes cliniques de tremblante atypique sont plus discrets et d'apparition tardive. Il est d'ailleurs possible que parmi la diversité de formes cliniques de tremblante décrites au XIXème siècle (Schneider, Fangerau et al., 2008), certaines aient pu correspondre à la tremblante atypique. Les cliniciens de l'époque auraient été éventuellement d'autant plus à même de l'identifier que leur sens de l'observation était bien développé et que les éleveurs conservaient le plus longtemps possible les animaux productifs. Si l'on admet que la tremblante atypique a été observée par le passé, on peut également s'interroger sur la signification des controverses qui ont porté sur l'origine héréditaire ou contagieuse de la maladie. Il est probable que ces considérations reflétaient la nature duale de la tremblante classique, à la fois contagieuse et ayant un fort déterminisme génétique. Mais il est aussi possible que la coexistence de la tremblante classique, contagieuse, et de la tremblante atypique, peu ou pas contagieuse, ait contribué à alimenter les interrogations. Ceci étant, il est difficile de dépasser le stade des suppositions à partir des descriptions passées.

L'évolution possible de la prévalence de la tremblante atypique dépend de l'évolution des facteurs de risque. A travers notre étude des facteurs de risque et l'étude de l'agrégation des cas, nous avons trouvé que le risque de tremblante atypique ne semblait pas modifié par les facteurs habituellement associés aux maladies infectieuses : les achats d'animaux ou d'aliments, les contacts entre troupeaux ne modifient pas le risque de maladie et les cas ne sont pas agrégés dans l'espace ce qui est en conformité, d'une part avec les résultats des autres études réalisées sur les facteurs de risque de la tremblante atypique, et d'autre part avec l'hypothèse d'une maladie sporadique (Hopp, Omer et al., 2006 ; Green, Del Rio Vilas et al., 2007). Nous avons identifié quelques facteurs d'influence tels que la production laitière, la distribution de CMV, d'ensilage de maïs et l'agriculture biologique mais nous n'avons pas pu proposer des mécanismes biologiques explicatifs convaincants ni formellement écarter l'existence de biais de confusion résiduels. Nous n'avons pas détecté d'augmentation importante de la prévalence dans les foyers ou dans certaines régions en relation avec ces facteurs, ce qui pose question sur leur impact réel. Ils ont pu contribuer aux discrètes variations géographiques du risque relatif mais ces effets modérés nécessitent d'être confirmés. Pour les élevages laitiers, un risque supérieur a effectivement été détecté dans l'étude cas-témoins (OR= 15,06 [3,25 ; 69,73] sans CMV et OR = 2,77 [1,21 ; 6,37]avec CMV) mais également par la prévalence estimée à partir de la surveillance active (OR=1,31 []0,99 ; 1,71) avec une relation moins forte mais qui confirme l'existence d'une association. Le mécanisme biologique sous-jacent n'est pas défini ; l'environnement ne semble pas être en cause car les zones de

production laitière ne sont pas à risque après standardisation de la population sur ce facteur. L'effet de la production laitière pourrait résulter au moins en partie de confusions liées à l'âge et à la génétique. Dans l'enquête cas-témoins, les animaux étaient appariés sur l'âge donc l'effet de la production laitière mesuré ne devrait pas résulter d'une confusion de cet ordre. L'étude cas-témoins prenait également en compte la génétique et nous n'avons pas observé d'effet de confusion entre risque génétique et production laitière ; néanmoins, compte tenu de nombreuses données manquantes, on ne peut pas formellement l'écarter. De façon générale, le facteur de risque principal semble être le génotype PRNP. Sous l'hypothèse que le déterminisme de la maladie est essentiellement génétique et compte tenu de la sélection amorcée des animaux ALRR/ALRR pour lutter contre la tremblante classique, presque aboutie chez les mâles du noyau de sélection de la plupart des races, la prévalence nationale de la tremblante atypique devrait converger de façon asymptomatique vers la prévalence estimée chez les animaux ALRR/ALRR, qui n'est pas différente de celle observée aujourd'hui dans la population générale. Toutefois, si l'on peut s'accorder à dire que la tremblante atypique est sporadique et que sa prévalence restera probablement stable dans l'avenir, la question de son étiologie se pose toujours.

5.2. La tremblante atypique, une maladie endogène ?

En se référant aux principales hypothèses sur l'origine des EST, la tremblante atypique pourrait avoir soit une origine infectieuse, quelle que soit la nature de l'agent, prion ou apparenté virus, soit une origine « spontanée ». Dans le cas d'un prion allogène, la protéine prion normale de l'animal atteint est modifiée par la protéine prion infectieuse acquise. Dans le cas de l'origine spontanée, la protéine prion normale de l'animal atteint est transconformée sans intervention d'une protéine allogène. Cette transconformation peut être facilitée voire conditionnée par la séquence de la protéine prion normale mais peut aussi être facilitée par différents facteurs, c'est pourquoi le terme d'origine endogène serait, de mon point de vue, préférable à celui d'origine spontanée. Les facteurs de régulation de la protéine prion, agissant notamment sur la promotion, pourraient augmenter la probabilité qu'une transconformation aléatoire intervienne par augmentation de l'abondance de la protéine normale, de la même manière que les probabilités de mutation de l'ADN augmentent avec le nombre de divisions cellulaires. Les conditions de stress oxydatif, éventuellement induites par des produits neurotoxiques, pourraient avoir un tel rôle. Des modifications de l'environnement cellulaire impliquant par exemple les ions métalliques et décrites dans le premier chapitre pourraient faciliter la transconformation de la protéine prion normale ; l'alimentation, la race, le stade physiologique pourraient augmenter la probabilité de tels changements. Ces facteurs d'influence pourraient aussi s'exercer dans le cas d'une origine infectieuse. Si la tremblante atypique était une maladie d'origine endogène, la question de sa transmissibilité dans les conditions naturelles se poserait alors, comme elle se pose, d'ailleurs, pour les autres EST réputées d'origine non acquise. Les éléments dont nous disposons nous invitent à penser que si cette transmission existe, elle a un caractère exceptionnel. Aussi, dans l'état actuel des choses, cela n'aurait pas de conséquence sur l'état sanitaire de la population ovine. Néanmoins, la possibilité que des agents infectieux apparaissent *ex-nihilo* est une perspective inquiétante en raison de la possibilité d'évolution de la transmissibilité de l'agent.

Toute hypothèse impliquant une origine endogène repose évidemment sur l'acceptation de la théorie du prion qui, si elle était invalidée, mettrait en défaut un grand nombre de connaissances et de pratiques. Notamment, la notion d'EST spontanée, souvent admise en médecine humaine,

serait à revoir et surtout la gestion du risque associé à ces maladies. Cependant, les études expérimentales relatives à la théorie du prion suggèrent de façon convaincante la possibilité biologique que les EST aient effectivement une dualité étiologique : endogène ou acquise/exogène. La discussion de ces études dépasse le cadre de cette thèse. L'une des critiques régulières de cette théorie est la mise à défaut des postulats de Koch (Manuelidis, 2007). Rappelons ce que postulèrent Koch et Henle en 1884 à propos de l'attribution d'une maladie transmissible à un 'parasite' au sens large (Evans, 1976) :

1) Le 'parasite' est identifiable dans tous les cas de la maladie et dans des circonstances qui permettent de faire le lien avec les changements pathologiques et le développement clinique de la maladie.
2) Le 'parasite' n'est pas identifié dans d'autres maladies en tant qu'hôte commensal.
3) Après isolement du 'parasite' à partir de cas de la maladie et reproduction *in vitro*, son inoculation permet de reproduire la maladie.

Les critiques formulées par Manuelidis (Manuelidis, 2007) peuvent être en partie reprises pour la tremblante atypique. Le premier postulat de Koch n'est, en particulier, pas bien vérifié dans la mesure où la quantité de PrP^{Sc} ne semble pas toujours corrélée au titre infectieux des tissus, voire n'est pas détectée (Le Dur, Béringue et al., 2005; Andréoletti, Herva et al., 2008). Cependant, des limites analytiques dues au manque de sensibilité des méthodes de dépistage de la PrP^{Sc} en cas de tremblante atypique ne peuvent pas être exclues. Rappelons que ces postulats ont été formulés à l'époque pasteurienne et que leur application stricte, ce qui ne semble pas avoir été préconisé par Koch lui-même, aurait ralenti les progrès de la recherche sur les virus (Evans, 1976). En fait, le respect de ces postulats ne doit pas être considéré comme un impératif d'autant qu'ils ne font pas cas de la notion de susceptibilité de l'hôte, de la voie de contamination, de la durée d'incubation des EST, et l'on peut penser qu'une version adaptée aux maladies à prion serait la bienvenue. Walker a proposé la formulation suivante (Walker, Levine et al., 2006) :

1) La protéine dans sa forme pathologique doit être invariablement présente dans les tissus atteints.
2) Les caractéristiques physico-chimiques qui confèrent l'infectiosité d'une protéine spécifique doivent pouvoir être établies (notamment en relation avec la notion de souche).
3) Les caractéristiques qui confèrent sa susceptibilité à un hôte doivent pouvoir être établies.
4) Le développement de la maladie doit pouvoir être induit chez un hôte susceptible par l'agent purifié dans sa forme infectieuse.
5) La protéine doit pouvoir être identifiée dans sa forme infectieuse chez l'animal expérimentalement infecté par l'agent purifié.

Quoi qu'il en soit, la détermination de l'origine de la tremblante atypique fait appel à des connaissances biologiques en grande partie issues des sciences expérimentales et dont on ne dispose pas pour l'instant. Les populations d'animaux malades constituent une source d'informations épidémiologiques, à partir desquelles il est possible de formuler, et de documenter, des hypothèses sur les mécanismes d'une maladie. L'étude de l'épidémie de choléra par Snow à Londres en 1855, 30 ans avant la redécouverte du *Vibrio choleare* par Koch, illustre l'idée que l'identification de l'agent causal et l'identification des facteurs d'apparition de la maladie dans la population peuvent être étudiés séparément (Evans, 1976). De fait, la notion de causalité en épidémiologie n'a pas le même sens qu'en microbiologie.

En 1965, Sir Austin Bradford Hill a considéré un certain nombre de critères permettant de discuter le caractère de causalité d'une relation épidémiologique (Hill, 1965) qui ont été par la suite érigés en préceptes, de façon peut être abusive (Hofler, 2005). Les neufs critères de Bradford Hill sont en substance les suivants :

1) La force de l'association, une association forte suggérant d'avantage un lien causal qu'un effet de confusion.
2) La répétabilité de l'association, mais la variabilité des populations étudiées est souvent responsable de modifications de la mesure de l'effet.
3) La spécificité de l'association, mais ce critère est à considérer avec prudence étant donné que de nombreuses maladies sont multifactorielles et que des causes peuvent avoir des effets multiples. Il convient à cet égard de s'interroger sur le facteur étudié pour savoir s'il intervient dans la chaîne causale d'une autre maladie indépendamment ou pas de son action sur la maladie étudiée.
4) L'antériorité entre l'exposition au facteur présumé causal et l'apparition de la maladie est extrêmement logique.
5) L'existence d'un gradient biologique, ou relation dose-réponse, est indicatrice de relation causale mais n'est pas toujours simple à observer compte tenu de la diversité biologique des relations dose-réponse (courbe en « J » par exemple traduisant l'existence d'une optimum dans la relation).
6) La relation doit être biologiquement plausible mais on ne doit pas censurer d'éventuelles possibilités biologiques jusque là inconnues. A ce titre, l'explication biologique est plus convaincante si elle est proposée avant la mise en évidence d'une relation épidémiologique.
7) L'effet suspecté doit être cohérent avec les connaissances déjà établies, ce critère complète le précédent en confrontant la relation causale au contexte existant qui le précède, invitant davantage à imaginer un mécanisme possible.
8) L'existence de preuves expérimentales conforte la relation mais n'est pas toujours possible.
9) Le raisonnement par analogie avec d'autres situations établies abaisse en quelque sorte le seuil d'acceptation d'une relation causale. Il est ainsi plus facile d'admettre que la tremblante classique ait pu être transmise aux ovins par certains aliments du commerce lorsque l'on sait déjà que l'ESB a été transmise de cette façon aux bovins.

Ces critères constituent une aide au raisonnement épidémiologique, ils suggèrent fortement un lien causal mais, à l'inverse, ce n'est pas parce que ces critères ne sont pas respectés qu'il n'y a pas de relation causale (Hill, 1965). Hill rappelait également que le résultat des tests de significativité n'a pas valeur de preuves. A l'inverse, l'absence de significativité statistique d'une relation n'implique pas l'absence de relation et il est tout aussi important de considérer la force de l'effet mesuré que la valeur de p (Altman and Bland, 1995).

La causalité n'est pas toujours une relation de condition nécessaire et suffisante et peut être plus complexe. Une définition pragmatique de la cause d'une maladie pour l'épidémiologiste est donnée par Michael Kundi (Kundi, 2007) : la cause d'une maladie est un ensemble de conditions mutuellement exclusives par lequel deux (ou plus) populations de sujets, suffisamment semblables par rapport au problème étudié, diffèrent et qui augmentent la probabilité de la maladie. De cette définition, il découle que les points critiques suivants doivent être discutés : l'association entre le facteur et la maladie, l'équivalence des populations comparées et l'équivalence de l'environnement des populations comparées. Il faut aussi, dans la mesure du possible, ne pas se limiter à énumérer

les biais potentiels mais chercher à évaluer leur impact par des analyses de sensibilité (Hofler, 2005; Kundi, 2007).

L'approche épidémiologique est toutefois limitée dans sa capacité à prouver des associations causales puisqu'elle ne procède que par inférence à partir d'observations (Greenland, 1998). Selon la démarche poppérienne, l'observation vise à évaluer une hypothèse formulée, ce qui est opposé à la démarche inductive pour laquelle l'observation conduit à la formulation de l'hypothèse. La conformité entre l'observation et l'hypothèse ne permet pas de démontrer la véracité de l'hypothèse puisque d'autres hypothèses pourraient toujours être formulées, plus ou moins probables, conduisant à la même observation, par exemple en impliquant des effets de confusion. Poussé à l'extrême, le raisonnement poppérien consiste à ne tenir une hypothèse pour vraie que dans la mesure où toutes les hypothèses alternatives auraient été formulées, testées et réfutées ce qui, n'étant pas faisable, bornerait la capacité de l'épidémiologie à réfuter des hypothèses (Greenland, 1998).

Ces considérations épistémologiques ont nourri ma réflexion sur l'hypothèse que la tremblante atypique puisse avoir une origine endogène. Cette hypothèse ne correspond pas à la confirmation d'une hypothèse causale épidémiologique mais se définit davantage par la réfutation de l'hypothèse d'une origine infectieuse, ce qui peut être, en apparence, insatisfaisant mais qui, en fait, s'inscrit bien dans la démarche d'un raisonnement épidémiologique. Cette réfutation est soutenue par chacune de nos études : prévalence relativement homogène dans les différentes populations, y compris celle des élevages atteints, et absence de facteurs de risque associés à la contamination à partir d'animaux ou d'aliments. Par ailleurs, cette hypothèse semble particulièrement accommodante pour expliquer des observations quelque peu contradictoires : maladie présente de façon ubiquitaire mais toujours rare, nombreux facteurs de risque métaboliques ou environnementaux (au sens large) possibles. Elle pourrait faire penser à ces énoncés scientifiques dénoncés par Popper car ils semblent immunisés contre la falsification, dans la mesure où l'on peut toujours justifier le fait qu'ils soient pris en défaut sans les invalider (Popper, 1991). Concrètement, dans notre cas, si par exemple, nous obtenions une faible pénétrance de certains génotypes, cela serait défavorable à l'hypothèse d'une origine endogène mais pourrait se justifier en argumentant que la présence de certains facteurs de risque est nécessaire pour les génotypes les moins sensibles mais pas pour les autres. Pour d'autres auteurs comme P. Feyerabend, les énoncés scientifiques n'ont pas besoin de couvrir l'ensemble des possibilités pour être utiles et l'existence de certains faits contradictoires ne doit pas forcément conduire à leur abandon car ils peuvent couvrir certains aspects de la réalité en attendant d'être complétés par d'autres énoncés (Feyerabend, 1979). En fait, l'hypothèse de maladie endogène répond en partie aux critères de causalité de Bradford Hill :

- force élevée de la relation entre facteurs de risque génétiques et risque de tremblante atypique et association nulle avec l'introduction d'animaux ou d'aliments du commerce ;
- répétabilité de ces résultats dans l'étude de Petter Hopp et al. (Hopp, Omer et al., 2006), dans une moindre mesure celle de Green et al. (Green, Del Rio Vilas et al., 2007) ;
- l'existence d'un gradient biologique pourrait être recherché dans la relation de susceptibilité croissante âge / génotype ;
- la plausibilité biologique repose sur la théorie du prion ;
- la cohérence avec les connaissances actuelles est bonne y compris vis-à-vis des connaissances sur la tremblante avant la distinction des formes classique et atypique comme discuté préalablement ;

- une forme de preuve expérimentale est apportée par la détection de tremblante atypique dans un troupeau expérimental a priori fermé et issu d'animaux a priori indemnes de tremblante et provenant de Nouvelle Zélande (Simmons, Simmons et al., 2009). Une plus forte preuve expérimentale pourrait être apportée par la reproduction spontanée de la maladie chez des souris transgéniques sur-exprimant les allèles les plus sensibles ;
- l'analogie a déjà été établie avec certaines EST humaines (Benestad, Sarradin et al., 2003; Benestad, Arsac et al., 2008) ;
- la spécificité et l'antériorité sont difficiles à définir dans ce cas.

D'un point de vue biologique, les études sur les prions montrent que les changements de conformation de la protéine prion normale vers une forme pathogène sont plausibles. Cependant, les relations entre ces changements à l'échelle cellulaire, qui restent en partie à confirmer, et l'apparition de la maladie chez l'individu sans exposition contaminante sont loin d'être élucidées. Un pont entre les sciences expérimentales et l'épidémiologie reste à construire pour établir l'origine de la tremblante atypique. La longueur de ce pont en terme de concepts ou de connaissances n'est pas connue et il ne pourra peut être exister qu'à l'issue de nouvelles découvertes.

L'hypothèse d'une maladie d'origine purement infectieuse implique le maintien d'un cycle de contamination. Si l'on écarte la voie alimentaire sur les bases des études cas-témoins et des mesures de contrôle, la contamination se ferait plus logiquement à proximité des animaux infectés. Comme cela a déjà été discuté dans la plupart de nos articles, l'homogénéité de la prévalence et du risque relatif entre les sous populations au niveau du pays ou au sein de la population ovine française, le fait que les cas secondaires soient rares tant dans les foyers français qu'européens, et le fait que les achats d'animaux ne soient pas associés à une augmentation du risque plaident en défaveur d'une contagiosité. Par conséquent, si l'hypothèse de contagiosité était valide cela impliquerait une mise en défaut de nos études ce qui n'est pas impossible compte tenu des limites qui leurs sont imparties.

5.3. Limites des études entreprises

Le fait d'avoir étudié l'épidémiologie de la tremblante atypique sous plusieurs angles permet de dresser un tableau synthétique assez complet. Cela augmente aussi la force de conviction de chaque étude dans l'idée que cette maladie pourrait ne pas être contagieuse, malgré leurs limites propres qui ont été discutées au fur et à mesure des articles. Toutefois, la plupart des études reposent sur l'exploitation de données collectées par la surveillance active ou les mesures de contrôles et sont confrontées à un certain nombre de difficultés communes dont nous allons maintenant discuter la portée.

5.3.1. Qualité des données

La mauvaise qualité des données tient à plusieurs phénomènes :

- l'existence de biais de sélection dans les programmes de surveillance ;
- la récolte insuffisante d'informations sur les animaux testés ;
- la gestion inappropriée des données récoltées.

Les biais de sélection existent dans tous les programmes de surveillance et sont communs au différents pays européens, ils ont été évoqués au fur et à mesure des articles et les principaux sont rappelés ici :

- A l'abattoir, les animaux n'ont pas la même probabilité d'être testés en fonction du jour, voire de l'heure d'introduction. Il semble que ce biais soit principalement rencontré dans les sites de prélèvements où le nombre d'ovins adultes est trop faible pour organiser un prélèvement séquentiel (un test toutes les x carcasses) plus propice à l'échantillonnage aléatoire. Il est difficile de juger a priori du sens et de l'impact de ce biais. Au pire des cas, on peut imaginer que certains éleveurs fassent volontairement abattre leurs animaux en dehors des créneaux de dépistage, ce qui conduirait à une sous estimation de la prévalence.
- Les animaux maigres ou suspects sont davantage testés à l'abattoir comme à l'équarrissage, ce biais tend à surestimer la prévalence mais on peut difficilement en quantifier l'importance.
- Les animaux mal identifiés sont moins régulièrement testés, ce biais a eu tendance à diminuer au cours du temps, de plus nous n'avons pas détecté de différence de prévalence en fonction de l'identification.
- Les carcasses provenant de certaines zones d'accès difficile sont moins testées parce que le service d'équarrissage est moins efficace. La relative homogénéité géographique du risque relatif de tremblante atypique n'invite pas à considérer que ce biais ait pu avoir une forte influence sur la détermination de la prévalence globale. Par contre, pour la tremblante classique, l'influence de ce biais reste inconnue.
- Les animaux peuvent être testés de façon préférentielle en fonction de leur dentition, les animaux plutôt âgés peuvent être davantage testés, ce qui conduit à une surestimation de la prévalence. Ce biais peut être partiellement corrigé en standardisant ou en ajustant les analyses sur la classe de dentition (voir p. 240).
- La répartition mensuelle des tests peut ne pas refléter la répartition mensuelle des animaux abattus ou équarris. Ce biais aura pour principal conséquence de modifier l'âge des animaux testés et peut donc être pris en compte comme précédemment.
- Pour l'abattage sanitaire, un biais volontaire de sélection génétique, et dans une moindre mesure d'âge, serait en mesure d'entraîner une sous estimation de la prévalence de tremblante atypique et une surestimation de la prévalence de la tremblante classique. De plus, les défauts d'identification des animaux restreignent les possibilités d'établir la correspondance entre les résultats de génotypage et les résultats des tests rapides.
- Pour la surveillance renforcée, telle qu'elle est pratiquée en France, l'inclusion des troupeaux de passage de l'animal infecté entraîne une sous estimation de la prévalence par effet de dilution des animaux issus du troupeau cas parmi des animaux issus d'un plus grand nombre de troupeaux.

Les conséquences de ces biais sont parfois contradictoires et difficiles à prendre en compte dans nos analyses.

Peu d'informations étaient finalement disponibles sur les animaux testés. L'estimation de l'âge par la dentition, de la race et du sexe par examen visuel de la tête sont d'une précision bien limitée. Nous n'avons pas exploité les données de race et de sexe. Les données sur l'identification sont parfois manquantes ou erronées et ne renseignent pas sur l'origine précise de l'animal mais plutôt sur l'exploitation dans laquelle il a été immatriculé. Il aurait été fort intéressant de disposer d'informations sur les animaux : état corporel, cause présumée de la mort, génotype, date de

naissance précise, race, sexe, cheptel introducteur et cheptel dernier détenteur mais aussi sur les exploitations : type de production, effectifs, localisation précise. L'obtention de ces informations n'est pas possible à l'heure actuelle mais elle n'est pas utopique puisque la mise en place de la réglementation européenne devrait contribuer à rapprocher le standard des données disponibles pour les ovins de celui existant pour les bovins.

Il est regrettable que le mode de gestion des données ait contribué à détériorer leur qualité. Cela provient essentiellement de deux causes : d'une part le fait que la BNEST n'a pas été conçue pour gérer la surveillance des EST des petits ruminants mais celle de l'ESB chez les bovins et d'autre part le fait que les laboratoires départementaux ne partageaient pas le même format d'échange de données. La principale conséquence de cela est une perte de la qualité de l'information sur le plan de la surveillance et de l'attribution des numéros de foyer. En particulier, des animaux testés dans le cadre du CSO et de la surveillance renforcée (APMSAB, APMSEQ) ont été affiliés à de la surveillance active à l'abattoir et à l'équarrissage. Les cas ont été toujours retracés par la DGAl et l'on peut penser qu'à partir de 2003, cette mauvaise classification n'a pas ou peu entrainé de sur estimation de la prévalence à l'abattoir et à l'équarrissage. En revanche les animaux négatifs contribuent à faire baisser ces prévalences et réciproquement à surestimer la prévalence en police sanitaire. Pour éviter cette surestimation, nous avons attribué les tests réalisés sur des animaux provenant de troupeaux sous mesures de contrôle aux foyers, ce qui a pu contribuer à sous-estimer la prévalence. Depuis 2007, la DGAl a conduit une réflexion sur l'amélioration du système de gestion des données qui s'est traduite par la mise en place d'une base de données pour le suivi des foyers, utilisée depuis le second semestre 2008 mais les modifications prévues de la BNEST n'ont pas encore eu lieu. Une amélioration du format d'échange, permettant notamment d'identifier les plans de surveillance CSO, APMSAB et APMSEQ, a été proposée aux laboratoires en 2007, mais ces derniers ne l'ont pas encore tous mise en œuvre.

5.3.2. Sensibilité du dépistage

L'ensemble des dispositifs de dépistage présentent un manque de sensibilité important conduisant à une sous-estimation de la prévalence en raison du système d'analyse.

Tout d'abord, les méthodes de dépistage ne sont pas toutes capables de détecter la PrP^{Sc} de la même façon, notamment en fonction du type de traitement dénaturant appliqué à l'échantillon (European Food Safety Autority, 2005a). Nous n'avons donc considéré que les tests présentant la meilleure sensibilité (European Food Safety Autority, 2005b; European Food Safety Autority, 2005c) mais celle-ci n'est pas précisément connue et nous n'avons pas différencié les tests BioRad et Idexx, pour lesquels il n'y avait d'ailleurs pas de différence de prévalence de tremblante atypique ou classique. Nous n'avons pas de raison de penser que les différents laboratoires ont eu des conditions d'utilisation des tests qui différaient, ce qui est par ailleurs attesté par les essais inter laboratoires mis en œuvre chaque année par le LNR. Précisons toutefois que les essais inter laboratoires n'incluent pas d'échantillons de tremblante atypique (Anne-Gaëlle Biacabe, communication personnelle).

De façon plus problématique, le tronc cérébral n'est pas le prélèvement de choix comme l'ont montré plusieurs études (Benestad, Sarradin et al., 2003; Buschmann, Biacabe et al., 2004; Buschmann, Lühken et al., 2004; Gavier-Widen, Nöremark et al., 2004; Onnasch, Gunn et al., 2004). Il est toutefois difficile de quantifier l'importance de cette sous estimation ; pour cela il

faudrait disposer de valeurs de sensibilité pour les tests employés, ce qui jusque là n'a pas été mis en œuvre par l'AESA (European Food Safety Autority, 2005b; European Food Safety Autority, 2005c). Cela impliquerait d'analyser un nombre important de différents prélèvements de SNC issus de cas de tremblante atypique. Une telle collection est difficile à constituer vu que la maladie est rare et que la plupart des pays détectent les cas uniquement à partir d'échantillons de tronc cérébral, elle serait cependant d'une grande utilité.

Comme mentionné au début, il est possible que la sensibilité soit différente à l'équarrissage. Soit parce que les prélèvements effectués sur des animaux morts depuis plusieurs jours seraient moins spécifiquement ciblés sur le tronc cérébral et pourraient inclure une portion de cervelet, soit parce que la PrP^{Sc} serait altérée. Cependant, on n'a pas détecté d'effet de l'état de conservation du prélèvement et ce biais est sans doute mineur.

La principale conséquence du défaut de sensibilité est une sous estimation de la prévalence. Si ce biais de classement est similaire dans les différentes sous populations, les ratios que nous avons établis pour comparer les prévalences ne sont pas biaisés. Les variances associées à ces ratios le sont cependant. Les conclusions des tests paramétriques impliquant des comparaisons de prévalences, et proches du seuil de significativité, doivent donc être considérées avec prudence. Les similitudes des prévalences entre les animaux issus de la surveillance active et ceux issus des troupeaux sous mesures de contrôle que nous avons calculées dans l'article 5 et l'article 6 ne suggéraient pas que nos conclusions proviennent d'un biais de ce type car les ratios entre prévalences étaient centrés sur une valeur proche de un. Pour l'analyse spatiale, il est possible que ce défaut de sensibilité ait influé sur la détection des cercles de Kulldorff. La puissance de cette méthode est cependant davantage affectée par la répartition des cas, notamment en raison de l'utilisation de fenêtres circulaires, que par leur nombre (Martin, Toshiro et al., 2003). L'analyse bayésienne a montré qu'il y avait une faible variation spatiale du risque relatif de tremblante atypique, cela indique que l'hétérogénéité spatiale de l'utilisation des tests BioRad/Idexx n'aurait pas biaisé de façon importante la prévalence nationale discutée dans le chapitre 2.

Pour pallier le manque de sensibilité d'une partie des tests rapides, nous avons utilisé différents dénominateurs pour l'étude de la tremblante atypique et de la tremblante classique. Cela peut avoir eu deux principales conséquences : d'une part un défaut de comparabilité des populations testées pour la tremblante atypique et celles testées pour la tremblante classique et, d'autre part, une différence de puissance des tests comparant les deux types de maladies. Pour le premier point, il convient de relativiser le biais introduit, comme en témoigne le fait qu'il y a dans tous les départements une certaine proportion d'animaux testés par les tests BioRad/Idexx (Figure 19 et Figure 22). En effet, même si les animaux d'un élevage donné sont toujours collectés par le même équarrissage, les prélèvements réalisés dans chaque équarrissage sont le plus souvent répartis entre plusieurs LDA. Concernant les animaux de réforme d'un élevage donné, ils sont souvent abattus dans différents abattoirs. De plus, la plupart des LDA sont agréés pour plusieurs tests et utilisent des tests différents en fonction de la succession des lots.
Concernant la différence de puissance, il est exact que les comparaisons des prévalences de tremblante classique ont bénéficié d'une meilleure puissance que celles de tremblante atypique, cependant il est peu probable que cela ait modifié le sens de nos résultats car le nombre de tests est très élevé pour les deux maladies et les valeurs des prévalences de tremblante atypique comparées entre les différentes populations étaient effectivement très proches. Il est possible que cela ait eu une influence pour la détection des agrégats par la méthode de Kulldorff mais cela n'est pas

suggéré par la cartographie du risque relatif à l'exception éventuellement d'une zone à risque légèrement élevé à l'est de l'Aveyron à laquelle ne correspond pas d'agrégat. Le gain de précision sur la situation de la tremblante classique et la faible importance de ce biais justifient, selon nous, l'utilisation d'un jeu de données différent pour chaque maladie.

5.3.3. Limites liées aux autres facteurs non pris en compte

Du fait de la rareté des cas de tremblante atypique ou classique, les études faisant appel à des tests statistiques inférentiels ont pu être confrontées à un manque de puissance. Pour y pallier, les données ont été souvent groupées dans le temps ou dans l'espace, par exemple, en intégrant des données provenant d'autres pays ou en regroupant plusieurs années d'échantillonnage. Ce type d'approche requiert toutefois que certaines précautions soient prises en raison du caractère éventuellement peu miscible des différentes sources de données. Lorsque les données diffèrent en fonction des sources ou lorsque l'on a des raisons a priori de suspecter des différences, il convient de prendre en compte ces sources d'hétérogénéité. Des méthodes d'ajustement par effet fixe ou aléatoire comme cela est pratiqué dans les études multicentriques ont été employées dans l'article 1, l'article 3 et l'article 6 et une stratification a été utilisée dans l'article 4. Toutefois, il est vraisemblable que la prise en compte de ces facteurs reste imparfaite et il n'est pas possible de prendre en compte l'ensemble des caractéristiques par lesquelles diffèrent les populations comparées.

De même, les résultats obtenus dans le modèle de régression logistique développé dans l'étude cas–témoins de l'article 2 peuvent en partie résulter d'effets de confusion qui n'auraient pas entièrement été pris en compte. Le résultat le plus suspect serait sans doute le facteur production laitière qui ne correspond pas une hypothèse biologique simple ni triviale et qui est très corrélé au nombre d'animaux testés. Il est possible que cet effet résulte d'un biais associé à la surveillance des animaux issus des troupeaux laitiers : âge, génotype, canal de surveillance et nombre d'animaux testés et que l'ajustement ait été insuffisant pour gommer ces effets. Il pourrait également s'agir de facteurs environnementaux au sens large mais l'analyse spatiale ne plaide pas pour cette hypothèse. Pour la dernière étude que nous avons réalisée, correspondant à l'analyse de la distribution spatiale, nous avons pu utiliser la variable type de production du troupeau d'origine (laitier-allaitant), donnée qui n'était pas disponible pour les études précédentes. Cependant l'effet propre n'en a pas été mesuré. La recherche d'agrégats, sans standardisation ou ajustement n'a pas abouti à la détection d'agrégats en zone de production laitière ce qui invite à penser que le sur-risque chez ce type d'animaux résulte d'un effet de confusion lié à la surveillance. Pour étudier la distribution spatiale du risque, nous avons standardisé les populations sur les facteurs disponibles et influençant la surveillance. La carte obtenue ne montrait pas d'élévation du risque dans la zone de production laitière (la carte sans standardisation sur la production laitière n'étant pas très différente). Ceci indique que l'effet du type de production ne proviendrait pas d'un effet environnemental au sens large mais pourrait résulter d'un facteur démographique, notamment la génétique et l'âge, ou de conditions d'élevage propres aux élevages laitiers qui resteraient à identifier, cette dernière hypothèse étant plus en accord avec les résultats de l'étude cas-témoins où l'effet de l'âge était contrôlé et celui de la génétique partiellement ajusté. L'effet protecteur marqué des CMV chez les animaux issus de troupeaux laitiers indiquerait que des aspects métaboliques pourraient être en jeu. De fait les conditions physiologiques des brebis laitières, surtout en système intensif, sont souvent extrêmes pour les organismes et susceptibles d'engendrer de nombreux déséquilibres qui pourraient éventuellement accroître la susceptibilité des animaux.

5.3.4. Effet de l'âge et du génotype

A l'échelle de l'animal, la sensibilité du diagnostic est également fonction du stade de la maladie. L'âge élevé des cas détectés invite à penser que les animaux atteints, testés avant un certain âge, ne sont pas détectés. La période d'incubation de la tremblante atypique pourrait varier en fonction du génotype, comme pour la tremblante classique. Le génotype pourrait également influencer la localisation de la PrP^{Sc}, bien que cela n'ait pour l'instant pas été décrit (Benestad, Arsac et al., 2008).

Nous avons détecté des fluctuations de la prévalence en fonction de l'âge des animaux, allant vers une augmentation du risque avec l'âge. Des différences d'âge des animaux testés peuvent exister en fonction des systèmes de production, notamment entre système allaitant et laitier et ces différences ne peuvent pas être correctement prises en compte par la simple dentition qui n'est pas toujours un indicateur fiable (Cocquyt, Driessen et al., 2005) et qui ne permet pas de différencier des classes d'âge parmi les animaux ayant huit incisives définitives. Ce biais ne peut pas être complètement exclu, toutefois dans la mesure où il conduit à accentuer les différences entre sous populations et que les différences que l'on observe sont limitées, on peut penser que, d'une part, il n'est pas quantitativement important et que, d'autre part, il ne modifierait pas le sens global de nos conclusions. Une meilleure prise en compte de l'âge permettrait possiblement de réduire l'écart de risque observé entre animaux de type laitier et ceux de type allaitant. Dans l'analyse spatiale, la population étudiée a été standardisée sur le type de production aussi, l'effet d'une telle différence doit avoir été pris en compte.

Nous n'avons pas pu prendre en compte la structure génétique des populations testées et cela pour plusieurs raisons. La première est que les génotypes n'ont été déterminés que pour les codons 136, 154 et 171. Pour une étude se situant au niveau de la population générale, nous avons pallié ces données manquantes en utilisant les données issues d'une autre étude (article 3). Nous avons pris en compte l'incertitude associée à cette méthode par inférences multiples et nous avons pu estimer des prévalences de tremblante atypique par génotype. Ces estimations n'étaient cependant pas assez précises pour calculer de façon fiable la prévalence par génotype et par dentition, de plus elle reposait sur l'hypothèse d'une homogénéité de l'exposition, raison pour laquelle nous n'avons pas procédé à la même estimation pour la tremblante classique. Ces hypothèses semblent confirmées par l'analyse spatiale. Pour celle-ci nous n'avons pas pu ajuster sur la structure génétique de la population car l'échantillon témoin génotypé était trop petit pour permettre une analyse précise sur le plan géographique et, par ailleurs, l'existence d'une hétérogénéité spatiale de la structure génétique des populations ovines est trop importante pour autoriser une inférence à partir d'une population générale. Pour l'analyse des données de police sanitaire, le rapprochement entre le génotypage et le résultat du test est très incertain. Pour l'enquête cas-témoins, il aurait été préférable d'apparier également sur la génétique des animaux mais nous n'avions pas les données pour le faire. Nous avons donc pris en compte le niveau de susceptibilité génétique par ajustement. Les résultats obtenus suggéraient que la susceptibilité génétique n'agissait pas comme facteur de confusion, toutefois nous n'avons pas pu obtenir les données pour tous les animaux et même si nous avons pu traiter les données manquantes par imputations multiples, une prudence est de mise vis-à-vis de nos conclusions.

Les conclusions de nos études vont globalement vers une absence de contraste de la prévalence de tremblante atypique entre les différentes sous-populations comparées. Le fait de ne pas avoir pris en compte la structure génétique des populations affecterait ce résultat si des différences de

structure génétique entre les populations étaient responsables de différences de prévalence mais qu'elles soient compensées par la présence d'autres facteurs de risque. Ceci n'est pas suggéré par les différentes études sur les facteurs de risque de la tremblante atypique qui indiquent qu'il y a peu de facteurs de risque au niveau des populations (Hopp, Omer et al., 2006; Green, Del Rio Vilas et al., 2007; Fediaevsky, Morignat et al., 2009). L'absence de contraste observée pourrait suggérer que les sous populations diffèrent finalement assez peu, sans doute du fait que la plupart des génotypes sont sensibles et que les génotypes les plus sensibles sont relativement rares. Ainsi, globalement, l'espérance du nombre de cas des différentes populations serait comparable.

Il serait cependant souhaitable de connaître la pénétrance spécifique par âge et par génotype. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences d'âge des cas en fonction du génotype dans le chapitre 2, ni dans l'article 3, mais nous n'avions pas nécessairement toutes les données nécessaires pour étudier cette relation dans de bonnes conditions. Pour considérer cet aspect il faudrait disposer de données fiables et précises sur l'âge des cas, de courbes de survie des différentes catégories d'animaux et de leur génotype aux codons 136, 141, 154 et 171. Une telle étude pourrait éventuellement reposer sur un travail de modélisation qui pourrait constituer une perspective intéressante à nos travaux.

5.3.5. Prise en compte de la fenêtre temporelle

Nous avons étudié l'épidémiologie de la tremblante atypique sur une fenêtre de temps de cinq à six années en fonction des études, ce qui est court par rapport à ce que pourrait être le temps d'incubation de la maladie. Cela a plusieurs types d'implications sur nos études.

Nous avons conclu que l'évolution dans le temps de la prévalence de la tremblante atypique n'était pas épidémiologiquement significative et pouvait être le fait de fluctuations aléatoires, par exemple, liées à l'âge des animaux testés, notamment pendant les premières années de surveillance. Il faudrait cependant disposer d'un plus grand nombre d'années d'observation pour être certain que la prévalence de la tremblante atypique soit stable, lorsque l'âge de la population testée l'est également. D'après nos estimations, les modifications de la structure génétique de la population ne devraient pas entraîner de modifications importantes de la prévalence, mais là aussi ces estimations supposent que les conditions de mesure de la maladie soient stables.

Dans l'étude cas-témoins nous avons pris en compte l'âge des animaux en appariant les cas et les témoins sur leur année de naissance. De ce fait, nous avons pu enquêter sur une grande fenêtre de période d'exposition, l'année de naissance de certaines paires de cas et de témoins étant relativement lointaine. Cela a pu nuire à la mesure de l'exposition du fait du biais de mémoire. Même si en encourageant le recours aux documents d'élevage nous avons essayé de minimiser ce biais, il ne peut être complètement exclu. Le fait d'avoir exploité une longue fenêtre d'exposition est cependant plutôt un avantage et le fait que nous n'avons pas constaté de variation de l'association entre la maladie et les facteurs étudiés avec la période de naissance, notamment les achats d'animaux et d'aliments, ne tend pas à indiquer que c'est en raison d'une fenêtre d'étude trop courte que nous n'avons pas constaté d'effet pour ces facteurs.

Pour les études de la contagiosité de la tremblante atypique, on peut craindre que le temps de surveillance ne soit pas suffisant pour voir émerger des cas secondaires issus du cas index, ou contaminés par des cas non détectés et antérieurs au cas index. Vu les différents résultats sur la contagiosité de la tremblante atypique, on peut raisonnablement admettre que si celle-ci existe,

elle est très modérée, la maladie étant rare dans la population générale et dans les élevages atteints. Si la maladie était contagieuse dans les conditions naturelles, la modalité de transmission la plus attendue serait une transmission verticale ou pseudo verticale, dont la probabilité de succès augmenterait avec l'âge de la brebis infectée. Cette modalité serait en effet compatible avec la présence d'un très faible nombre de cas dans les troupeaux atteints. Sous l'éventualité d'une telle transmission, au moment où le troupeau est détecté, il y a davantage de chances que les animaux contaminés soient encore jeunes et qu'ils ne puissent être détectés positifs que de nombreuses années plus tard, s'ils ne sont pas morts d'une autre cause entre temps. Seul un suivi de cohortes long et rigoureux de troupeaux atteints permettrait de détecter de tels cas secondaires. Afin de maximiser les chances de détection, on pourrait envisager d'analyser des prélèvements de SNC plus complets que le tronc cérébral mais dans ce cas la prévalence observée dans ces troupeaux ne serait plus comparable à celle issue de la population générale. Cela se justifierait car peu d'enseignements supplémentaires par rapport à l'article 5 et à l'article 6 pourront être tirés de la comparaison entre les prévalences estimées à l'abattoir et à l'équarrissage et les prévalences estimées dans les troupeaux atteints, même avec les limites de ces études. Cela d'autant plus que l'on se dirige vers un allègement des programmes de surveillance qui implique une moindre précision des prévalences estimées et un nombre plus limité de foyers détectés d'où une réduction importante de la puissance statistique pour mettre en évidence d'éventuelles différences. La problématique d'étude se déplace d'une comparaison de prévalences vers l'apparition de cas secondaires dans des groupes à risque. Cependant, l'étude de cohorte devrait se donner également les moyens de distinguer les cas secondaires issus d'une transmission de ceux issus d'une origine endogène de la maladie. Cette distinction serait vraisemblablement difficile à opérer. Une approche pourrait reposer sur l'établissement de filiations des animaux et de leur génotype aux codons 136, 141, 154 et 171. Si un lien de maternité était observé significativement plus fréquemment entre cas secondaires, cela indiquerait une possible origine contagieuse, et cela d'autant plus que les mères et leurs produits auraient une susceptibilité génétique différente et que des animaux de génotypes sensibles présents dans l'élevage resteraient indemnes. Toutefois, ce type de protocole serait extrêmement lourd à mettre en œuvre et à exploiter et impliquerait d'intégrer une composante de recherche à la police sanitaire de la tremblante atypique, éventuellement sur une base volontaire.

Par ailleurs, nous aurions pu étudier la distribution temporelle de la tremblante atypique via l'étude de série temporelle mais, pour avoir commencé ce type d'approche, il est apparu que le faible nombre de cas et les fluctuations temporelles du taux de sondage en fonction des différents sites rendaient délicat cette approche par rapport à ce que la qualité des données nous laissait espérer gagner comme information.

Globalement, nous avons exploité les données dont nous disposions avec des analyses relativement simples, et lorsque nous étions en mesure de le faire, nous nous sommes attachés à prendre en compte les biais que nous avions identifiés. Certaines limites méthodologiques communes aux différentes études n'ont pas fait l'objet de traitements statistiques (ajustement, analyse de sensibilité). Nous les avons discutées et si elles conduisent à une certaine prudence, nous ne considérons, toutefois, pas qu'elles remettent en cause nos résultats.

5.4. Quelle gestion du risque de tremblante atypique ?

La justification du financement d'études épidémiologiques fait fréquemment appel à leur valorisation pour l'analyse ou la préconisation de politiques sanitaires (Jackson, Lee et al., 1999).

Cela semble d'autant plus légitime lorsque l'auteur ou la structure de recherche est impliquée dans la gestion ou l'évaluation du risque sanitaire.
L'AFSSA, en tant qu'agence d'évaluation, a une implication forte sur la gestion du risque des EST animales et dispose à cet égard d'un comité d'experts spécialisés, lui-même doté d'un groupe de travail permanent et portant sur l'épidémiologie des EST animales. Entre sa création et 2007, l'AFSSA a ainsi répondu à plus de 170 saisines portant sur les EST issues d'un des ministères de tutelle ou d'auto-saisines et elle a répondu de plus à un certain nombre de demandes d'appui scientifique et technique. Seules deux contributions traitent spécifiquement de la tremblante atypique, la saisine 2004-SA-0045 « concernant la mise en évidence de résultats positifs aux tests de dépistage de la tremblante chez des ovins de génotype ARR/ARR » et la saisine 2006-SA-0195 «sur l'évolution des mesures de police sanitaire dans les cheptels ovins et caprins où un cas de tremblante atypique a été détecté ». La saisine 2006-SA-0072 « sur l'évaluation des risques liés à des cas d'EST atypiques dans l'espèce ovine » portait en fait sur des souches de tremblante classique de type CH1641.
La réponse à la saisine 2006-SA-0195 a été faite alors que peu d'études épidémiologiques sur la tremblante atypique étaient disponibles. Le CES ESST n'avait pas obtenu de consensus en son sein et les recommandations, empreintes du principe de précaution, n'ont pas eu de conséquences pratiques pendant 3 ans. Une auto-saisine sur la réactualisation de la saisine 2006-SA-0195 est en cours au moment de la rédaction de ce manuscrit mais n'est pas encore disponible. Cette auto-saisine a en partie été motivée par les résultats des études présentées dans cette thèse.

Les travaux que nous avons menés n'ont pas porté spécifiquement sur l'analyse des mesures de gestion. Cela aurait été prématuré par rapport aux connaissances dont nous disposons sur la tremblante atypique. Toutefois, les études présentées dans l'article 2 et l'article 3 et, à plus forte raison, dans l'article 5 et l'article 6 ont des implications directes sur l'analyse des mesures de police sanitaire ou sur la qualification des élevages.
La prévalence de la tremblante atypique est faible y compris dans les élevages atteints, la maladie n'entraîne donc pas de pertes économiques. La nécessité d'organiser une lutte relève donc de la prévention de dangers potentiels. On peut en distinguer deux types : le danger zoonotique et le danger d'une émergence animale.

Concernant le risque zoonotique, nous ne disposons pas d'éléments d'analyse. Les seules informations publiques indiquant un éventuel franchissement de la barrière d'espèce (Andréoletti, Herva et al., 2008) n'ont pas été publiées à ce jour. La gestion de cet aspect relève donc de l'opinion du décideur, modulée par le principe de précaution. Il convient à ce titre de rappeler que théoriquement l'inspection ante mortem à l'abattoir permet d'éliminer les animaux atteints cliniquement mais pas en pratique vu les conditions difficiles d'inspection de signes neurologiques en bouverie et la faible prévalence de la maladie. Pour l'anecdote, les petits ruminants présentant des signes d'affection neurologique (tourner en rond) ont été écartés de la consommation humaine dès le Moyen-âge (Ferrières M., 2002). D'autre part, le retrait des MRS est une mesure dont l'efficacité dépend de la diffusion de l'infectiosité dans l'organisme des animaux atteints qui semble limitée en tremblante atypique (Simmons, Konold et al., 2007; Benestad, Arsac et al., 2008 ; Simmons, Simmons et al., 2009).
Concernant le danger d'une émergence animale, il n'est pour l'instant pas d'actualité vu l'évolution de la prévalence. La tremblante atypique ne semble pas contagieuse ou l'est très peu, le risque de diffusion par les animaux est donc très limité. Une contamination accidentelle via l'alimentation

ou d'autres produits ingérés ou inoculés représente une éventualité mais la gestion du risque correspondant est commune à toutes les EST animales.

L'éventualité d'une mutation de la tremblante atypique en une souche clairement contagieuse comme la tremblante classique n'est pas à exclure. Cela serait d'autant plus inquiétant que la diversité du polymorphisme génétique du gène PRNP de la population ovine serait réduite du fait des programmes de sélection actuels, risquant ainsi de majorer les conséquences d'une éventuelle épizootie car peu ou pas d'animaux seraient résistants (Springbett, MacKenzie et al., 2003; Nicholas, 2005). On pourrait éventuellement concevoir le maintien de la police sanitaire comme une mesure de prévention de ce danger qui viserait à détruire tout foyer d'EST mais : i) si la maladie est de nature endogène, ce combat est complètement illusoire, ii) si la maladie a une origine infectieuse, cette mesure ne serait efficace qu'avec une politique agressive de dépistage des foyers impliquant un très grand nombre de tests vu la faible prévalence détectée par les méthodes actuelles dans les troupeaux. Il convient par contre de maintenir un système de surveillance capable de détecter une éventuelle émergence. Il serait également utile de réfléchir à la pertinence de maintenir plus longtemps des programmes de sélection génétique, la population ovine ayant déjà été engagée vers une augmentation importante de la fréquence de l'allèle ALRR qui ne sera visible que dans plusieurs années (Dawson, Moore et al., 2008; Palhière, Brochard et al., 2008). L'intérêt d'ajouter un niveau de sélection génétique pour accélérer la baisse relative des allèles de susceptibilité à la tremblante atypique, AFRQ et ALHQ semble a priori très limité en terme de rapport coût / bénéfice vu la rareté de ces allèles présentée dans l'article 3. Cela pourrait éventuellement faire l'objet de modélisations spécifiques. Il serait par contre intéressant de modéliser la structure génétique de la population ovine qui serait souhaitable pour minimiser le risque de tremblante classique tout en conservant au maximum la diversité génétique.

Le maintien d'une police sanitaire dans les troupeaux atteints de tremblante atypique pose également le problème des sélectionneurs dont le taux élevé d'animaux sensibles à la tremblante atypique (porteurs d'allèles ALRR ou ALHQ) les expose à des risques indéniables d'avoir un animal positif détecté (article 3). Ce risque est majoré par l'adhésion fréquente de ces élevages au CSO qui impose de nombreux tests de dépistage EST. Une étude par simulation a récemment montré que des schémas de qualification vis-à-vis de la tremblante classique basés seulement sur la structure génétique des troupeaux n'étaient pas efficaces, s'ils n'étaient pas complétés par un dépistage des animaux réformés (Durand, Martinez et al., 2009). La certification vis-à-vis de la tremblante classique impose donc un dépistage important dans les élevages, ce qui doit être pris en compte par la réglementation, au risque de pénaliser de façon paradoxale les éleveurs qui font la promotion de la politique de sélection de résistance à la tremblante classique et sans que cela soit nécessairement justifié sur le plan sanitaire.

Quoi qu'il en soit, l'évaluation ou la préconisation de mesures de gestion ne découle pas simplement de résultats d'analyses statistiques, quels que soient leur niveau de complexité. Comme le conclut Carl Phillips dans son analyse des leçons manquées de Bradford Hill, ce n'est pas parce qu'une relation causale a été mise en évidence, qu'une mesure doit être prise ; pas plus que l'incapacité à mettre en évidence une telle relation ne doit conduire à l'inaction (Phillips and Goodman, 2004). La réflexion préalable à la mise en œuvre de réglementation sanitaire doit intégrer ces effets sociétaux d'autant que l'analyse scientifique d'un problème laisse le plus souvent persister un doute (Roqueplo, 1997). Malgré six études qui tendent à conclure que la tremblante atypique ne serait pas contagieuse, je continue à en douter mais je ne suis pas convaincu pour

autant de la nécessité de mesures de contrôle contraignantes. Par ailleurs, il faudrait également s'interroger sur la possibilité que certaines souches aujourd'hui classées comme tremblante classique soient également d'origine endogène comme le suggère l'existence de cas de tremblante classique sporadiques où un seul animal est trouvé positif par troupeau (article 5). Si d'autres formes de tremblante endogènes venaient à être découvertes, cela remettrait en cause les programmes de sélection génétique et d'éventuels programmes de qualification.

Conclusion

Notre objectif initial était d'explorer les caractéristiques épidémiologiques de la tremblante atypique chez les ovins, et notamment d'en estimer la distribution, la contagiosité et de mettre en évidence les facteurs de risque. A travers six études, nous avons exploré de façon directe ou indirecte ces différents aspects.

Nous avons trouvé que la tremblante atypique était une maladie sporadique dont la prévalence, de l'ordre de 6 cas pour 10 000, variait peu en fonction du temps, du canal de surveillance et de la zone géographique, y compris parmi les animaux issus de troupeaux atteints. Nous avons établi ces résultats pour les données françaises. Nous les avons confrontés à ceux obtenus pour la tremblante classique, dont la contagiosité est connue, et les contrastes que nous avons observés entre les deux maladies au sein de la même population ovine ont constitué une forme de validation interne. Nous les avons également confrontés aux résultats obtenus dans d'autres pays européens, ce qui constitue une forme de validation externe. Notre exploration des facteurs de risque a abouti à des conclusions semblables à celles d'une autre équipe, à savoir que les facteurs liés à une origine contagieuse ou alimentaire n'étaient pas associés à l'augmentation du risque de maladie. Les principaux facteurs influençant le risque de maladie suggéraient un rôle prédominant du polymorphisme génétique et secondairement de facteurs métaboliques au sens large, ce qu'il faudrait confirmer sur le plan physiopathologique.

L'ensemble de nos résultats soutient l'hypothèse que la tremblante atypique n'est pas ou très peu contagieuse et qu'elle pourrait avoir une origine endogène. Cette hypothèse est également défendue par les approches expérimentales publiées à ce jour. Toutefois, différentes incertitudes et limites méthodologiques ont été recensées et discutées ; une certaine prudence est de mise au regard de ces résultats et les questions en suspens sont encore nombreuses. La PrP^{Sc} associée à la tremblante atypique est-elle présente mais non détectable en dehors du SNC ? La transmission naturelle en élevage est-elle masquée par le long temps d'incubation ? Comment se distribue la période d'incubation et dépend-elle du génotype ? Y a-t'il des facteurs génétiques autres que le gène PRNP ? Des facteurs influençant l'expression de la PrP^{C} modifient-ils le risque de tremblante atypique et si oui quels sont-ils ? La tremblante atypique peut-elle franchir la barrière d'espèce et dans quelles circonstances ?

A ces nombreuses questions, il ne sera pas possible de répondre avant de devoir prendre des décisions concernant la gestion de la maladie. Certains experts pourraient considérer que toutes les mesures de contrôle sont superflues, d'autres préfèreraient l'application du principe de précaution. Quoi qu'il en soit, il est important de continuer à surveiller cette maladie et tenter d'approfondir nos connaissances. Nous avons cherché à exploiter au mieux les données disponibles dans les trois ans impartis pour cette thèse. Des perfectionnements de nos études pourraient nous permettre d'améliorer la force de conviction de nos résultats, notamment via des analyses de sensibilité mesurant l'influence possible des principaux biais. Cependant, nous ne pensons pas que nous en tirerions davantage de connaissances. Pour progresser sur l'épidémiologie de la tremblante atypique, il serait intéressant d'associer dans une approche interdisciplinaire, le suivi de cohorte incluant les liens de filiation et la mesure d'expositions environnementales au sens large, l'exploration physiopathologique et l'étude de facteurs génétiques.

Liste des abréviations

AA : Acides Aminés
AESA : Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
APDI : Arrêté Préfectoral de Déclaration d'Infection
APMS : Arrêté Préfectoral de Mise Sous Surveillance
ATNC : Agent Transmissible Non Conventionnel
BNEST : Base de Données Nationale des EST (animales)
CEA : Commissariat à l'Energie Atomique
CES : Comité d'Experts Spécialisés pour les ESST
CS : Classical scrapie - Tremblante Classique
CSO : Contrôle Sanitaire Officiel
DGAl : Direction Générale de l'Alimentation
DIC : Deviance Information Criteria
ELISA : Enzyme-Linked Immuniosorbent Assay
ENSV : Ecole Nationale des Services Vétérinaires
EST : Encéphalopathie Spongiforme Transmissible
ESST : Encéphalopathie Spongiforme Subaiguë Transmissible
fCJD : forme Familiale de la Maladie De Creutzfeldt-Jakob
FFI : Insomnie Familiale Fatale
FVO : Farines de Viande et d'Os
GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue
GDS : Groupements de Défenses Sanitaires
GSS : syndrome de Gertsmann-Straüssler-Scheinker
IA : Insémination Artificielle
IC95% : Intervalle de Confiance à 95%
ic95% : Intervalle de Crédibilité à 95%
ID : Incisive Définitive
IHC : Immunohistochimique
IL : Incisive de Lait
kd : Kilodalton
LDA : Laboratoire Départemental d'Analyses
LIMS : Laboratory Information Management System
LNR : Laboratoire National de Référence
MCJ : Maladie de Creutzfeldt Jakob
MRC : Maladies Réputées Contagieuses
MTF1 : Métal Responsive Transcription Factor-1
NAIF : Nés Après l'Interdiction des Farines Animales
OIE : l'Office International des Epizooties
OR : Odds Ratio
PACA : Provence-Alpes-Côte-d'Azur
pb : Paires de Base
PK : Protéinase K
PMCA : Protein Misfolding Cyclic Amplification

PNARGT : Programme National d'Amélioration Génétique pour la Résistance à la Tremblante
PRNP : Gène codant pour la Protéine Prion Cellulaire normale(PrP^C)
PrP^C : Protéine Prion Cellulaire
PrP^{Sc} : Protéine Prion Pathologique
MRS : Matériaux à Risque Spécifié
SAF : Scrapie Associated Fibrils
sCJD : forme Sporadique de la maladie Creutzfeldt Jakob
SNC : Système Nerveux Central
SOD : Superoxyde Dismutase
Tg Po : Souris Transgénique porcine
UPRA : Unités de Promotion des Races Animales
vCJD : Variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob
VLA : Veterinary Laboratory Agency
Western Blot : Western Immunoblotting

Références bibliographiques

Abrial, D., D. Calavas, et al. (2005a). "Poultry pig and the risk of BSE following the feed ban in France - Spatial analysis." *Veterinary Research* 36: 615-628.

Abrial, D., D. Calavas, et al. (2005b). "Spatial heterogeneity of the risk of BSE in France following the ban of meat and bone meal in cattle feed." *Preventive Veterinary Medicine* 67(1): 69-82.

AFSSA (2004). Demande d'avis sur l'analyse des risques liés aux encéphalopathies spongiformes transmissibles dans les filières petits ruminants, les forces et faiblesses du dispositif actuel et les possibilités d'évolution.

AFSSA (2007a). "Avis de l'AFSSA sur l'évolution des mesures de police sanitaire dans les cheptels ovins et caprins où un cas de tremblante classique ou atypique a été détecté." 1-9.

AFSSA (2007b). Demande d'avis complémentaire relatif à l'évolution du programme de surveillance des EST chez les petits ruminants au regard du risque ESB pour le consommateur. Maisons-Alfort. Annexe 1, 43p pages

AFSSA (2007c). "Demande d'avis complémentaire relatif à l'évolution du programme de surveillance des EST chez les petits ruminants au regard du risque ESB pour le consommateur." 2007-SA-0052(20 juillet 2007): 1-6.

Agreste - Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. (2006). "Base de données." Retrieved 15/11/2006, from http://agreste.agriculture.gouv.fr/page_accueil_82/donnees_ligne_2.html.

Aguzzi, A., F. Baumann, et al. (2008). "The prion's elusive reason for being." *Annual Review of Neuroscience* 31: 439-77.

Alper, T., W. A. Cramp, et al. (1967). "Does the Agent of Scrapie Replicate without Nucleic Acid ?" *Nature* 214: 764-766.

Alper, T., D. A. Haig, et al. (1966). "The exceptionally small size of the scrapie agent." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 22(3): 278-284.

Alter, M., Y. Frank, et al. (1975). "Creutzfeldt-Jakob Disease After Eating Ovine Brains?" *The New England Journal of Medicine*: 927.

Altman, D. G. and J. M. Bland (1995). "Absence of evidence is not evidence of absence." *BMJ* 311(7003): 485.

Andréoletti, O., P. Berthon, et al. (2000). "Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie." *Journal of General Virology* 81(Pt 12): 3115-26.

Andréoletti, O., M. Herva, et al. (2008). When atypical scrapie crosses species barrier. *Prion 2008*, Madrid, Neuroprion. 10 october 2008

Andréoletti, O., C. Lacroux, et al. (2002). "PrP(Sc) 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(Pt 10): 2607-16.

Andréoletti, O., N. Morel, et al. (2006). "Bovine spongiform encephalopathy agent in spleen from an ARR/ARR orally exposed sheep." *Journal of General Virology* 87(Pt 4): 1043-1046.

Andréoletti, O., S. Simon, et al. (2004). "PrPsc accumulation in myocites from natural-scrapie incubating sheep." *Nature Medicine* 10(6): 591-593.

Anonyme, Ed. (2005a). Les systèmes ovins lait en France. *Synthèse - réseau d'élevage* Paris, *Institut de l'Elevage*. 24 pages

Anonyme, Ed. (2005b). Optimisation de la collecte de cadavre en ferme pour les filières bovines et ovines. *Collection résultats* Paris, *Institut de l'Elevage*. 92 pages

Anonyme, Ed. (2006). Résutlats techniques et économiques des exploitations ovins viande. *Synthèse - réseau d'élevage* Paris, *Institut de l'Elevage*. 24 pages

Arrêté du 1er juillet 2004 relatif au contrôle sanitaire officiel des échanges de reproducteurs ovins et caprins vis-à-vis de la tremblante, *Journal Officiel de la République Française,* 12 août 2004, 186: 14408

Arrêté du 3 avril 1998 relatif au contrôle sanitaire officiel des ventes de reproducteurs ovins et caprins vis-à-vis de la tremblante, *Journal Officiel de la République Française,* 5 mai 1998, 104: 6831

Arrêté du 3 décembre 1990 fixant les mesures de police sanitaire relatives à l'encéphalopathie spongiforme bovine, *Journal Officiel de la République Française,* 16 décembre 1990, 292: 15482

Arrêté du 8 juillet 1996 modifiant l'arrêté du 24 juillet 1990 modifié portant interdiction de l'emploi de certaines protéines d'origine animale dans l'alimentation et la fabrication d'aliments destinés aux animaux de l'espèce bovine et étendue aux ruminants par l'arrêté du 20 décembre 1994 portant extension de l'interdiction d'emploi de certaines protéines d'origine animale dans l'alimentation et la fabrication d'aliments destinés aux ruminants, *Journal Officiel de la République Française,* 11 juillet 1996, 160: 10461

Arrêté du 13 juin 1996 modifiant l'arrêté du 17 mars 1992 relatif aux conditions auxquelles doivent satisfaire les abattoirs d'animaux de boucherie pour la production et la mise sur le marché de viandes fraîches et déterminant les conditions de l'inspection sanitaire de ces établissements, *Journal Officiel de la République Française,* 20 juin 1996, 142: 9238

Arrêté du 14 novembre 2000 modifiant l'arrêté du 24 juillet 1990 portant interdiction de l'emploi de certaines protéines d'origine animale dans l'alimentation et la fabrication d'aliments destinés aux animaux de l'espèce bovine et étendant cette interdiction à certaines graisses animales et pour l'alimentation d'autres animaux, *Journal Officiel de la République Française,* 15 novembre 2000 264: 18081

Arrêté du 17 mars 1992 relatif aux conditions auxquelles doivent satisfaire les abattoirs d'animaux de boucherie pour la production et la mise sur le marché de viandes fraîches et déterminant les conditions de l'inspection sanitaire de ces établissements, *Journal Officiel de la République Française,* 29 mars 1992, 76: 4378

Arrêté du 20 décembre 1994 portant extension de l'interdiction d'emploi de certaines protéines d'origine animale dans l'alimentation et la fabrication d'aliments destinés aux ruminants, *Journal Officiel de la République Française,* 5 janvier 1995, 4: 209

Arrêté du 24 juillet 1990 portant interdiction de l'emploi de certaines protéines et graisses d'origine animale dans l'alimentation et la fabrication d'aliments des animaux et fixant des conditions supplémentaires à la commercialisation, aux échanges, aux importations et aux exportations de certains produits d'origine animale destinés à l'alimentation animale et à la fabrication d'aliments des animaux *Journal Officiel de la République Française,* 11 août 1990, 185: 9837

Arrêté du 27 janvier 2003 fixant les mesures de police sanitaire relatives à la tremblante ovine, *Journal Officiel de la République Française,* 31 janvier 2003, 44: 1946

Arrêté du 28 mars 1997 fixant les mesures de police sanitaire relatives à la tremblante ovine et caprine, *Journal Officiel de la République Française,* 17 avril 1997 90: 5823

Arrêté du 30 août 2002 fixant les mesures techniques et financières relatives au programme national d'amélioration génétique pour la résistance à la tremblante, *Journal Officiel de la République Française,* 11 septembre 2002, 212: 15051

Arsac, J., O. Andréoletti, et al. (2007). "Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway." *Emerging Infectious Diseases* 13(1): 58-65.

Aucouturier, P., R. J. Kascsak, et al. (1999). "Biochemical and conformational variability of human prion strains in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." *Neuroscience Letters* 274(1): 33-36.

Babo, D. (2000). Races ovines et caprines françaises. *Editions France Agricole*. 302 pages

Bailly, G. and F. Fortassin (2008). "Rapport d'information fait au nom de la commission des Affaires économiques sur l'avenir de la filière ovine." *SENAT* 168(Annexe au procès-verbal de la séance du 16 janvier 2008): 1-87.

Baker, H. F., R. M. Ridley, et al. (1985). "Experimental transmission of an autosomal dominant spongiform encephalopathy: does the infectious agent originate in the human genome?" *British Medical Journal* 291(6491): 299-302.

Baldauf, E., M. Beekes, et al. (1997). "Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord." *Journal of General Virology* 78: 1187-1197.

Balter, M. (2002). "BSE in Sheep? Humiliated Lab Fights To Save Face." *Science* 295(5556): 792-793.

Barillet, F., D. Mariat, et al. (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(Pt 3): 769-76.

Barillet, F., I. Palhière, et al. (2004). "Le programme français d'éradication de la tremblante du cheptel ovin fondé sur l'utilisation de la génétique." *INRA Productions Animales* hors-série: 87-100.

Baron, T., A. G. Biacabe, et al. (2007). "Atypical transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ruminants." *Vaccine* 25(30): 5625-30.

Baron, T., C. Crozet, et al. (2004). "Molecular Analysis of the Protease-Resistant Prion Protein in Scrapie and Bovine Spongiform Encephalopathy Transmitted to Ovine Transgenic and Wild-Type Mice." *Journal of Virology* 78(12): 6243-6251.

Baron, T., J.-Y. Madec, et al. (2000). "Comparison of French natural scrapie isolates with bovine spongiform encephalopathy and experimental scrapie infected sheep." *Neuroscience Letters* 284: 175-178.

Baron, T. G. M. and A.-G. Biacabe (2001). "Molecular Analysis of the Abnormal Prion Protein during Coinfection of Mice by Bovine Spongiform Encephalopathy and a Scrapie Agent." *Journal of Virology* 75(1): 107-114.

Barry, R. A. and S. B. Prusiner (1986). "Monoclonal Antibodies to the Cellular and Scrapie Prion Proteins." *The Journal of Infectious Diseases* 154(3): 518-521.

Bartz, J. C., R. A. Bessen, et al. (2000). "Adaptation and Selection of Prion Protein Strain Conformations following Interspecies Transmission of Transmissible Mink Encephalopathy." *Journal of Virology* 74(12): 5542-5547.

Bartz, J. C., C. Dejoia, et al. (2005). "Extraneural prion neuroinvasion without lymphoreticular system infection." *Journal of Virology* 79(18): 11858-63.

Bartz, J. C., E. Kincaid, et al. (2003). "Rapid Prion Neuroinvasion Following Tongue Infection." *Journal of Virology* 77(1): 583-591.

Baskakov, I. V., G. Legname, et al. (2002). "Pathway Complexity of Prion Protein Assembly into Amyloid." *Journal of Biological Chemistry* 277(24): 21140-21148.

Baylis, M. (2002). "The BSE-susceptible proportion of UK sheep." *Veterinary Record* 151: 481-482.

Baylis, M., C. Chihota, et al. (2004). "Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype." *Journal of General Virology* 85(Pt 9): 2735-40.

Baylis, M., W. Goldmann, et al. (2002). "Scrapie epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock." *Journal of General Virology* 83: 2907-2914.

Baylis, M., F. Houston, et al. (2002). "BSE - a wolf in sheep's clothing?" *Trends in Microbiology* 10(12): 563-70.

Baylis, M. and M. McIntyre (2004). "Scrapie control under new strain." *Nature* 432(7019): 810-811.

Beekes, M., E. Baldauf, et al. (1996). "Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie." *Journal of General Virology* 77: 1925-1934.

Beekes, M. and P. A. McBride (2007). "The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies." *FEBS Journal* 274(3): 588-605.

Bellingham, S. A., L. A. Coleman, et al. (2009). "Regulation of prion gene expression by transcription factors SP1 and metal transcription factor-1." *Journal of Biological Chemistry* 284(2): 1291-301.

Bellon, A., W. Seyfert-Brandt, et al. (2003). "Improved conformation-dependent immunoassay: suitability for human prion detection with enhanced sensitivity." *Journal of General Virology* 84(Pt 7): 1921-5.

Bellworthy, S. J., G. Dexter, et al. (2005). "Natural transmission of BSE between sheep within an experimental flock." *Veterinary Record* 157(7): 206.

Beloeil, I. (2003). Analyse de la mise en oeuvre du programme 2002 d'estimation de la prévalence de la tremblante chez les petits ruminants, *Ecole Nationale des Services Vétérinaires*: 1.

Belt, P. B. G. M., J. H. Muilheman, et al. (1995). "Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie." *Journal of General Virology* 76: 509-517.

Benestad, S. L., J. N. Arsac, et al. (2008). "Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology." *Veterinary Research* 39(4): 19.

Benestad, S. L., P. Sarradin, et al. (2003). "Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98." *Veterinary Record* 153(7): 202-8.

Béringue, V., J. L. Vilotte, et al. (2008). "Prion agents diversity and species barrier." *Veterinary Research* 39(4): 47.

Bernouilli, C., J. Siegfried, et al. (1977). "Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery." *The Lancet*: 478-479.

Besag, J., J. York, et al. (1991). "Bayesian image restoration, with two applications in spatial statistics." *Annals of the Institute of Statistical Mathematics* 43(1): 1-59.

Besnoit, M. (1898). "Note sur les lésions nerveuses de la tremblante du mouton." *La Revue Vétérinaire* XXIII (lv): 397-400.

Bessen, R. A., D. A. Kocisko, et al. (1995). "Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein." *Nature* 375(6533): 698-700.

Biacabe, A. G., J. L. Laplanche, et al. (2004). "Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases." *EMBO Reports* 5(1): 110-5.

Billinis, C. P., C. H. Panagiotidis, et al. (2002). "Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie." *Journal of General Virology* 83: 713-721.

Bird, S.-M. (2003). "European Union's rapid TSE testing in adult cattle and sheep: implementation and results in 2001 and 2002." *Statistical Methods in Medical Research* 12(3): 261-278.

Boehning, D. A. and V. Del Rio Vilas (2009). "On the question of proportionality of the count of observed Scrapie cases and the size of holding." *BMC Veterinary Research* 5(1): 17.

Bolton, D. C., M. P. McKinley, et al. (1982). "Identification of a Protein That Purifies with the Scrapie Prion." *Science* 218: 1309-1311.

Bradley, R. and J. W. Wilesmith (1993). "Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE)." *British Medical Bulletin* 49(4): 932-59.

Brown, D., K. Qin, et al. (1997). "The cellular prion protein binds copper in vivo." *Nature* 390: 684-687.

Brown, D. R., B. S. Wong, et al. (1999). "Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase." *Biochemical Journal* 344: 1-5.

Brown, L. R. and D. A. Harris (2003). "Copper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the Golgi." *Journal of Neurochemistry* 87(2): 353-63.

Brown, P., F. Cathala, et al. (1987). "The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature." *Neurology* 37: 895-904.

Brown, P. and D. C. Gajdusek (1991). "Survival of scrapie virus after 3 year's interment." *The Lancet* 337(2): 269-270.

Brown, P., D. C. Gajdusek, et al. (1985). "Potential epidemic of Creutzfeldt-Jakob disease from human growth hormone therapy." *New England Journal of Medicine* 313(12): 728-31.

Brown, P., A. M. Salazar, et al. (1982). "Alzheimer's disease and transmissible virus dementia (Creutzfeldt-Jakob disease)." *Annals New York Academy of Sciences* 396: 131-43.

Brown, R. D., W. J. Schulz-Schaeffer, et al. (1997). "Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity." *Experimental Neurology* 146: 104-112.

Bruce, M., A. Chree, et al. (1994). "Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier." *Proceedings Royal Society London Series B Biological Sciences* 343: 405-411.

Bruce, M. E. (1993). "Scrapie strain variation and mutation." *British Medical Bulletin* 49(4): 822-838.

Bruce, M. E. (2003). "TSE strain variation." *British Medical Bulletin* 66: 99-108.

Bruce, M. E., A. Boyle, et al. (2002). "Strain characterization of natural sheep scrapie and comparaison with BSE." *Journal of General Virology* 83: 695-704.

Bruce, M. E., P. A. Mc Bride, et al. (1989). "Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, Pr P, and vacuolar degeneration in mouse scrapie." *Neuroscience Letters* 102: 1-6.

Bruce, M. E., I. McConnell, et al. (1991). "The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis." *Journal of General Virology* 72: 595-603.

Bruce, M. E., R. Nonno, et al. (2007). "Nor98-like sheep scrapie in the United Kingdom in 1989." *Veterinary Record* 160(19): 665-6.

Bruce, M. E., R. G. Will, et al. (1997). "Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent." *Nature* 389(6650): 498-501.

Budka, H., A. Aguzzi, et al. (1995). "Neuropathological Diagnostic Criteria for Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and Other Human Spongiform Encephalopathies (Prion Diseases)." *Brain Pathology* 5: 459-466.

Büeler, H., A. Aguzzi, et al. (1993). "Mice Devoid of PrP Are Resistant to Scrapie." *Cell* 73: 1339-1347.

Buschmann, A., A.-G. Biacabe, et al. (2004). "Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests." *Journal of Virological Methods* 117(1): 27-36.

Buschmann, A., G. Lühken, et al. (2004). "Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR)." *Journal of General Virology* 85(Pt 9): 2727-33.

Butler, D. (1998). "Doubts over ability to monitor risks of BSE spread to sheep." *Nature* 395: 6-7.

Calavas, D., C. Ducrot, et al. (2001). "Prevalence of BSE in western France by screening cattle at risk: preliminary results of a pilot study." *Veterinary Record* 149(2): 55-56.

Calavas, D., E. Lepetitcolin, et al. (1999). "Etude épidémiologique de la tremblante dans un élevage ovin ayant mis en oeuvre un plan d'assainissement contre le maedi visna." *Recueil de Médecine Vétérinaire* 175(1/2): 17-25.

Calavas, D., S. Philippe, et al. (1999). "Bilan et analyse de trente mois de fonctionnement du Réseau français d'épidémiosurveillance de la tremblante des petits ruminants." *Epidémiologie et Santé Animale* 35: 43-50.

Capobianco, R., C. Casalone, et al. (2007). "Conversion of the BASE prion strain into the BSE strain: the origin of BSE?" *PLoS Pathogens* 3(3): e31.

Castilla, J., P. Saa, et al. (2005). "In vitro generation of infectious scrapie prions." *Cell* 121(2): 195-206.

Caughey, B. and G. S. Baron (2006). "Prions and their partners in crime." *Nature* 443(7113): 803-10.

Caughey, B., G. J. Raymond, et al. (1998). "Strain-dependent Differences in Beta-Sheet Conformations of Abnormal Prion Protein." *Journal of Biological Chemistry* 273(48): 32230-32235.

Cazeau, G., A. Fediaevsky, et al. (2007). Analyse statistique des données de surveillance active des EST chez les petits ruminants en France continentale. Complément aux rapports d'analyse annuels pour la période 2002-2006. Afssa. Lyon**:** 1-43.

Cazeau, G., A. Fediaevsky, et al. (2008). "Prévalence des formes classique et atypique de tremblante chez les petits ruminants en France entre 2002 et 2006." *Revue de Médecine Véterinaire* 6(159): 348-356.

Chandler, R. L. (1963). "Experimental Scrapie in the Mouse." *Research in Veterinary Science* 4: 276-285.

Chaplin, M. J., A. D. Aldrich, et al. (1998). "Scrapie associated fibril detection from formaldehyde fixed brain tissue in natural cases of ovine scrapie." *Research in Veterinary Science* 64(1): 41-44.

Chaplin, M. J., N. Barlow, et al. (2002). "Evaluation of the effects of controlled autolysis on the immunodetection of PrPSc by immunoblotting and immunohistochemistry from natural cases of scrapie and BSE." *Research in Veterinary Science* 72(1): 37-43.

Chatelain, J., F. Cathala, et al. (1981). "Epidemiologic comparisons between Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie in France during the 12-year period 1968-1979." *Journal of the Neurological Sciences* 51: 329-337.

Chatelain, J. C. and C. Dautheville-Guibal (1988). "La tremblante des ovins et caprins a-t-elle un rôle dans la transmission de la maladie de Creutzfeldt-Jakob ?" *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique* 36: 488.

Chesebro, B., R. Race, et al. (1985). "Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain." *Nature* 315: 331-333.

Chiesa, R., P. Piccardo, et al. (1998). "Neurological Illness in Transgenic Mice Expressing a Prion Protein with an Insertional Mutation." *Neuron* 21(6): 1339-1351.

Choi, C. J., A. Kanthasamy, et al. (2006). "Interaction of metals with prion protein: possible role of divalent cations in the pathogenesis of prion diseases." *Neurotoxicology* 27(5): 777-87.

Clark, A. M. and J. A. E. Moar (1992). "Scrapie: a clinical assessment." *Veterinary Record* 130: 377-378.

Cockcroft, P. D. and A. M. Clark (2006). "The Shetland Islands scrapie monitoring and control programme: analysis of the clinical data collected from 772 scrapie suspects 1985-1997." *Research in Veterinary Science* 80(1): 33-44.

Cocquyt, G., B. Driessen, et al. (2005). "Variability in the eruption of the permanent incisor teeth in sheep." *Veterinary Record* 157(20): 619-23.

Collinge, J. and A. R. Clarke (2007). "A general model of prion strains and their pathogenicity." *Science* 318(5852): 930-6.

Collinge, J., K. C. L. Sidle, et al. (1996). "Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD." *Nature* 383: 685-690.

Comber, T. and H. Morborne (1772). A letter to Dr Hunter, physician in York, concerning the rickets in sheep. Real Improvements in Agriculture, Letters to Reade Peacock. London**:** 73-83.

Corbière, F., F. Barillet, et al. (2007). "Advanced survival models for risk-factor analysis in scrapie." *Journal of General Virology* 88(Pt 2): 696-705.

Corona, C., C. Porcario, et al. (2009). "Olfactory system involvement in natural scrapie disease." *Journal of Virology* 83(8): 3657-67.

Cressie, N. (1993). Statistics for Spatial Data (Wiley Series in Probability and Statistics). *Wiley-Interscience*. pages

Cuillé, J. and P.-L. Chelle (1936). "La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable ?" *Académie des Sciences* 206: 1552-1554.

Cuillé, J. and P.-L. Chelle (1938). "La tremblante du mouton est bien inoculable." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 206: 78-79.

Cutlip, R. C., J. M. Miller, et al. (2001). "Resistance of cattle to scrapie by the oral route." *Canadian Journal of Veterinary Research* 65(2): 131-132.

Cutlip, R. C., J. M. Miller, et al. (1994). "Intracerebral Transmission of Scrapie to Cattle." *The Journal of Infectious Diseases* 169: 814-820.

D'Angelo, A., C. Maurella, et al. (2007). "Assessment of clinical criteria to diagnose scrapie in Italy." *Veterinary Journal* 174(1): 106-12.

Dagleish, M. P., S. M. Rodger, et al. (2008). "Atypical scrapie in a sheep in Scotland." *Veterinary Record* 162(16): 518-9.

Davies, P. and D. R. Brown (2008). "The chemistry of copper binding to PrP: is there sufficient evidence to elucidate a role for copper in protein function?" *Biochemical Journal* 410(2): 237-44.

Dawson, M., L. J. Hoinville, et al. (1998). "Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical Scrapie." *Veterinary Record* 142(23): 623-625.

Dawson, M., R. C. Moore, et al. (2008). "Progress and limits of PrP gene selection policy." *Veterinary Research* 39(4): 25.

Dawson, M., G. A. Wells, et al. (1990). "Primary parenteral transmission of bovine spongiform encephalopathy to the pig." *Veterinary Record* 127(13): 338.

De Bosschere, H., S. Roels, et al. (2004). "Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance." *Veterinary Record* 155(22): 707-8.

De Pedro-Cuesta, J., M. Glatzel, et al. (2006). "Human transmissible spongiform encephalopathies in eleven countries: diagnostic pattern across time, 1993-2002." *BMC Public Health* 6: 278.

DeArmond, S. J. and E. Bouzamondo (2002). "Fundamentals of prion biology and diseases." *Toxicology* 181: 9-16.

DeArmond, S. J. and S. B. Prusiner (1995). "Etiology and pathogenesis of prion diseases." *American Journal of Pathology* 146(4): 785-811.

Décret n°90-478 du 12 juin 1990 ajoutant l'encéphalopathie spongiforme bovine à la nomenclature des maladies réputées contagieuses *Journal Officiel de la République Française,* 13 juin 1990, 135: 6899

Décret n°96-528 du 14 juin 1996 complétant et modifiant la liste des maladies des animaux réputées contagieuses, *Journal Officiel de la République Française,* 15 juin 1996, 138: 8934

Del Rio Vilas, V. J., J. Guitian, et al. (2006). "Analysis of data from the passive surveillance of scrapie in Great Britain between 1993 and 2002." *Veterinary Record* 159(24): 799-804.

Del Rio Vilas, V. J., P. Hopp, et al. (2007). "Explaining the heterogeneous scrapie surveillance figures across Europe: a meta-regression approach." *BMC Veterinary Research* 3(1): 13.

Del Rio Vilas, V. J., J. Ryan, et al. (2005). "Prevalence of scrapie in sheep: results from fallen stock surveys in Great Britain in 2002 and 2003." *Veterinary Record* 157(23): 744-5.

Del Rio Vilas, V. J., R. Sayers, et al. (2005). "A case study of capture-recapture methodology using scrapie surveillance data in Great Britain." *Preventive Veterinary Medicine* 67(4): 303-17.

Deleault, N. R., R. W. Lucassen, et al. (2003). "RNA molecules stimulate prion protein conversion." *Nature* 425(6959): 717-20.

Delez, A. L., D. P. Gustafson, et al. (1957). "Some clinical and histological observations on scrapie in sheep." *Journal of American Veterinary Medicine Association* 131(10): 439-46.

Deslys, J. P. and J. Grassi (2005). "Screening tests for animal TSE: present and future." *Pathological Biology (Paris)* 53(4): 221-8.

Detwiler, L. A. and M. Baylis (2003). "The epidemiology of scrapie." *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties* 22(1): 121-143.

Diaz, C., Z. G. Vitezica, et al. (2005). "Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance/susceptibility to scrapie in a Romanov flock." *Journal of General Virology* 86(Pt 3): 849-57.

Dickinson, A.-G. (1976). Scrapie in sheep and goats. Slow virus diseases of animals and man. 44**:** 209-241.

Dickinson, A. G., H. Fraser, et al. (1975). "Scrapie incubation time can exceed natural lifespan." *Nature* 256: 732-733.

Dickinson, A. G. and V. M. Meikle (1971). "Host-genotype and agent effects in scrapie incubation: change in allelic interaction with different strains of agent." *Molecular General Genetic* 112(1): 73-9.

Dickinson, A. G., V. M. H. Meikle, et al. (1968). "Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice." *Journal of Comparative Pathology* 78: 293-299.

Dickinson, A. G., J. T. Stamp, et al. (1974). "Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep." *Journal of Comparative Pathology* 84: 19-25.

Dickinson, A. G., J. T. Stamp, et al. (1968). "Some factors controlling the incidence of scrapie in Cheviot sheep injected with a Cheviot-passaged scrapie agent." *Journal of Comparative Pathology* 78(3): 313-321.

Diedrich, J. F., P. E. Bendheim, et al. (1991). "Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 375-379.

Doherr, M. G. (2007). "Brief review on the epidemiology of transmissible spongiform encephalopathies (TSE)." *Vaccine* 25(30): 5619-24.

Doherr, M. G., B. Oesch, et al. (1999). "Targeted surveillance for bovine spongiform encephalopathy." *Veterinary Record* 145: 672.

Donnelly, C. A., N. M. Ferguson, et al. (1997). "The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. I. Epidemiological processes, demography of cattle and approaches to control by culling." *Proceedings Royal Society London Series B Biological Sciences* 352(1355): 781-801.

Doty, R. L. (2008). "The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable?" *Annales de Neurology* 63(1): 7-15.

Dubois, M. A., P. Sabatier, et al. (2002). "Multiplicative genetic effects in scrapie disease susceptibility." *Comptes rendus biologies* 325(5): 565-70.

Ducrot, C. and D. Calavas (2002). Epidémiologie de l'encéphalopathie spongiforme bovine et de la tremblante. Les maladies humaines et animales à prions. *B. Dodet and F. Cathala*. Paris, *Elsevier*: 47-60.

Ducrot, C., N. Dorr, et al. (1999). Clinical forms of scrapie on sheep. *26 th World Veterinary Congress: WVA*, 23/26 septembre 1999 - Lyon (France). Poster, 26 th September 1999

Duffy, P., J. Wolf, et al. (1974). "Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease." *The New England Journal of Medicine*: 692-692.

Durand, B., M. J. Martinez, et al. (2009). "Comparison of strategies for substantiating freedom from scrapie in a sheep flock." *BMC Veterinary Research* 5(1): 16.

Dustan, B. H., Y. I. Spencer, et al. (2008). "A histopathologic and immunohistochemical review of archived UK caprine scrapie cases." *Veterinary pathology* 45(4): 443-54.

EFSA (2005). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in Small Ruminants (Question number EFSA-Q-2005-073) adopted on 26 October 2005, *The EFSA Journal*: 1-30.

EFSA (2006). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards of the European Food Safety Authority on the Breeding programme for TSE resistance in sheep (And Annexe I, II and III), *The EFSA Journal*: 1-46.

Eghiaian, F., T. Daubenfeld, et al. (2007). "Diversity in prion protein oligomerization pathways results from domain expansion as revealed by hydrogen/deuterium exchange and disulfide linkage." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104(18): 7414-9.

Eloit, M., K. Adjou, et al. (2005). "BSE agent signatures in a goat." *Veterinary Record* 156(16): 523-4.

Elsen, J.-M., Y. Amigues, et al. (1999). "Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: Detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov." *Archives of Virology* 144: 431-445.

Elsen, J. M., F. Barillet, et al. (1997). "Génétique de la sensibilité à la tremblante ovine : recherches en cours et perspectives." *INRA Productions Animales* 10(2): 133-140.

Epstein, V., S. Pointing, et al. (2005). "Atypical scrapie in the Falkland Islands." *Veterinary Record* 157(21): 667-8.

Ermonval, M., S. Mouillet-Richard, et al. (2003). "Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications." *Biochimie* 85(1-2): 33-45.

Commission Regulation (EC) No 270/2002 of 14 February 2002 amending Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards specified risk material and epidemio-surveillance for transmissible spongiform encephalopathies and amending Regulation

(EC) No 1326/2001 as regards animal feeding and the placing on the market of ovine and caprine animals and products thereof, *Official Journal of European Communities,* 15/02/2002, L45: 4

Commission Decision (EC) No 2003/100/CE of 13 February 2003 laying down minimum requirements for the establishment of breeding programmes for resistance to transmissible spongiform encephalopathies in sheep *Official Journal of the European Union,* 14/02/2003, L 041: 41

Commission Regulation (EC) No 260/2003 of 12 February 2003 amending Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards specified risk material and epidemio-surveillance for transmissible spongiform encephalopathies and amending Regulation (EC) No 1326/2001 as regards animal feeding and the placing on the market of ovine and caprine animals and products thereof, *Official Journal of European Communities,* 12/02/2003, 37: 7

Commission Regulation (EC) No 2245/2003 of 19 December 2003 amending Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards specified risk material and epidemio-surveillance for transmissible spongiform encephalopathies and amending Regulation (EC) No 1326/2001 as regards animal feeding and the placing on the market of ovine and caprine animals and products thereof, *Official Journal of European Communities,* 20/12/2003, 28: 333

Commission Regulation (EC) No 36/2005 of 12 January 2005 amending Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards specified risk material and epidemio-surveillance for transmissible spongiform encephalopathies and amending Regulation (EC) No 1326/2001 as regards animal feeding and the placing on the market of ovine and caprine animals and products thereof, *Official Journal of European Communities,* 13/01/2005, 10: 9

Commission Regulation (EC) No 214/2005 of 9 February 2005 amending Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards specified risk material and epidemio-surveillance for transmissible spongiform encephalopathies and amending Regulation (EC) No 1326/2001 as regards animal feeding and the placing on the market of ovine and caprine animals and products thereof, *Official Journal of European Communities,* 10/02/2005, 37: 9

Commission Regulation (EC) No 253/2006 of 14 February 2006 amending Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards specified risk material and epidemio-surveillance for transmissible spongiform encephalopathies and amending Regulation (EC) No 1326/2001 as regards animal feeding and the placing on the market of ovine and caprine animals and products thereof, *Official Journal of European Communities,* 15/02/2006, 44: 9

European Commission. (2006b). "Report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of transmissible spongiform encephalopathy (TSE) in the EU in 2005." from http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/annual_report_tse2005_en.pdf.

European Food Safety Autority (2005a). "Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in Small Ruminants." *The EFSA Journal* 276: 1-30.

European Food Safety Autority (2005b). "Scientific Report of the European Food Safety Authority on the Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants." *The EFSA Scientific Report* 31: 1-17.

European Food Safety Autority (2005c). "Scientific Report of the European Food Safety Authority on the Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants (2)." *The EFSA Scientific Report* 49: 1-46.

Commission Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies, *Official Journal of European Communities,* 31/05/2001, 147: 40

Commission Regulation (EC) No 727/2007 of 26 June 2007 amending Annexes I, III, VII and X to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies (Text with EEA relevance), *Official Journal of the European Union,* 27/06/2007, 165: 8

Eurostat. (2009). "Base de données." Retrieved 20/05/2009, from http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/agriculture/data/database.

Evans, A. S. (1976). "Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited." *Yale Journal of Biology and Medicine* 49(2): 175-95.

Everest, S. J., L. Thorne, et al. (2006). "Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie-surveillance programme." *Journal of General Virology* 87(Pt 2): 471-477.

Fediaevsky, A., S. Bélichon, et al. (2007). "Surveillance et prévalence des EST chez les petits ruminants." *Bulletin Epidémiologique* 25: 1-5.

Fediaevsky, A., C. Ducrot, et al. (2007). Tremblante atypique: acquis et interrogations. *Journées nationales des GTV - Pathologie infectieuse: Actualités cliniques, diagnostiques et thérapeutiques - Syndromes émergents*, SNGTV. 695-698, 23-25 mai

Fediaevsky, A., E. Morignat, et al. (2008). A case control study on atypical scrapie in French sheep. *Prion 2008, Madrid-Spain*. 8 octobre 2008

Fediaevsky, A., E. Morignat, et al. (2009). "A case-control study on the origin of atypical scrapie in sheep, France." *Emerging Infectious Diseases* 15(5): 710-8.

Fediaevsky, A., S. Tongue, et al. (2007). Atypical and classical scrapie in sheep: prevalence estimates from healthy slaughter and fallen stock surveillance programmes in 20 European countries. *Neuroprion 2007*, Edinburgh, Scotland. 1, 27/09/2007

Fediaevsky, A., S. C. Tongue, et al. (2008). "A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries." *BMC Veterinary Research* 4: 19.

Ferguson, N. M., A. C. Ghani, et al. (2002). "Estimating the human health risk from possible BSE infection of the British sheep flock." *Nature (and supplementary information)* 415(6870): 420-424.

Ferrières M. (2002). Histoire des peurs alimentaires. Du Moyen Âge à l'aube du XXè siècle. Paris. 473 pages

Feyerabend, P. K. (1979). Contre la méthode. Paris, *Seuil*. 349 pages

Fitzmaurice, T. J., D. F. Burke, et al. (2008). "The stability and aggregation of ovine prion protein associated with classical and atypical scrapie correlates with the ease of unwinding of helix-2." *Biochemical Journal* 409(2): 367-75.

Foote, W. C., J. W. Call, et al. (1986). "Embyo transfer in the control of scrapie in sheep and goats." *Proceedings of the US Animal Health Association* 90: 413-416.

Foster, J., C. McKenzie, et al. (2006a). "Lateral transmission of natural scrapie to scrapie-free New Zealand sheep placed in an endemically infected UK flock." *Veterinary Record* 159(19): 633-4.

Foster, J., C. McKenzie, et al. (2006b). "Derivation of a scrapie-free sheep flock from the progeny of a flock affected by scrapie." *Veterinary Record* 159(2): 42-5.

Foster, J., L. Toovey, et al. (2008). "Atypical scrapie in a sheep in a closed UK flock with endemic classical natural scrapie." *Veterinary Record* 162(22): 723-4.

Foster, J. D., M. Bruce, et al. (1996). "Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep." *Veterinary Record* 138: 546-548.

Foster, J. D. and A. G. Dickinson (1988). "The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie." *Veterinary Record* 123: 5-8.

Foster, J. D., W. Goldmann, et al. (2004). "Maternal transmission studies of BSE in sheep." *Journal of General Virology* 85(Pt 10): 3159-63.

Foster, J. D., J. Hope, et al. (1993). "Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats." *Veterinary Record* 133: 339-341.

Foster, J. D., N. Hunter, et al. (1996). "Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer." *Veterinary Record* 138(23): 559-562.

Foster, J. D., W. A. C. McKelvey, et al. (1992). "Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryo transfer." *Veterinary Record* 130: 341-343.

Foster, J. D., D. Parnham, et al. (2001a). "Clinical signs histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats." *Veterinary Record* 148: 165-171.

Foster, J. D., D. W. Parnham, et al. (2001b). "Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission." *The Journal of General Virology* 82: 2319-2326.

Fraser, H. (1976). "The pathology of a natural and experimental scrapie." *Frontiers of Biology* 44: 267-305.

Fraser, H. (1993). "Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals." *British Medical Bulletin* 49(4): 792-809.

Gajdusek, D.-C. (1977). "Unconventional viruses and the Origin and Disappearance of Kuru." *Science* 4307: 943-960.

Gajdusek, D. C. (1972). "Spongiform virus encephalopathies." *Journal of clinical pathology* 6: 78-83.

Gajdusek, D. C. and V. Zigas (1957). "Degenerative disease of the central nervous system in new Guinea." *The New England Journal of Medicine* 14: 974-978.

Gavier-Widen, D., M. Nöremark, et al. (2004). "Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population." *Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation* 16(6): 562-7.

Gavier-Widen, D., M.-J. Stack, et al. (2005). "Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17: 509-527.

Geijo MV., Garrido JM., et al. (2005). First report of atypical scrapie in Spain. Control strategies for small ruminant TSE meeting. S.-T. Network. Bergen, Norway.

Georgsson, G., J. A. Adolfsdottir, et al. (2008). "High incidence of subclinical infection of lymphoid tissues in scrapie-affected sheep flocks." *Archives of Virology*.

Georgsson, G., S. Sigurdarson, et al. (2006). "Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years." *Journal of General Virology* 87(Pt 12): 3737-40.

Ghani, A. C., N. M. Ferguson, et al. (1998a). "Epidemiological determinants of the pattern and magnitude of the vCJD epidemic in Great Britain." *Proceedings Royal Society London Series B Biological Sciences* 265(1413): 2443-2452.

Ghani, A. C., N. M. Ferguson, et al. (1998b). "Estimation of the number of people incubating variant CJD." *The Lancet* 352(9137): 1353-1354.

Gibbs, C. J., Jr. and D. C. Gajdusek (1972). "Transmission of scrapie to the cynomolgus monkey (Macaca fascicularis)." *Nature* 236(5341): 73-4.

Gibbs, C. J., Jr., J. Safar, et al. (1990). "Experimental transmission of scrapie to cattle." *The Lancet* 335(8700): 1275.

Gilks, W. R., S. Richardson, et al. (1996). Markov chain Monte Carlo in Practice. London, *Chapman & Hall*. pages

Glaysher, B. R. and N. A. Mabbott (2007). "Role of the draining lymph node in scrapie agent transmission from the skin." *Immunological Letter*.

Goldmann, W., F. Houston, et al. (2006). "Ovine prion protein variant A136R154L168Q171 increases resistance to experimental challenge with bovine spongiform encephalopathy agent." *Journal of General Virology* 87(Pt 12): 3741-5.

Goldmann, W., N. Hunter, et al. (1990). "Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87: 2476-2480.

Goldmann, W., N. Hunter, et al. (1994). "PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie." *Journal of General Virology* 75: 989-995.

González, L., M. P. Dagleish, et al. (2006). "Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa." *Veterinary Record* 158(10): 325-31.

González, L., M. Jeffrey, et al. (2005). "Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa." *Veterinary Record* 156(26): 846-847.

González, L., S. Martin, et al. (2002). "Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie." *Journal of Comparative Pathology* 126(1): 17-29.

Graner, E., A. F. Mercadante, et al. (2000a). "Cellular prion protein binds Iaminin and mediates neuritogenesis." *Molecular Brain Research* 76: 85-92.

Graner, E., A. F. Mercadante, et al. (2000b). "Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein." *FEBS Letters* 482(3): 257-260.

Grassi, J., E. Comoy, et al. (2001). "Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue." *Veterinary Record* 149(19): 577-582.

Grassi, J., C. Créminion, et al. (2000). "Specific determination of the proteinase K-resistant form of the prion protein using two-site immunometric assays Application to the post-mortem diagnosis of BSE." *Archives of Virology* 16(Supplément): 197-205.

Grassi, J., S. Maillet, et al. (2008). "Progress and limits of TSE diagnostic tools." *Veterinary Research* 39(4): 33.

Green, D. M., V. J. Del Rio Vilas, et al. (2007). "Demographic risk factors for classical and atypical scrapie in Great Britain." *Journal of General Virology* 88(Pt 12): 3486-92.

Greenland, S. (1998). "Induction versus Popper: substance versus semantics." *International Journal Epidemiology* 27(4): 543-8.

Greig, J. R. (1950). "Scrapie in sheep." *Journal of Comparative Pathology* 60(4): 263-266.

Gretzschel, A., A. Buschmann, et al. (2006). "Immunological characterization of abnormal prion protein from atypical scrapie cases in sheep using a panel of monoclonal antibodies." *Journal of General Virology* 87(Pt 12): 3715-22.

Griffith, J. S. (1967). "Self-replication and Scrapie." *Nature* 215: 1043-1044.

Groschup, M. H., C. Lacroux, et al. (2007). "Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France." *Emerging Infectious Diseases* 13(8): 1201-7.

Hagenaars, T. J., C. A. Donnelly, et al. (2000). "The transmission dynamics of the aetiological agent of scrapie in a sheep flock." *Mathematical Biosciences* 168(2): 117-135.

Hamir, A. N., J. M. Miller, et al. (2001). "Diagnosis of preclinical and subclinical scrapie in a naturally infected sheep flock utilizing currently available postmortem diagnostic techniques." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13: 152-154.

Hartsough, G. R. and D. Burger (1965). "Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations." *Journal of Infectious Diseases* 115(4): 387-92.

Healy, A. M., D. Hannon, et al. (2004). "A paired case-control study of risk factors for scrapie in Irish sheep flocks." *Preventive Veterinary Medicine* 64(2-4): 73-83.

Heggebo, R., C. M. Press, et al. (2000). "Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent." *Journal of General Virology* 81(Pt 9): 2327-37.

Heidelberger, P. and P. D. Welch (1983). "Simulation run length control in the presence of an initial transient." *Operations Research* 31: 1109-1144.

Hill, A., M. Desbruslais, et al. (1997). "The same prion strain causes vCJD and BSE." *Nature* 389: 448-450.

Hill, A. B. (1965). "The Environment and Disease: Association or Causation?" *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 58: 295-300.

Hill, A. F. and J. Collinge (2003a). "Subclinical prion infection." *Trends in Microbiology* 11(12): 578-84.

Hill, A. F. and J. Collinge (2003b). "Subclinical prion infection in humans and animals." *British Medical Bulletin* 66: 161-170.

Hill, A. F. and J. Collinge (2004). "Prion strains and species barriers." *Contributions to Microbiology* 11: 33-49.

Hofler, M. (2005). "The Bradford Hill considerations on causality: a counterfactual perspective." *Emerg Themes in Epidemiology* 2: 11.

Hoinville, L. J. (1994). "Decline in the incidence of BSE in cattle born after the introduction of the "feed ban"." *Veterinary Record* 134: 274-275.

Hoinville, L. J. (1996). "A review of the epidemiology of scrapie in sheep." *Revue Scientifique et technique de l'Office Internationale des Epizooties* 15(3): 827-852.

Hoinville, L. J., A. Hoek, et al. (2000). "Descriptive epidemiology of scrapie in Great Britain: results of a postal survey." *Veterinary Record* 146(16): 455-61.

Hoinville, L. J., J. W. Wilesmith, et al. (1995). "An investigation of risk factors for cases of bovine spongiform encephalopathy born after the introduction of the feed ban." *Veterinary Record* 136: 312-318.

Hopp, P. (2007). Epidemiological studies of scrapie in the Norwegian sheep population. Oslo, *Norwegian School of Veterinary Science*. Philosophiae Doctor**:** 94.

Hopp, P., M. K. Omer, et al. (2006). "A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks." *Journal of General Virology* 87(Pt 12): 3729-36.

Hopp, P., M. J. Ulvund, et al. (2001). "A case-control study on scrapie in Norwegian sheep flocks." *Preventive Veterinary Medicine* 1622: 183-198.

Hopp, P., C. R. Webb, et al. (2003). "Monte Carlo simulation of surveillance stratégies for scrapie in Norwegian sheep." *Preventive Veterinary Medicine* 61: 103-125.

Horiuchi, M., N. Yamazaki, et al. (1995). "A cellular form of prion protein (PrPc) exists in many non-neuronal tissues of sheep." *Journal of General Virology* 76(10): 2583-2587.

Hornshaw, M. P., J. R. McDermott, et al. (1995). "Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 207(2): 621-9.

Houston, F., J. D. Foster, et al. (2000). "Transmission of BSE by blood transfusion in sheep." *The Lancet* 356: 999-1000.

Houston, F., W. Goldmann, et al. (2003). "BSE in sheep bred for resistance to infection." *Nature* 423: 498-498.

Hsiao, K., H. F. Baker, et al. (1989). "Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome." *Nature* 338: 342-345.

Hsiao, K. K., M. Scott, et al. (1990). "Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein." *Science* 250: 1587-1590.

Hunter, N. (1997). "PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE." *Trends in Microbiology* 5(8): 331-4.

Hunter, N., J. Dann, et al. (1992). "Are Sinc and the PrP gene congruent? Evidence from PrP gene analysis in Sinc congenic mice." *Journal of General Virology* 73: 2751-2755.

Hunter, N., J. Foster, et al. (2002). "Transmission of prion diseases by blood transfusion." *Journal of General Virology* 83: 2897-2905.

Hunter, N., J. D. Foster, et al. (1996). "Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes." *Archives of Virology* 141: 809-824.

Hunter, N., J. D. Foster, et al. (1992). "Natural scrapie in British sheep: breeds, ages and PrP gene polymorphisms." *Veterinary Record* 130: 389-392.

Hunter, N., L. Moore, et al. (1997). "Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland." *Veterinary Record* 140: 59-63.

Ikeda, T., M. Horiuchi, et al. (1995). "Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan." *Journal of General Virology* 76.

Imrie, C. E., A. Korre, et al. (2008). "Spatial correlation between the prevalence of transmissible spongiform diseases and British soil geochemistry." *Environmental Geochemical Health*.

Jackson, L. W., N. L. Lee, et al. (1999). "Frequency of policy recommendations in epidemiologic publications." *American Journal of Public Health* 89(8): 1206-11.

Jeffrey, M., I. Begara-McGorum, et al. (2002). "Occurrence and Distribution of Infection-specific Prp in Tissues of Clinical Scrapie Cases and Cull Sheep from Scrapie-affected Farms in Shetland." *Journal of Comparative Pathology* 127(4): 264-273.

Jeffrey, M. and L. González (2007). "Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease." *Neuropathology Applied Neurobiology* 33(4): 373-94.

Jeffrey, M., L. González, et al. (2006). "Ovine Infection with the Agents of Scrapie (CH1641 Isolate) and Bovine Spongiform Encephalopathy: Immunochemical Similarities can be Resolved by Immunohistochemistry." *Journal of Comparative Pathology*: 1-13.

Johnson, C. J., K. E. Phillips, et al. (2006). "Prions adhere to soil minerals and remain infectious." *PLoS Pathogens* 2(4): e32.

Jones, E. M. and W. K. Surewicz (2005). "Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids." *Cell* 121(1): 63-72.

Kao, R. R., M. B. Gravenor, et al. (2002). "The Potential Size and Duration of an Epidemic of Bovine Spongiform Encephalopathy in British Sheep." *Science* 295(5598): 332-335.

Kao, R. R., M. B. Gravenor, et al. (2001). "Modelling the national scrapie eradication programme in the UK." *Mathematical Biosciences* 174(2): 61-76.

Kao, R. R., D. M. Green, et al. (2007). "Disease dynamics over very different time-scales: foot-and-mouth disease and scrapie on the network of livestock movements in the UK." *Proceedings Royal Society London Series B Biological Sciences* 4(16): 907-16.

Katz, J. B., J. C. Pedersen, et al. (1992). "Assessment of western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE)." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4(4): 447-9.

Kimberlin, R. H. (1982). "Scrapie agent: prions or virinos?" *Nature* 297: 107-108.

Kimberlin, R. H. and 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: 551.

Kimberlin, R. H. and C. A. Walker (1982). "Pathogenesis of mouse scrapie: patterns of agent replication in different parts of the CNS following intraperitoneal infection." *Journal of the Royal Society of Medicine* 75: 618-624.

Kimberlin, R. H. and C. A. Walker (1989). "Pathogenesis of scrapie in mice after intragastric infection." *Virus Research* 12: 213-220.

Klingsporn, A. L., J. L. Hourrigan, et al. (1969). "Scrapie--eradication and field trial study of the natural disease." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 155(12): 2172-7.

Kocisko, D. A., J. H. Come, et al. (1994). "Cell-free formation of protease-resistant prion protein." *Nature* 370: 471-474.

Konold, T., A. Davis, et al. (2007). "Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report." *BMC Veterinary Research* 3: 1-27.

Konold, T., A. Davis, et al. (2006). "Atypical scrapie cases in the UK." *Veterinary Record* 158(8): 280.

Konold, T., S. J. Moore, et al. (2008). "Evidence of scrapie transmission via milk." *BMC Veterinary Research* 4(1): 14.

Korczyn, A. D. (1991). "Creutzfeldt-Jakob disease among libyan jews." *European Journal of Epidemiology* 7(5): 490-493.

Kretzschmar, H.-A., S. B. Prusiner, et al. (1986). "Scrapie Prion Proteins Are Synthesized in Neurons." *American Journal of Pathology* 122(1): 1-5.

Kruger, D., A. Thomzig, et al. (2009). "Faecal shedding, alimentary clearance and intestinal spread of prions in hamsters fed with scrapie." *Veterinary Research* 40(1): 4.

Kulldorff, M. (1997). "A spatial scan statistic." *Theory and Methods* 26(6): 1481-1496.

Kuncheva, L. I., V. J. del Rio Vilas, et al. (2007). "Diagnosing scrapie in sheep: a classification experiment." *Computers in Biology and Medicine* 37(8): 1194-202.

Kundi, M. (2007). "Causality and the interpretation of epidemiologic evidence." *Ciencia & saude coletiva* 12(2): 419-28.

Lacroux, C., F. Corbière, et al. (2007). "Dynamics and genetics of PrPSc placental accumulation in sheep." *Journal of General Virology* 88(Pt 3): 1056-61.

Lacroux, C., S. Simon, et al. (2008). "Prions in milk from ewes incubating natural scrapie." *PLoS Pathogens* 4(12): e1000238.

Langeveld, J. P., J. G. Jacobs, et al. (2006). "Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retro-pharyngeal lymph nodes of sheep." *BMC Veterinary Research* 2: 19.

Lantier, F. (2008). BSE / Scrapie intracerebrally co-infected sheep. *Prion 2008*, Madrid, Spain. October 9, 2008

Laplanche, J.-L., J. Chatelain, et al. (1993). "PrP Polymorphisms Associated with Natural Scrapie Discovered by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis." *Genomics* 15: 30-37.

Lasmézas, C. I., J.-P. Deslys, et al. (1997). "Transmission of the BSE Agent to Mice in the Absence of Detectable Abnormal Prion Protein." *Science* 275: 402-405.

Lasseur, J. and E. Landais (1992). "Mieux valoriser l'information contenue dans les carnets d'agnelage pour évaluer des performances et des carrières de reproduction en élevage ovin-viande." *INRA Productions Animales* 5(1): 43-58.

Lauren, J., D. A. Gimbel, et al. (2009). "Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers." *Nature* 457(7233): 1128-32.

Le Dur, A., V. Béringue, et al. (2005). "A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes." *PNAS* 102(44): 16031-16036.

Leach, S. P., M. D. Salman, et al. (2006). "Trace elements and prion diseases: a review of the interactions of copper, manganese and zinc with the prion protein." *Animal Health Research Reviews* 7(1-2): 97-105.

Leclerc, E., H. Serban, et al. (2006). "Copper induces conformational changes in the N-terminal part of cell-surface PrPC." *Archives of Virology* 151(11): 2103-9.

Ledford, H. (2007). "Virus paper reignites prion spat." *Nature* 445(7128): 575.

Legname, G., I. V. Baskakov, et al. (2004). "Synthetic Mammalian Prions." *Science* 305(5684): 673-676.

Legname, G., H. O. Nguyen, et al. (2005). "Strain-specified characteristics of mouse synthetic prions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102(6): 2168-73.

Lehmann, S. (2002). "Metal ions and prion diseases." *Current Opinion in Chemical Biology* 6(2): 187-192.

Lehmann, S. and D. A. Harris (1997). "Blockade of glycosylation promotes acquistion of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells [In Process Citation]." *Journal Biological Chemistry* 272: 21479-21487.

Ligios, C., M. Jeffrey, et al. (2002). "Distinction of Scrapie Phenotypes in Sheep by Lesion Profiling." *Journal of Comparative Pathology* 127: 45-57.

Ligios, C., C. J. Sigurdson, et al. (2005). "PrPSc in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis." *Nature Medicine* 11(11): 1137-1138.

Loi n° 2005-157 du 23 février 2005 relative au développement des territoires ruraux (1) *Journal Officiel de la République Française,* 24 février 2005, 1-art.115: 3073

Lugaresi, E., R. Medori, et al. (1986). "Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei." *New England Journal of Medicine* 315(16): 997-1003.

Lühken, G., A. Buschmann, et al. (2007). "Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases." *Veterinary Research* 38(1): 65-80.

Lunn, D. J., A. Thomas, et al. (2000). "WinBUGS - A Bayesian modelling framework: Concepts, structure, and extensibility." *Statistics and Computing* 10(4): 325-337.

Lynn, T., J. Grannis, et al. (2007). "An evaluation of scrapie surveillance in the United States." *Preventive Veterinary Medicine* 81(1-3): 70-9.

Mahal, S. P., E. A. Asante, et al. (2001). "Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene." *Gene* 268(1-2): 105-114.

Manuelidis, L. (2007). "A 25 nm virion is the likely cause of transmissible spongiform encephalopathies." *Journal of Cellular Biochemestry* 100(4): 897-915.

Manuelidis, L., Y. Liu, et al. (2009). "Strain-specific viral properties of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) are encoded by the agent and not by host prion protein." *Journal of Cellular Biochemistry* 106(2): 220-31.

Manuelidis, L., Z. X. Yu, et al. (2007). "Cells infected with scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease agents produce intracellular 25-nm virus-like particles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104(6): 1965-70.

Martin, K., T. Toshiro, et al. (2003). Power comparisons for disease clustering tests, *Elsevier Science Publishers B. V.* 42**:** 665-684.

Masters, C. L., D. C. Gajdusek, et al. (1981). "The familial occurrence of Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease." *Brain* 104(3): 535-58.

Masters, C. L., J. O. Harris, et al. (1979). "Creutzfeldt-Jakob Disease: Patterns of Worldwide Occurrence and the Significance of Familial and Sporadic Clustering." *Annals of Neurology* 5(2): 177-188.

McBride, P. A., W. J. Schulz-Schaeffer, et al. (2001). "Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves." *Journal of Virology* 75(19): 9320-9327.

McIntyre, K. M., V. J. Del Rio Vilas, et al. (2008). "No temporal trends in the prevalence of atypical scrapie in British sheep, 2002-2006." *BMC Veterinary Research* 4(1): 13.

Mechelli, L. and A. Mantovani (1988). "Scrapie in sheep in central and southern Italy." *Veterinary Research Communications* 12(2-3): 165-167.

Medori, R., P. Montagna, et al. (1992). "Fatal familial insomnia: A second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178." *Neurology* 42(3 Pt 1): 669-70.

Merz, P. A., R. G. Rohwer, et al. (1984). "Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases." *Science* 225: 437-439.

Meyer-Luehmann, M., J. Coomaraswamy, et al. (2006). "Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host." *Science* 313(5794): 1781-4.

Meyer, R. K., A. Lustig, et al. (2000). "A monomer-dimer equilibrium of a cellular prion protein (PrPC) not observed with recombinant PrP." *Journal of Biological Chemistry* 275(48): 38081-7.

Meyer, R. K., M. P. McKinley, et al. (1986). "Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 83(8): 2310-4.

Miller, J. M., A. L. Jenny, et al. (1993). "Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5: 309-316.

Morales, R., K. Abid, et al. (2007). "The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features." *Biochimica and Biophysica Acta* 1772(6): 681-91.

Moreno, C. R., G. M. Cosseddu, et al. (2008). "Identification of new quantitative trait Loci (other than the PRNP gene) modulating the scrapie incubation period in sheep." *Genetics* 179(1): 723-6.

Moreno, C. R., K. Moazami-Goudarzi, et al. (2007). "Which PrP haplotypes in a French sheep population are the most susceptible to atypical scrapie?" *Archives of Virology* 152(6): 1229-32.

Morgan, K. L., K. Nicholas, et al. (1990). "A questionnaire survey of the prevalence of scrapie in sheep in Britain." *Veterinary Record* 127(15): 373-6.

Morignat, E., G. Cazeau, et al. (2006). "Estimates of the prevalence of transmissible spongiform encephalopathies in sheep and goats in France in 2002." *Veterinary Record* 158(20): 683-7.

Moser, M., R. J. Colello, et al. (1995). "Developmental expression of the prion protein gene in glial cells." *Neuron* 14(3): 509-17.

Mouillet-Richard, S., M. Ermonval, et al. (2000). "Signal Transduction Through Prion Protein." *Science* 289(5486): 1925-1928.

Mouillet-Richard, S. and O. Kellermann (2001). "Les pistes pour débusquer le role de la proteine prion dans les cellules neuronales." *Médecine / Sciences M/S* 17(3): 402-405.

Moum, T., I. Olsaker, et al. (2005). "Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases." *Journal of General Virology* 86(Pt 1): 231-5.

Moynagh, J. and H. Schimmel (1999). "Tests for BSE evaluated." *Nature* 400: 105.

Naslavsky, N., R. Stein, et al. (1997). "Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform." *Journal of Biological Chemistry* 272(10): 6324-31.

Nentwig, A., A. Oevermann, et al. (2007). "Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie." *PLoS Pathogens* 3(6): e82.

Nicholas, F. W. (2005). "Animal breeding and disease." *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 360(1459): 1529-36.

O'Doherty, E., A. Healy, et al. (2002). "Prion protein (PrP) gene polymorphisms associated with natural scrapie cases and their flock-mates in Ireland." *Research in Veterinary Science* 73(3): 243-50.

O'Rourke, K. I., T. V. Baszler, et al. (2000). "Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue." *Journal of Clinical Microbiology* 38(9): 3254-9.

Oesch, B., D. Westaway, et al. (1985). "A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein." *Cell* 40: 735-746.

OIE (2004). Scrapie. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Paris, *World organisation for animal health*: 642-653.

Onnasch, H., H. M. Gunn, et al. (2004). "Two Irish cases of scrapie resembling Nor98." *Veterinary Record* 155: 636-637.

Orge, L., A. Galo, et al. (2004). "Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal." *Journal of General Virology* 85(Pt 11): 3487-91.

Owen, F., M. Poulter, et al. (1989). "Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease." *The Lancet* 1(8628): 51-2.

Palhière, I., M. Brochard, et al. (2008). "Impact of strong selection for the PrP major gene on genetic variability of four French sheep breeds(Open Access publication)." *Genetic Selection and Evolution* 40(6): 663-80.

Palhière, I., D. François, et al. (2002). Allele frequencies of the PrP gene in 29 french sheep breeds. Possible use in selection for resistance to scrapie. *7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Montpellier, France. 13,

Palmer, A.-C. (1959). "Attempt to transmit Scrapie by Injection of Semen from an Affected Ram." *Veterinary Record* 71: 664-664.

Palsson, P. A. (1979). Rida (scrapie) in Iceland and its epidemiology. Slow Transmissible Disease of the Nervous System. 1: 357-366.

Pan, K.-M., M. Baldwin, et al. (1993). "Conversion of α-helices into β–sheets features in the formation of the scrapie prion proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 10962-10966.

Parry, H. B. (1962). "Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep." *Heredity* 17: 75-105.

Parry, H. B. (1979). "Elimination of natural scrapie in sheep by sire genotype selection." *Nature* 277: 127-129.

Parry, H. B. (1983). Pathology of Natural Scrapie. London, *Ed: By*. 103-138 pages

Pattison, I. H. (1964). "The spread of scrapie by contact between affected and healthy sheep, goats or mice." *Veterinary Record* 76(12): 333-336.

Pattison, I. H. (1974). "Scrapie in sheep selectively bred for high susceptibility." *Nature* 248: 594-595.

Pattison, I. H., M. N. Hoare, et al. (1972). "Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep." *Veterinary Record* 90(17): 465-468.

Pattison, I. H., M. N. Hoare, et al. (1974). "Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep." *British Veterinary Journal* 130: lxv-lxvii.

Pattison, I. H. and J. N. Jebbett (1971). "Clinical and histological observations on cuprizone toxicity and scrapie in mice." *Research in Veterinary Science* 12(4): 378-80.

Pattison, I. H. and K. M. Jones (1967). "The possible nature of the transmissible agent of scrapie." *Veterinary Record* 80(1): 2-9.

Pattison, I. H. and G. C. Millson (1961). "Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome." *Journal of Comparative Pathology* 71: 101-9.

Paul, M., D. Abrial, et al. (2007). "Bovine Spongiform Encephalopathy and Spatial Analysis of the Feed Industry." *Emerging Infectious Diseases*: 1-20.

Pauly, P. C. and D. A. Harris (1998). "Copper Stimulates Endocytosis of the Prion Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 273(50): 33107-33110.

Peretz, D., M. R. Scott, et al. (2001). "Strain-specified relative conformational stability of the scrapie prion protein." *Protein Sciences* 10(4): 854-63.

Philippe, S., C. Ducrot, et al. (2005). "Sheep Feed and Scrapie, France." *Emerging Infectious Diseases* 11(8): 1274-1279.

Phillips, C. V. and K. J. Goodman (2004). "The missed lessons of Sir Austin Bradford Hill." *Epidemiological Perspective and Innovation* 1(1): 3.

Popper, K. (1991). La connaissance objective. Manchecourt. 578 pages

Poser, C. M. (2002a). "Notes on the history of the prion diseases. Part I." *Clinical Neurology and Neurosurgery* 104(1): 1-9.

Poser, C. M. (2002b). "Notes on the history of the prion diseases. Part II." *Clinical Neurology and Neurosurgery* 104(2): 77-86.

Prusiner, S. B. (1982). "Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie." *Science* 216: 136-144.

Prusiner, S. B. (1991). "Molecular biology of prion disease." *Science* 252: 1515-1522.

Prusiner, S. B. (1993). "Genetic and Infectious Prion Diseases." *Archives of Neurology* 50(11): 1129-1153.

Prusiner, S. B. (1998). "Prions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95(23): 13363-13383.

Prusiner, S. B., M. Scott, et al. (1990). "Transgenetic Studies Implicate Interactions between Homologous PrP Isoforms in Scrapie Prion Replication." *Cell* 63(4): 673-686.

Pushie, M. J., A. Rauk, et al. (2009). "Can copper binding to the prion protein generate a misfolded form of the protein?" *BioMetals* 22(1): 159-75.

Quaglio, E., R. Chiesa, et al. (2001). "Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform." *J Biol Chem* 276(14): 11432-8.

Race, R. and B. Chesbro (1998). "Scrapie infectivity found in resistant species." *Nature* 392(6678): 770.

Race, R., D. Ernst, et al. (1992). "Diagnostic implications of detection of proteinase K-resistant protein in spleen, lymph nodes, and brain of sheep." *American Journal of Veterinary Research* 53(6): 883-885.

Race, R., A. Jenny, et al. (1998). "Scrapie Infectivity and Proteinase K-Resistant Prion Protein in Sheep Placenta, Brain, Spleen, and Lymph Node: Implications for Transmission and Antemortem Diagnosis." *The Journal of Infectious Diseases* 178(4): 949-953.

Race, R., A. Raines, et al. (2001). "Long-Term Subclinical Carrier State Precedes Scrapie Replication and Adaptation in a Resistant Species: Analogies to Bovine Spongiform Encephalopathy and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in Humans." *Journal of Virology* 75(21): 10106-10112.

Reckzeh, C., C. Hoffmann, et al. (2007). "Rapid testing leads to the underestimation of the scrapie prevalence in an affected sheep and goat flock." *Veterinary Microbiology* 123(4): 320-7.

Richardson, S. M., C.; Green, M.; Draper, G. & Muirhead, C. (1995). "Spatial variation of natural radiation and childhood leukaemia incidence in Great Britain." *Statistics in Medicine* 14: 2487-2501.

Riek, R. (2006). "Cell biology: infectious Alzheimer's disease?" *Nature* 444(7118): 429-31.

Roderick J. A. Little and Donald B. Rubin (1988). Statistical Analysis with Missing Data. New York, *Wiley*. 408 pages

Rongyan, Z., L. Xianglong, et al. (2008). "Evolution and differentiation of the prion protein gene (PRNP) among species." *Journal of Heredity* 99(6): 647-52.

Roqueplo, P. (1997). Entre savoir et décision, l'expertise scientifique. *INRA*. Paris. 107 pages

Rosenthal, N. P., J. Keesey, et al. (1976). "Familial neurological disease associated with spongiform encephalopathy." *Archives of Neurology* 33(4): 252-9.

Rubenstein, R., P. C. Gray, et al. (1998). "Detection and Discrimination of PrPsc by Multi-spectral Ultraviolet Fluorescence." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 246: 100-106.

Rubenstein, R., P. A. Merz, et al. (1987). "Detection of scrapie-associated fibrils (SAF) and SAF proteins from scrapie-affected sheep." *Journal of Infectious Diseases* 156(1): 36-42.

Rudd, P. M., A. H. Merry, et al. (2002). "Glycosylation and prion protein." *Current opinion in structural biology* 12(5): 578-86.

Russo, P., C. Ducrot, et al. (1996). "Tremblante ovine : bilan de six années d'épidémiosurveillance dans le sud de la France (étude sur 173 cas)." *Le Point Vétérinaire* 28(179): 39-42.

Ryder, S., G. Dexter, et al. (2004). "Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy." *Research in Veterinary Science* 76(3): 211-7.

Ryder, S. J., S. A. C. Hawkins, et al. (2000). "The Neuropathology of Experimental Bovine Spongiform Encephalopathy in the Pig." *Journal of Comparative Pathology* 122: 131-143.

Ryder, S. J., Y. I. Spencer, et al. (2001). "Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep." *Veterinary Record* 148: 7-13.

Saborio, G. P., B. Permanne, et al. (2001). "Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding." *Nature* 411: 810-813.

Safar, J., H. Wille, et al. (1998). "Eight prion strains have PrPSc molecules with different conformations." *Nature Medicine* 4(10): 1157-1165.

Safar, J. G., P. Lessard, et al. (2008). "Transmission and detection of prions in feces." *Journal of Infectious Diseases* 198(1): 81-9.

Sarradin, P., S. Melo, et al. (2008). "Semen from scrapie-infected rams does not transmit prion infection to transgenic mice." *Reproduction* 135(3): 415-8.

Sasieni, P. D. (1997). "From genotypes to genes: doubling the sample size." *Biometrics* 53(4): 1253-61.

Saunders, G. C., S. Cawthraw, et al. (2006). "PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain." *Journal of General Virology* 87(Pt 11): 3141-9.

Savey, M., P. Belli, et al. (1991). "Le réseau d'épidémiosurveillance de la BSE en France : principes — premiers résultats." *Epidémiologie et Santé Animale* 19: 49-61.

Scherbel, C., R. Pichner, et al. (2006). "Degradation of scrapie associated prion protein (PrPSc) by the gastrointestinal microbiota of cattle." *Veterinary Research* 37(5): 695-703.

Schneider, K., H. Fangerau, et al. (2008). "The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie." *Brain Research Bulletin* 77(6): 343-55.

Schoch, G., H. Seeger, et al. (2006). "Analysis of prion strains by PrPSc profiling in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." *PLoS Medicine* 3(2): e14.

Schreuder, B. E. C., L. J. M. van Keulen, et al. (1997). "Control of scrapie eventually possible?" *The Veterinary Quarterly* 19(3): 105-113.

Schreuder, B. E. C., L. J. M. van Keulen, et al. (1996). "Preclinical test for prion diseases." *Nature* 381: 563.

Schreuder, B. E. C., L. J. M. Van Keulen, et al. (1998). "Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie." *Veterinary Record* 142(21): 564-568.

Schreuder, B. E. C., J. W. Wilesmith, et al. (1997). "Risk of BSE from the import of cattle from the United Kingdom into countries of the European Union." *Veterinary Record*: 187-190.

Scientific Steering Committee (1999). Scientific opinion on the policy of breeding and genotyping of sheep, i.e. the issue of whether sheep should be bred to be resistance to scrapie. E. Commission, *European Commission*: 19 pp.

Scientific Steering Committee (2001). Opinion on requirements for statistically authorative BSE/TSE surveys. E. Commission, *Europen Commission*: 39.

Scientific Steering Committee (2002). Strategy to investigate the possible presence of BSE in sheep adopted by the Scientific Steering Committee at its meeting of 4-5 April 2002. E. Commission, *European Commission*: 30 pp.

Scott, J. R., J. D. Foster, et al. (1993). "Conjunctival instillation of scrapie in mice can produce disease." *Veterinary Microbiology* 34: 305-309.

Seidel, B., A. Thomzig, et al. (2007). "Scrapie Agent (Strain 263K) can transmit disease via the oral route after persistence in soil over years." *PLoS ONE* 2(5): e435.

Seuberlich, T., C. Botteron, et al. (2007). "Atypical scrapie in a swiss goat and implications for transmissible spongiform encephalopathy surveillance." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19(1): 2-8.

Sigurdarson, S. (1991). Epidemiology of Scrapie in Iceland and experience with control measures. *Sub-acute Spongiform Encephalopathies*, Brussels, Kluwer Academic Publishers, for the Commission of the European Communities. 233-242,

Sigurdsson, B. (1954). "Rida a chronic encephalitis of sheep.With General Remarks on Infections Which Develop Slowly and Some of Their Special Characteristics." *British Veterinary Journal*: 341-354.

Simmons, H. A., M. M. Simmons, et al. (2009). "Atypical scrapie in sheep from a UK research flock which is free from classical scrapie." *BMC Veterinary Research* 5(1): 8.

Simmons, M. M., T. Konold, et al. (2007). "Experimental transmission of atypical scrapie to sheep." *BMC Veterinary Research* 3(1): 20.

Simmons, M. M., S. J. Ryder, et al. (2000). "Scrapie surveillance in Great Britain: results of an abattoir survey, 1997/1998." *Veterinary Record* 146: 391-395.

Siso, S., L. Gonzalez, et al. (2006). "Prion protein in kidneys of scrapie-infected sheep." *Veterinary Record* 159(10): 327-328.

Sofianidis, G., V. Psychas, et al. (2008). "Atypical PrP(sc) Distribution in Goats Naturally Affected with Scrapie." *Journal of Comparative Pathology*.

Somerville, R. A., C. R. Birkett, et al. (1997). "Immunodetection of PrPsc in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows." *The Journal of General Virology* 78: 2389-2396.

Spiegelhalter, D. J. B., N.G.; Carlin, B.P. & van, der, Linder A. (2002). "Bayesian measures of model complexity and fit." *Jounal of the Royal Statistical British Society* 64(4): 583-639.

Springbett, A. J., K. MacKenzie, et al. (2003). "The contribution of genetic diversity to the spread of infectious diseases in livestock populations." *Genetics* 165(3): 1465-1474.

St Rose, S. G., N. Hunter, et al. (2006). "Comparative evidence for a link between Peyer's patch development and susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies." *BMC Infectious Diseases* 6: 5.

Stack, J., M. J. Chaplin, et al. (2002). "Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occuring sheep scrapie sheep-passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1) bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies." *Acta Neuropathologica* 104(3): 279-286.

Stamp, J. T., J. G. Brotherston, et al. (1959). "Further studies on scrapie." *Journal of Comparative Pathology* 69: 268-80.

Stevens, D. J., E. D. Walter, et al. (2009). "Early onset prion disease from octarepeat expansion correlates with copper binding properties." *PLoS Pathogens* 5(4): e1000390.

Stevenson, M. A., R. S. Morris, et al. (2005). "Area-level risks for BSE in British cattle before and after the July 1988 meat and bone meal feed ban." *Preventive Veterinary Medicine* 69(1-2): 129-144.

Stevenson, M. A., J. W. Wilesmith, et al. (2000). "Temporal aspects of the epidemic of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain : individual animal-associated risk factors for the disease." *Veterinary Record* 147: 349-354.

Stockman, S. (1926). "Contribution to the study of the disease known as scrapie." *Journal of Comparative Pathology* 39: 42-71.

Stringer, S. M., N. Hunter, et al. (1998). "A mathematical model of the dynamics of scrapie in a sheep flock." *Mathematical Biosciences* 153(2): 79-98.

Supattapone, S. (2004). "Prion protein conversion in vitro." *Journal of Molecular Medicine* 82(6): 348-56.

Tanaka, M., S. R. Collins, et al. (2006). "The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes." *Nature* 442(7102): 585-589.

Taraboulos, A., M. Rogers, et al. (1990). "Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagine-linked glycosylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87(21): 8262-6.

Taylor, D. M. (2000). "Inactivation of Transmissible Degenerative Encephalopathy Agents: A Review." *Veterinary Journal* 159: 10-17.

Taylor, D. M. (2004). "Resistance of transmissible spongiform encephalopathy agents to decontamination." *Contribution in Microbiology* 11: 136-45.

Telling, G. C. (2008). "Transgenic mouse models of prion diseases." *Methods in Molecular Biology* 459: 249-63.

Thackray, A. M., M. A. Klein, et al. (2003). "Subclinical Prion Disease Induced by Oral Inoculation." *Journal of Virology* 14(77): 7991-7998.

Thackray, A. M., R. Knight, et al. (2002). "Metal imbalance and compromised antioxidant function are early changes in prion disease." *Biochemical Journal* 362(Pt 1): 253-8.

Thomzig, A., W. Schulz-Schaeffer, et al. (2007). "Accumulation of pathological prion protein PrPSc in the skin of animals with experimental and natural scrapie." *PLoS Pathogens* 3(5): e66.

Tongue, S. C., J. W. Wilesmith, et al. (2004). "Frequencies of prion protein (PrP) genotypes and distribution of ages in 15 scrapie-affected flocks in Great Britain." *Veterinary Record* 154(1): 9-16.

Tongue, S. C., J. W. Wilesmith, et al. (2008). "The importance of the PrP genotype in active surveillance for ovine scrapie." *Epidemiology and Infectection* 136(5): 703-12.

Toni, M., M. L. Massimino, et al. (2005). "Extracellular copper ions regulate cellular prion protein (PrPC) expression and metabolism in neuronal cells." *FEBS Letter* 579(3): 741-4.

Touzeau, S., M. E. Chase-Topping, et al. (2006). "Modelling the spread of scrapie in a sheep flock: evidence for increased transmission during lambing seasons." *Archives of Virology* 151(4): 735-51.

Vaccari, G., M. A. Di Bari, et al. (2006). "Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie." *Journal of General Virology* 87(Pt 5): 1395-402.

van Keulen, L. J., A. Bossers, et al. (2008). "TSE pathogenesis in cattle and sheep." *Veterinary Research* 39(4): 24.

van Keulen, L. J., B. E. Schreuder, et al. (2000). "Pathogenesis of natural scrapie in sheep." *Archives of Virology. Supplementum*(16): 57-71.

van Keulen, L. J. M., B. E. C. Schreuder, et al. (1996). "Immunohistochemical Detection of Prion in Lymphoid Tissues of Sheep with Natural Scrapie." *Journal of Clinical Microbiology* 34(5): 1228-1231.

van Keulen, L. J. M., B. E. C. Schreuder, et al. (1999). "Scrapie-associated Prion Protein in the Gastro-intestinal Tract of Sheep with Natural Scrapie." *Journal Comparative Pathology* 121: 55-63.

van Keulen, L. J. M., B. E. C. Schreudrer, et al. (1995). "Immunohistochemical Detection and Localization of Prion Protein in Brain Tissue of Sheep With Natural Scrapie." *Veterinary Pathology* 32: 299-308.

van Keulen, L. J. M., M. E. W. Vromans, et al. (2002). "Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep." *(APMIS) Acta Pathologica Microbiologica and Immunologica Scandinavica* 110(1): 23-32.

Vascellari, M., R. Nonno, et al. (2007). "PrPSc in salivary glands of scrapie-affected sheep." *Journal of Virology* 81(9): 4872-6.

Vidal, E., R. Tortosa, et al. (2007). "Lack of PrP(sc) immunostaining in intracranial ectopic lymphoid follicles in a sheep with concomitant non-suppurative encephalitis and Nor98-like atypical scrapie: A case report." *Veterinary Journal*.

Walker, L., H. Levine, et al. (2006). "Koch's postulates and infectious proteins." *Acta Neuropathologica* 112(1): 1-4.

Wang, S., W. C. Foote, et al. (2001). "Preventing Experimental Vertical Transmission of Scrapie by Embryo Transfer." *Theriogenology* 56: 315-327.

Weissmann, C. (1999). "Molecular Genetics of Transmissible Spongiform Encephalopathies." *The Journal of Biological Chemistry* 274(1): 3-6.

Weissmann, C. (2005). "Birth of a prion: spontaneous generation revisited." *Cell* 122(2): 165-8.

Wells, G. A. H., S. A. C. Hawkins, et al. (2003). "Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs." *The Journal of General Virology* 84: 1021-1031.

Wells, G. A. H., A. C. Scott, et al. (1987). "A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle." *Veterinary Record* 121: 419-420.

White, A. R., S. J. Collins, et al. (1999). "Prion Protein-Deficient Neurons Reveal Lower Glutathione Reductase Activity and Increased Susceptibility to Hydrogen Peroxide Toxicity." *American Journal of Pathology* 155(5): 1723-1730.

Wientjens, D. P., Z. Davanipour, et al. (1996). "Risk factors for Creutzfeldt-Jakob disease: a reanalysis of case-control studies." *Neurology* 46(5): 1287-91.

Wilesmith, J. W. (1996). Recent observations on the epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. Bovine Spongiform Encephalopathy. The BSE Dilemma. *C. J. Gibbs*. *Springer Verlag New York*. 4**:** 45-55.

Wilesmith, J. W., J. B. M. Ryan, et al. (1991). "Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin." *Veterinary Record* 128: 199-203.

Wilesmith, J. W., J. B. M. Ryan, et al. (1992). "Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates." *Research in Veterinary Science* 52: 325-331.

Wilesmith, J. W., A. H. Wells, et al. (1997). "A cohort study to examine maternally-associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy." *Veterinary Record* 141(10): 239-243.

Wilesmith, J. W., G. A. H. Wells, et al. (1988). "Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies." *Veterinary Record* 123: 638-644.

Will, R. G., J. W. Ironside, et al. (1996). "A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK." *The Lancet* 347(9006): 921-925.

Williams, E. S. and S. Young (1980). "Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy." *Journal of Wildlife Diseases* 16(1): 89-97.

Wilson, D. R. (1951). "Scrapie." *Veterinary Record* 64(32): 468.

Wineland, N. E., L. A. Detwiler, et al. (1998). "Epidemiologic analysis of reported scrapie in sheep in the United States: 1,117 cases (1947-1992)." *JAVMA Journal American Medical Association* 212(5): 713-718.

Wong, B. S., D. R. Brown, et al. (2001). "Oxidative impairment in scrapie-infected mice is associated with brain metals perturbations and altered antioxidant activities." *Journal of Neurochemistry* 79(3): 689-698.

Wong, B. S., T. Liu, et al. (2001). "Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein." *Journal of Neurochemistry* 76(2): 565-572.

Wood, J. L., I. S. McGill, et al. (1997). "Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991." *Veterinary Record* 140(7): 167-74.

Woolhouse, M. E. J., S. M. Stringer, et al. (1998). "Epidemiology and control of scrapie within a sheep flock." *Proceedings Royal Society London Series B Biological Sciences* 265: 1205-1210.

Wrathall, A. E. (1997). "Risks of transmitting scrapie and bovine spongiform encephalopathy by semen and embryos." *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties* 16(1): 240-264.

Wrathall, A. E., G. R. Holyoak, et al. (2008). "Risks of transmitting ruminant spongiform encephalopathies (prion diseases) by semen and embryo transfer techniques." *Theriogenology* 70(5): 725-45.

Wyatt, J. M., G. R. Pearson, et al. (1990). "Spongiform encephalopathy in a cat." *Veterinary Record*: 513.

Yuan, J., X. Xiao, et al. (2006). "Insoluble aggregates and protease-resistant conformers of prion protein in uninfected human brains." *Journal of Biological Chemistry* 281(46): 34848-58.

Zatta, P. and A. Frank (2007). "Copper deficiency and neurological disorders in man and animals." *Brain Research Reviews* 54(1): 19-33.

Zhang, H., J. Stockel, et al. (1997). "Physical studies of conformational plasticity in a recombinant prion protein." *Biochemistry* 36(12): 3543-53.

Zlotnik, I. and J. C. Rennie (1965). "Experimental Transmission of Mouse Passaged Scrapie to Goats, Sheep, Rats and Hamsters." *Journal of Comparative Pathology* 75: 147-157.

Annexes

Liste des publications et des communications orales

Publications acceptées ou publiées

Fediaevsky A, Gasqui P, Calavas D, Ducrot C. Discrepant epidemiological patterns between classical and atypical scrapie in sheep flocks under French TSE control measures. Veterinary Journal., In Press

Fediaevsky A., Morignat E, Ducrot C, Calavas D. A Case–Control Study on the Origin of Atypical Scrapie in Sheep, France, Emerging Infectious Disease 2009, (15); 710-718

Fediaevsky A, Tongue SC, Nöremark M, Calavas D, Ru G, Hopp P. A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. BMC veterinary research. 2008;4:19.

Cazeau G, Fediaevsky A, Calavas D. Prévalence des formes classique et atypique de tremblante chez les petits ruminants en France entre 2002 et 2006. Revue de Médecine Véterinaire. 2008;6(159):348-56.

Publications soumises

Fediaevsky A. Abrial D, Calavas D, Ducrot C. Spatial analysis of atypical and classial scrapie in France. Epidemiology and Infection, Soumis

Fediaevsky A. Moreno C., Ducrot C, Calavas D. Genetic susceptibility of atypical scrapie and selection of ARR allele. Genetic Selection and Evolution, Soumis

Fediaevsky A. Ingravalle F, Maurela C, Ru, G, Noremark M, Thorgeirsdottir S, Hopp P, Investigation of the occurrence of secondary atypical scrapie cases in 12 European countries. BMC Veterinary Research, Soumis

Communications orales

Fediaevsky A, Tongue SC, Nöremark M, Calavas D, Ru G, Hopp P. (2009) No evidence of contagiousness of atypical scrapie: results from a 12-country European study, Prion 2009, Thessalonique – Grece (acceptée)

Fediaevsky A. Abrial D, Calavas D, Ducrot C. (2009) Does atypical scrapie pop up at random? ISVEE 2009, Durban-Afrique du Sud

Fediaevsky A, Morignat E, Ducrot C, Calavas D. (2009) A case control study on atypical scrapie in French sheep, ISVEE 2009, Durban-Afrique du Sud

Fediaevsky A, Morignat E, Ducrot C, Calavas D. (2008) A case control study on atypical scrapie in French sheep. Prion 2008, Madrid-Espagne

Fediaevsky A., Tongue S.-C., et al. (2007). Atypical and classical scrapie in sheep: prevalence estimates from healthy slaughter and fallen stock surveillance programmes in 20 European countries. Prion 2007, Edimbourg-Ecosse.

Fediaevsky A., Ducrot C., et al. (2007). Tremblante atypique: acquis et interrogations. SNGTV, Nantes

Fediaevsky A., Calavas D. (2006), Some considerations on the Epidemiology of scrapie. SRTSE Network, Lisbonne-Portugal

Articles de vulgarisation

Fediaevsky A., Bélichon S., et al. (2007). "Surveillance et prévalence des EST chez les petits ruminants." Bulletin Epidémiologique, 25: 1-5.

Fediaevsky A., Arsac J. N., et al. (2007). "Tremblante atypique: chemin vers une caractérisation." Le Point Vétérinaire, 280: 23-26.

Fediaevsky A., Arsac J. N., et al. (2007). "Tremblante atypique: tableau épidémioclinique et contrôle." Le Point Vétérinaire, 281: 23-26.

Ducrot C, Corbiere F, Fediaevsky A, Calavas D. La tremblante où en est-on? Bulletin des GTV. A paraître en 2009.

Tremblante atypique acquis et interrogations

Tremblante atypique : acquis et interrogations

Alexandre Fediaevsky[1], Christian Ducrot[2], Géraldine Cazeau[1], Didier Calavas[1]

[1]AFSSA Lyon, Unité épidémiologie, 31 av. Tony Garnier, 69364 Lyon cedex 7
[2]INRA Theix, Unité épidémiologie, 63122 Saint-Genès-Champanelle

Résumé
La tremblante atypique est une encéphalopathie spongiforme transmissible (EST) des petits ruminants, de découverte récente. Cette maladie initialement caractérisée par les propriétés biochimiques de la PrP^{res} et la répartition des lésions et de la PrP^{res} dans le système nerveux central, se distingue de la tremblante classique sur plusieurs plans. Chez les ovins, tous les génotypes sont atteints avec une sensibilité plus marquée pour les allèles AFRQ et ALHQ. La maladie est présente à un faible niveau dans les populations ovine et caprine. Les données sur la physiopathologie de la maladie et son épidémiologie sont encore insuffisantes pour en dresser un schéma explicatif.

Les EST sont des maladies neurodégénératives d'évolution fatale. Ces maladies se caractérisent par des lésions de vacuolisation du système nerveux central et par l'accumulation d'un isomère anormal (PrP^{Sc}) de la protéine prion cellulaire normale (PrP^{c}). Chez les petits ruminants, la tremblante est décrite depuis le $XVIII^{ème}$ siècle et ses caractéristiques sont maintenant bien cernées (pathogénie, sensibilité génétique, transmissions horizontale et verticale. L'identification récente d'une forme de tremblante atypique, qui ne répond pas aux mêmes caractéristiques, a modifié le paradigme de la maladie.

De la découverte à la définition de la tremblante atypique
Les premières observations de cas de tremblante atypique, au sens où on l'entend actuellement, ont été faites en Norvège en 1998 (3), sur des animaux cliniquement suspects de tremblante. Le phénotype observé, baptisé NOR98, se distinguait de la tremblante classique notamment par la répartition et l'intensité des lésions dans le système nerveux central et par les caractéristiques biochimiques de la PrP^{res}.

Depuis, les programmes de surveillance active menés à grande échelle à l'abattoir et à l'équarrissage ont conduit à mettre en évidence dans plusieurs pays d'Europe des cas de tremblante qualifiés de « discordants » (4). Cette dénomination découle des résultats contradictoires obtenus à partir de ces isolats en fonction des tests diagnostics utilisés.

En 2005, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA) a publié une classification phénotypique des EST des petits ruminants (6). Cette classification regroupe les cas discordants et les cas NOR98, sous la dénomination « tremblante atypique ».

D'après la classification de l'AESA, la tremblante atypique se définit avant tout par les résultats aux tests diagnostiques (tableau 1).

Tableau 1: Critères retenus pour la classification de la tremblante atypique et comparaison avec la tremblante classique (PK : protéinase K, WB : Western Blot, OIE : Organisation Mondiale de la Santé Animale, kDa : kiloDalton (unité de poids moléculaire))

Test diagnostique	Tremblante atypique	Tremblante classique
Tests rapides validés par la Commission européenne	Positif, en pratique sur les prélèvements d'obex seuls les tests Biorad et Idexx	Positif

Western Blot avec traitement PK fort	Négatif, en particulier pour le WB de référence de l'OIE et les WB de Prionics	Positif
Western Blot avec un traitement PK modéré	Positif avec présence d'une bande surnuméraire caractéristique aux alentours de 12kDa	Positif, profil à trois bandes toutes supérieures à 15kDa
Immunohistochimie et histopathologie	Vacuolisation et marquage immunologique inconstants, lésions corticales et cérébelleuses, présence de lésions dans l'obex inconstante, jamais de lésions dans le noyau moteur du nerf vague mais parfois présente dans le tractus spinal des nerfs trijumeaux	Vacuolisation et marquage immunologique souvent localisés dans l'obex, notamment au niveau des noyaux moteurs du nerf vague.

Les caractéristiques biochimiques conditionnant le diagnostic

La PrP^{Sc} impliquée dans la tremblante atypique présente une résistance à la protéinase K (PK), utilisée pour purifier les échantillons, inférieure à celle de la tremblante classique et de l'ESB. En conséquence, les tests diagnostiques mettant en oeuvre des traitements importants à la PK ne sont pas capables de détecter la tremblante atypique et conduisent à un résultat négatif (4). Cela explique la nature discordante d'un certain nombre de résultats et implique également une sous estimation du nombre de cas de tremblante atypique en fonction du test utilisé pour le dépistage.

En France, les cas de tremblante atypique ont été détectés uniquement par les tests commercialisés par Biorad ou Idexx, qui représentent 47% des tests effectués dans les laboratoires départementaux. En pratique, les résultats fournis par les laboratoires départementaux indiquent que la détection d'une EST dans l'échantillon n'est pas négative. La confirmation du diagnostic a lieu au laboratoire national de référence, à l'AFSSA Lyon. C'est à ce stade que la caractérisation du caractère atypique de la tremblante a lieu.

Par ailleurs, l'étude fine des isolats de tremblante atypique, notamment dans des conditions de protéolyse adaptées, a permis de mieux caractériser leur signature biochimique. Les isolats de tremblante atypique identifiés en France sont similaires et ne présentent pas de différences avec les NOR98 (2).

Une infectiosité limitée au système nerveux central

Le caractère transmissible de la tremblante atypique a été mis en évidence de façon expérimentale chez des souris transgéniques (10). De façon surprenante, les expériences de transmission intracérébrale à ces souris ont mis en évidence une infectiosité importante pour de très faibles niveaux de PrP^{res}. Par ailleurs, les recherches de PrP^{res} en dehors du système nerveux central d'animaux infectés naturellement (3; 15) ou expérimentalement (10) ont été jusque là infructueuses ; de plus, chez les animaux atteints, la PrR^{res} n'est pas non plus toujours détectable dans l'obex.

Cela a plusieurs conséquences. Tout d'abord en terme de dépistage, alors que pour la tremblante classique et l'ESB, l'obex constitue le site de prélèvement de choix en raison de sa positivité précoce et systématique (7), ce n'est pas le cas en tremblante atypique. De plus, le diagnostic ante-mortem par biopsie de formations lymphoïdes n'est pas envisageable à ce jour.

L'autre conséquence porte sur la physiopathologie de la maladie. En considérant que la présence de la PrP^{res} est le marqueur du caractère infectieux de la maladie, aucun tissu ayant le rôle potentiel de porte d'entrée ou de sortie de l'agent infectieux dans l'organisme n'a été identifié à ce jour. Cela, mis avec la rareté des cas secondaires dans les troupeaux où un cas index est détecté, invite à considérer qu'il pourrait s'agir de formes d'origine spontanée (processus dégénératif sans origine extérieure apparente).

Un déterminisme génétique singulier

Chez les ovins, le déterminisme génétique de la tremblante atypique est différent de celui de la tremblante classique. Pour les deux tremblantes, le polymorphisme du gène *prnp*, codant pour la protéine prion, définit des niveaux de susceptibilité. Pour la tremblante classique, les mutations d'intérêt portent sur les codons 136, 154 et 171 (8), pour la tremblante atypique, une mutation du codon 141 (allèle sauvage = L : leucine, allèle muté = F : phénylalanine) intervient également (14). Par rapport à ces 4 sites de mutations, les allèles ALRR, ALRQ, AFRQ, ALRH, ALHQ, VLRQ et les génotypes correspondant à leurs combinaisons sont observés.

Les allèles AFRQ et AHQ présentent un risque relatif significativement supérieur aux autres allèles en prenant comme référence l'allèle ALRQ (12). Cependant des cas sont observés parmi tous les génotypes connus (5), y compris les homozygotes ARR/ARR qui présentent une résistance très importante à la tremblante classique. Les connaissances actuelles sur la distribution et l'influence de ces allèles doivent être développées avant d'engager d'éventuels programmes de sélection génétique.

Des symptômes cliniques discrets

Les signes cliniques de tremblante atypique ont principalement été décrits à l'étranger (3; 9; 14). Les principaux symptômes sont l'ataxie et les troubles du comportement. Contrairement à la tremblante classique, le prurit et les myoclonies sont rarement observés.

Il semble que les formes cliniques soient moins souvent décrites que pour la tremblante classique. Cela pourrait s'expliquer par une apparition plus tardive des symptômes, à un âge dépassant la vie économique de la plupart des animaux. Il semble en effet que les cas de tremblante atypique soient en moyenne plus âgés que les cas de tremblante classique (11). Par ailleurs, il faut considérer qu'en France la détection des EST se fait essentiellement par la surveillance active, et que par définition on n'a pas d'information sur d'éventuels signes cliniques chez les animaux atteints. Des données plus précises permettraient d'avoir une meilleure appréhension de la durée d'incubation et de réceptivité en fonction de l'âge.

Une maladie rare d'étiologie inconnue

L'estimation de la prévalence est fournie par les résultats des plans de surveillance active à l'abattoir et à l'équarrissage. Entre 2002 et 2006, environ 386 000 et 105 000 tests rapides capables de détecter la tremblante atypique ont été réalisés, respectivement sur des ovins et des caprins (tableau 2).

Tableau 2 : Nombre de tests susceptibles de détecter la tremblante atypique réalisés en France entre 2002 et 2006 dans le cadre de la surveillance active à l'abattoir et à l'équarrissage et nombre de cas.

Espèce	Plan		2002	2003	2004	2005	2006	Total
Ovins	Abattoir	Tests	14 652	25 511	8 373	7 554	196 060	252 150
		Cas	11	22	4	8	107	152
	Equarrissage	Tests	3 873	5 627	5 193	7 999	111 037	133 729
		Cas	4	0	2	5	82	93
Caprins	Abattoir	Tests	1 646	2 200	59	16 401	18 399	38 705
		Cas	0	0	0	2	0	2
	Equarrissage	Tests	1 568	3 495	3 382	26 846	30 612	65 903
		Cas	1	2	0	4	1	8

La prévalence apparente de la tremblante atypique est comparable à l'abattoir et à l'équarrissage, aux alentours de 0,5 pour mille, ce qui est également comparable à la

prévalence apparente de la tremblante classique à l'abattoir (1). La proportion de cas parmi les animaux testés semble stable au cours du temps (figure 1 et 2).

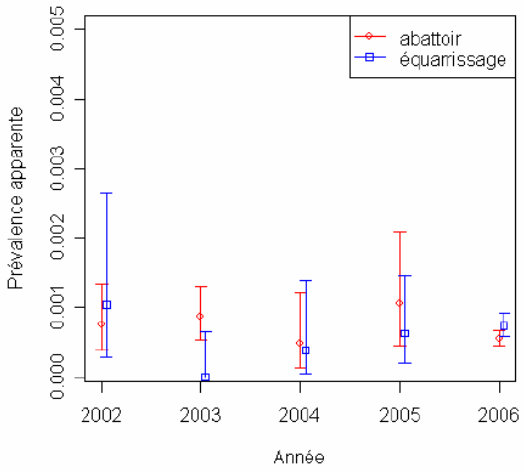


Figure 1 : Prévalence apparente de la tremblante atypique en France chez les ovins et intervalle de confiance à 95%

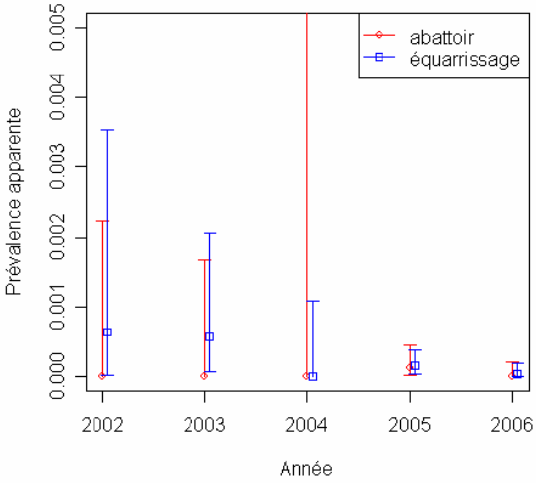


Figure 2 : Prévalence apparente de la tremblante atypique en France chez les caprins et intervalle de confiance à 95%

L'interprétation de ces données doit être faite avec précaution en raison de l'évolution des programmes de surveillance et des biais possibles (différents tests utilisés, recrutement géographique hétérogène, âge des animaux testés,…). A ce stade, rien n'invite à penser qu'il s'agit d'une maladie émergente mais l'observation critique de l'enzootie nécessite d'avantage de recul dans le temps et des données démographiques plus précises.

Les mesures de police sanitaire appliquées en France étaient jusque là orientées sur la gestion du risque de tremblante classique et d'ESB ; elles n'ont donc pas permis d'estimer correctement la prévalence de tremblante atypique dans les élevages où des cas ont été détectés. Dans d'autres pays européens, il semble qu'il y ait peu de cas secondaires (11; 13). Il est admis que si la maladie se transmet dans les conditions naturelles, la contagiosité doit être faible.

Concernant les facteurs de risque, hormis la susceptibilité génétique, peu de choses sont connues. Une enquête norvégienne a récemment mis en évidence une association avec la consommation de compléments minéraux et vitaminiques ; cette enquête montre également un rôle protecteur du retrait des placentas (8). Ces premiers résultats obtenus à partir d'un faible nombre de cas doivent être confortés par d'autres études.

Conclusion

Les connaissances acquises sur les aspects biochimiques de la tremblante atypique permettent d'établir clairement la distinction avec la tremblante classique. Cependant les données sur la pathogénie et l'épidémiologie de la maladie s'acquièrent plus progressivement, et enfin rien n'est encore acquis sur le risque posé par cette maladie en terme de santé publique.

Bibliographie

1 - AFSSA ("Avis de l'AFSSA sur l'évolution des mesures de police sanitaire dans les cheptels ovins et caprins où un cas de tremblante classique ou atypique a été détecté."2007: 1-9.

2 - ARSAC, J. N., O. ANDREOLETTI, et al. ("Similar Biochemical Signatures and Prion Protein Genotypes in Atypical Scrapie and Nor98 Cases, France and Norway." Emerg Infect Dis,2007,13(1): 58-65.
3 - BENESTAD, S. L., P. SARRADIN, et al. ("Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type Nor98." The Veterinary Record,2003,153: 202-208.
4 - BUSCHMANN, A., A.-G. BIACABE, et al. ("Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests." Journal of Virological Methods,2004,117(1): 27-36.
5 - EFSA ("Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards of the European Food Safety Authority on the Breeding programme for TSE resistance in sheep." The EFSA Journal,2006,382: 1-46.
6 - EFSA ("Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in Small Ruminants." The EFSA Journal,2005,276: 1-30.
7 - GAVIER-WIDEN, D., M.-J. STACK, et al. ("Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,2005,17: 509-527.
8 - HOPP, P., M. K. OMER, et al. ("A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks." J Gen Virol,2006,87(Pt 12): 3729-36.
9 - KONOLD, T., A. DAVIS, et al. ("Atypical scrapie cases in the UK." Vet Rec,2006,158(8): 280.
10 - LE DUR, A., V. BERINGUE, et al. ("A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes." PNAS,2005,102(44): 16031-16036.
11 - LUHKEN, G., A. BUSCHMANN, et al. ("Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases." Vet Res,2007,38(1): 65-80.
12 - MORENO, C. R., K. MOAZAMI-GOUDARZI, et al. ("Which are the most PrP susceptible haplotypes in atypical scrapie French sheep population?" Archives of Virology,In press.
13 - NOREMARK, M. and P. HOPP. Reported occurence of Atypical Scrapie in Europe. 11th Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Cairns2006.
14 - ONNASCH, H., H. M. GUNN, et al. ("Two Irish cases of scrapie resembling Nor98." The Veterinary Record,2004,155: 636-637.
15 - ORGE, L., A. GALO, et al. ("Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal." The Journal of General Virology,2004,85(Pt 11): 3487-91.

Chemin vers une caractérisation, tableau épidémiologique et contrôle

Tremblante atypique : chemin vers une caractérisation

La tremblante atypique regroupe les cas historiques et d'autres cas européens discordants de points de vue biochimique, mais aussi lésionnel et génétique.

Neurologie des petits ruminants

par Alexandre Fediaevsky*, **
Jean-Noël Arsac*
Géraldine Cazeau*
Christian Ducrot**
Didier Calavas*

a.fediaevsky@afssa.lyon.fr
* Afssa Lyon
31, av. T.-Garnier
69364 Lyon Cedex
** Inra Theix, UR346 EA
63122 Saint-Genès-Champanelle

RÉSUMÉ

En 1998, une forme particulière de tremblante ovine a été isolée dans un contexte de réévaluation du risque associé à l'encéphalopathie spongiforme bovine chez les petits ruminants. D'autres cas ont été mis en évidence en Europe à partir de 2004, discordants notamment par les résultats hétérogènes obtenus aux tests rapides de dépistage. Dans la catégorie de tremblante baptisée "atypique" par l'Autorité européenne de sécurité des aliments, les lésions du système nerveux central sont diverses dans leur nature et leur localisation. Le séquençage génétique et des études épidémiologiques ont permis de préciser les risques relatifs associés à différents allèles, nettement différents de ceux décrits pour la tremblante classique.

Alors que les sciences expérimentales et l'épidémiologie ont contribué depuis une vingtaine d'années à caractériser la tremblante de plus en plus finement, parfois sous le feu de crises sanitaires, la découverte d'un variant atypique ouvre un nouveau volet d'interrogations. Cet article retrace les principales étapes de sa caractérisation phénotypique.

Contexte historique

1. Premier pas : la souche "Nor98"

- La surveillance des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) chez les petits ruminants s'inscrit essentiellement dans le contexte du risque que représente l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) pour l'homme. En effet, dès 1993, la transmission expérimentale de l'ESB à des petits ruminants a confirmé la possibilité biologique que ces espèces auraient pu être contaminées en élevage [8].

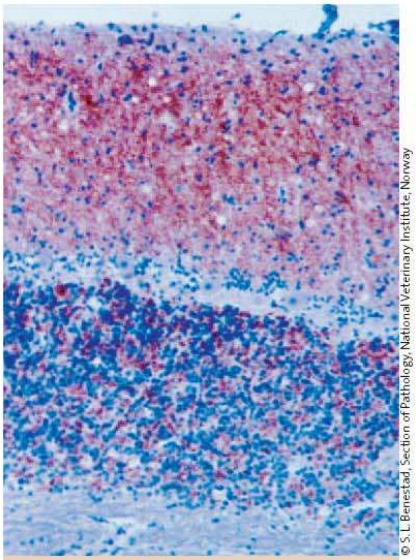
À partir de 1996 en France, une surveillance des EST chez les petits ruminants a ainsi été mise en place. Un réseau fondé sur les symptômes cliniques a été instauré, en l'absence d'un test de dépistage des EST utilisable à large échelle et d'une méthode facile à mettre en œuvre pour distinguer l'ESB de la tremblante chez un animal infecté (seul le bio-essai sur des souris permettait une telle discrimination).

- Avec la mise au point de tests rapides de dépistage, et la réévaluation du risque représenté par l'ESB chez les petits ruminants, la surveillance et la lutte contre les EST (tremblante et ESB) se sont généralisées en Europe.
- C'est dans ce cadre qu'en 1998, en Norvège, une souche particulière de tremblante ovine, baptisée "Nor98", a été identifiée pour la première fois (encadré 1, photo) [3].

2. Vers une classification phénotypique des EST des petits ruminants

À partir de 2004, à la suite de la première publication sur "Nor98", l'Allemagne, la Belgique, la France, la Grande-Bretagne, l'Irlande, le Portugal et la Suède ont aussi rapporté des cas de tremblante "discordants" :

- des résultats hétérogènes ont été obtenus par les différentes méthodes diagnostiques utilisées [4, 9, 10, 15, 16]. Ce phénomène a été relié à une sensibilité plus importante à la digestion par les protéases du marqueur de la maladie et à un faible niveau d'accumulation de ce marqueur dans la



© S. L. Benestad, Section of Pathology, National Veterinary Institute, Norway

Coupe de cervelet issue du premier cas "Nor98" mis en évidence par Sylvie Benestad et montrant l'immunomarquage de la PrPp par un anticorps F89/160.1.5. Des lésions de vacuolisation sont également visibles.

région du tronc cérébral, qui est prélevée pour le diagnostic des EST chez les ruminants [4, 5, 14] ;
- ces cas ne suivent pas le déterminisme génétique jusqu'alors décrit chez les ovins [2].

Encadré 1 : Éléments discordants pour les cas historiques

- Les résultats des analyses d'obex par technique Elisa et par immunohistochimie étaient discordants (respectivement positifs et négatifs).
- Les lésions de vacuolisation du neutropile (plages de substance grise situées entre les corps cellulaires neuronaux, les corps cellulaires gliaux et les capillaires sanguins) et les signes d'accumulation de la PrPp étaient prépondérantes dans le cervelet et le cortex cérébral. Elles concernaient peu le tronc cérébral. Aucune lésion ou accumulation de PrPp n'était notamment détectable au niveau de l'obex. Les cas étaient de génotypes classiquement associés à une résistance à la tremblante (AHQ/AHQ et AHQ/ARQ).

D'après [3].

En 2005, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA) a publié une classification des EST des petits ruminants qui distingue la tremblante classique, la tremblante atypique (regroupant "Nor98" et cas discordants) et l'ESB (tableau) [7].

Caractérisation au laboratoire

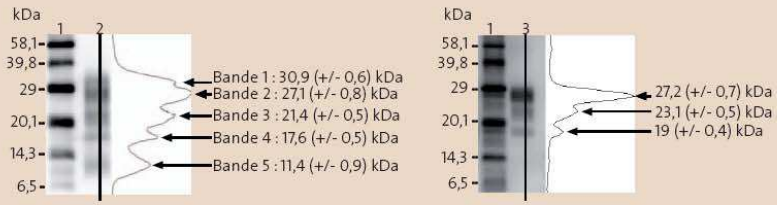
Seulement 60 % environ des tests rapides mis en œuvre par les laboratoires départementaux sont compatibles avec de bonnes conditions de détection des cas atypiques à partir des échantillons prélevés.
Cela est notamment lié à la sensibilité accrue de la protéine prion pathologique (PrPp) à la protéinase K. Les résultats non négatifs des tests de dépistage sont systématiquement confirmés par le laboratoire national de référence de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa Lyon) où a lieu la classification diagnostique des EST.

Tableau : Classification diagnostique des EST des petits ruminants

EST	Tests rapides de dépistage approuvés (UE/AESA)	*Western-blot* avec traitement PK sévère	*Western-blot* avec traitement PK modéré	Immunohistochimie et histopathologie	Commentaires
Tremblante classique (TC)	Positifs	• Profil à trois bandes comprises entre 15 et 30 kiloDaltons (kDa) (forme diglycosylée prédominante et forme non glycosylée minoritaire) • Trois bandes immunoréactives aux anticorps monoclonaux spécifiques en partie N terminale et en région centrale • Occasionnellement : négativité ou moins de trois bandes selon la concentration en PrP^{Res} • Avec un traitement à la PK modéré : cas négatifs plus rares et trois bandes toujours visibles		• Vacuolisation de la matière grise habituellement présente • Immunomarquage dans la *medulla oblongata* impliquant le noyau moteur dorsal du nerf vague (NMDNV)	Pas de typologie pour les différentes souches de tremblante classique fondée sur ces critères
Tremblante atypique (TA)	• Tests Biorad[1] et Idexx[2] positifs • Prionics Check LIA Small Ruminant négatif • Autres tests[3] positifs sur échantillons de cervelet	• Négatif ou bandes incompatibles avec la TC et l'ESB (dépendent des anticorps utilisés) • Masse moléculaire comprise entre (10 kDa et 35 kDa).	• Positif en partie N terminale ou centrale • Avec des profils différents de l'ESB et de la TC avec une bande reconnaissable d'un poids inférieur à 15 kDa • Signal plus fort sur des prélèvements de cervelet, mais concordant avec les observations faites sur le tronc cérébral	• Vacuolisation de la matière grise inconstante • Immunomarquage et lésions plus marqués et plus fréquents dans le cervelet que dans le tronc cérébral (surtout obex) • Dans la *medulla oblongata*, immunomarquage absent du NMDNV mais présent dans le noyau du tractus spinal du nerf trigéminé • Structures lymphoïdes négatives	Les souches "Nor98" et les isolats de tremblante atypiques français ne diffèrent pas sur la base de ces critères
ESB	Positifs	• Profil à trois bandes comprises où la forme diglycosylée prédomine avec des anticorps dirigés sur la partie centrale et est absente ou moins intense avec des anticorps dirigés sur la partie N terminale • Bande non glycosylée de poids moléculaire inférieur à celui obervé en TC		• Vacuolisation de la matière grise habituellement présente • Immunomarquage dans la *medulla oblongata* impliquant le NMDNV	La confirmation définitive de l'ESB chez les petits ruminants se fait par inoculation à des souris

Cette classification des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) des petits ruminants, fondée sur des caractères phénotypiques, a été proposée en 2005 par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA) [7].
ESB : encéphalopathie spongiforme bovine. PK : protéinase K. NMDNV : noyau moteur dorsal du nerf vague.
(1) Biorad TeSeE/Platelia et Biorad TeSeE Sheep and Goats.
(2) Idexx HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit, EIA.
(3) Prionics Western Blot Small Ruminants, Institut Pourquier Scrapie Test, Enfer TSE Test v 2.0, InPro CDI-5.

Figure 1 : Particularité du profil électrophorétique de la PrPp



Pour la tremblante atypique (à gauche, bande 2), la signature électrophorétique de la PrPp après traitement aux protéases présente cinq bandes (dont une de faible poids moléculaire : 11 à 12 kDa). Lors de tremblante classique (à droite, bande 3), le profil habituel est à trois bandes (27 kDa, 24 kDa, 20 kDa). Chaque profil est comparé avec une gamme de poids moléculaire (bandes 1).
Source : Laboratoire national de référence de l'Afssa Lyon.

1. Particularités biochimiques et électrophorétiques

La PrPp accumulée dans le système nerveux central des petits ruminants affectés de tremblante atypique présente, par *Western blot*, une signature électrophorétique distincte (figure 1) [1].
Cette PrPp reste à ce jour, y compris pour les cas de tremblante atypique, l'unique marqueur moléculaire spécifique des EST. Chez tout individu infecté, elle peut être identifiée par ses propriétés biochimiques particulières d'insolubilité en présence de détergents et de résistance partielle à la digestion par les protéases.

2. Siège des lésions

Une analyse comparative du cervelet et de l'obex a pu être menée par certains voisins européens [3, 6, 9, 11, 14, 15, 17]. En France, elle n'a pas été réalisée car seul le tronc cérébral est prélevé et conservé congelé, ce qui rend impossible l'examen histopathologique et limite la portée de l'examen immunohistochimique.
Il ressort des comparaisons effectuées une diversité dans la localisation et la nature des lésions observées lors de tremblante atypique [14]. Dans presque tous les cas, le cervelet est le siège de lésions et la PrPp y est détectée (figure 2). La positivité du tronc cérébral est inconstante. Dans certains cas, les lésions sont plus nombreuses dans le cortex cérébral.
Dans le tronc cérébral, la PrPp n'a jamais été détectée dans le noyau moteur dorsal du nerf vague (NMDNV), mais elle l'a été dans le tractus spinal du nerf trigéminé, du noyau du nerf hypoglosse et du noyau du tractus solitaire. Dans tous les cas où des analyses ont été effectuées, la PrP^{Sc} n'a pas été retrouvée en dehors du système nerveux central (SNC) [3, 15, 18].

3. Analyses génétiques

Les prélèvements de tissu nerveux ou d'oreilles, recueillis dans le cadre des plans de surveillance, ont servi de support aux analyses génétiques. Le gène prion (PRNP) d'ovins atteints de tremblante atypique a été séquencé. Cela a permis de mettre en évidence l'importance d'une mutation L → F sur le codon 141 chez les animaux porteurs de l'allèle $A_{136}R_{154}Q_{171}$, jugé sans importance pour la tremblante classique (encadré 2) [13].
Par la suite, des études épidémiologiques ont permis de préciser les risques relatifs associés aux différents allèles, qui sont apparus nettement différents de ceux décrits lors de tremblante classique. La question de la pertinence des programmes de sélection génétique actuels se pose. Cette analyse doit tenir compte, entre autre chose, de la faible prévalence de la tremblante atypique.
Chez les caprins, aucun allèle particulier n'a été décrit comme ayant un effet sur la susceptibilité à la tremblante atypique. Les isolats étudiés étaient toutefois tous homozygotes AHQ/AHQ [9, 13].

Encadré 2 : Caractérisation génétique de la tremblante atypique chez les ovins

- Une mutation L → F au codon 141 chez les animaux porteurs de l'allèle $A_{136}R_{154}Q_{171}$ occupe une place capitale, d'après le séquençage du gène prion d'ovins atteints de tremblante atypique.
- Les allèles les plus à risque, d'après les études épidémiologiques, sont $A_{136}F_{141}R_{154}Q_{171}$ et $A_{136}H_{154}Q_{171}$, en référence à un allèle qualifié "d'ancestral" : $A_{136}L_{141}R_{154}Q_{171}$ [12].
- Des cas sont également associés à d'autres allèles ($A_{136}R_{154}H_{171}$, $V_{136}R_{154}Q_{171}$, $A_{136}R_{154}R_{171}$, $A_{136}L_{141}R_{154}Q_{171}$).
- Aucun allèle n'est totalement résistant.
- Par rapport à l'allèle $A_{136}L_{141}R_{154}Q_{171}$, l'allèle $A_{136}R_{154}R_{171}$ semble à risque et l'allèle $V_{136}R_{154}Q_{171}$ aurait un effet protecteur.

Ces tendances doivent être confirmées par l'étude d'autres échantillons.

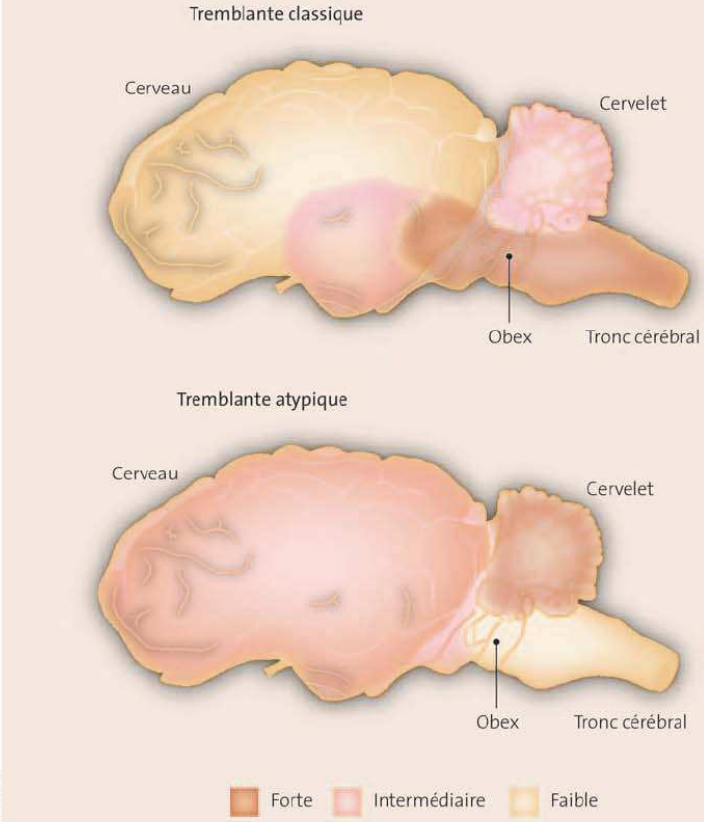
POINTS FORTS

- Lors de tremblante atypique, la protéine prion pathologique marqueur de la maladie est plus sensible à la digestion par les protéases. Cela explique en partie les résultats hétérogènes obtenus par les différentes méthodes diagnostiques.
- Le cervelet est presque toujours le siège de lésions. La positivité du tronc cérébral est inconstante. Les lésions sont parfois plus nombreuses dans le cortex cérébral.
- Chez les ovins, les allèles les plus à risque ne sont pas les mêmes que pour la tremblante classique. Les programmes de sélection génétique actuels ne sont pas nécessairement à réviser car la prévalence de la tremblante atypique est faible.

Mise à jour Le point sur...

(1) Ces aspects feront l'objet d'un autre article, qui proposera une réflexion autour de la politique de contrôle de la maladie.

Figure 2 : Distribution des lésions de vacuolisation et de la $PrPS^C$



Source : S. Benestad, Section of Pathology, National Veterinary Institute, Norway.

Remerciements
à Sylvie Benestad et à Petter Hopp (National Veterinary Institute, Norway).

La tremblante atypique a été découverte grâce à la généralisation des programmes de surveillance des EST chez les petits ruminants et à l'amélioration de la sensibilité des techniques de diagnostic des EST animales. Il n'est donc pas surprenant que les connaissances au sujet de cette maladie se soient d'abord constituées au laboratoire. Progressivement, des données sur les manifestations cliniques de la tremblante atypique et sur son épidémiologie ont complété la vision diagnostique[1]. ■

Références

1 - Arsac JN et coll. Similar Biochemical Signatures and Prion Protein Genotypes in Atypical Scrapie and Nor98 Cases, France and Norway. Emerg. Infect. Dis. 2007;13(1):58-65.

2 - Baylis M. The Kafkaesque approach to scrapie control-a sense of impending danger. Vet. J. 2007.173(2):235-236.

3 - Benestad SL et coll. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type Nor98. Vet. Rec. 2003.153:202-208.

4 - Buschmann A et coll. Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. J. Virol. Met. 2004;117(1):27-36.

5 - Buschmann A et coll. Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). J. Gen. Virol. 2004;85(9):2727-2733.

6 - Everest SJ et coll. Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie-surveillance programme. J. Gen. Virol. 2006;87(2):471-477.

7 - EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in Small Ruminants. The EFSA Journal. 2005;276:1-30.

8 - Foster JD, Hope J, Fraser H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. Vet. Rec. 1993;133:339-341.

9 - Gavier-Widen D et coll. Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population. J. Vet. Diagn. Invest. 2004;16(6):562-567.

10 - Konold T et coll. Atypical scrapie cases in the UK. Vet. Rec. 2006;158(8):280.

11 - Konold T et coll. Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report. BMC Vet. Res. 2007;3(1):2.

12 - Moreno CR et coll. Which PrP haplotypes in a French sheep population are the most susceptible to atypical scrapie? Arch. Virol. 2007;152(6):1229-1232.

13 - Moum T et coll. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. J. Gen. Virol. 2005;86(1):231-235.

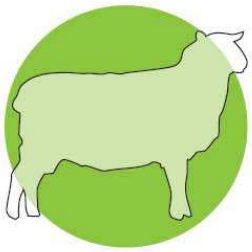
14 - Nentwig A et coll. Diversity in Neuroanatomical Distribution of Abnormal Prion Protein in Atypical Scrapie. PLoS Pathog. 2007;3(6):82.

15 - Onnasch H et coll. Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. Vet. Rec. 2004;155:636-637.

16 - Orge L et coll. Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. J. Gen. Virol. 2004;85(11): 3487-3491.

17 - Roels S et coll. Immuno-histochemical evaluation of tonsillar tissue for preclinical screening of scrapie based on surveillance in Belgium. Vet. Rec. 1999;145(18):524-525.

18 - Vidal E. et coll. Lack of PrP(sc) immunostaining in intracranial ectopic lymphoid follicles in a sheep with concomitant non-suppurative encephalitis and Nor98-like atypical scrapie: A case report. Vet. J. 2007.



Tremblante atypique : tableau épidémioclinique et contrôle

Discrète, la tremblante atypique semble avoir une prévalence comparable à celle de la tremblante classique. Le principe de précaution reste de mise face aux incertitudes.

Neurologie des ovins

par **Alexandre Fediaevsky**[*,**] **Jean-Noël Arsac**[*] **Géraldine Cazeau**[*] **Christian Ducrot**[**] **Didier Calavas**[*]

[*] Afssa Lyon
31, av. T.-Garnier
69364 Lyon Cedex
[**] Inra Theix, UR346 EA
63122 Saint-Genès-Champanelle
a.fediaevsky@afssa.lyon.fr

(1) Voir l'article "Tremblante atypique : chemin vers une caractérisation", des mêmes auteurs, dans le Point Vét. 2007;280:23-26.

RÉSUMÉ

La tremblante atypique atteint en moyenne des animaux assez âgés. Les troubles locomoteurs évocateurs d'une atteinte cérébelleuse dominent, alors que le prurit et les tremblements sont absents ou discrets. L'infectiosité de cette maladie reste énigmatique et sa transmissibilité en élevage est présumée faible. Des similarités existent avec une forme d'encéphalopathie spongiforme transmissible humaine à forte composante génétique. La capacité de la tremblante atypique à franchir la barrière d'espèce reste à préciser (souris transgéniques). Comprendre le mode d'apparition de cette affection représente un enjeu majeur pour parvenir à la contrôler.

Depuis 2005, l'Autorité européenne de sécurité des aliments réserve une place à part à la tremblante atypique (incluant la souche historique Nor98), à côté de la tremblante classique et de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) chez les petits ruminants.
La tremblante atypique a d'abord été définie en laboratoire (biochimie, histopathologie, séquençage génétique), alors que les observations cliniques et épidémiologiques se sont accumulées progressivement[1].
Après un bilan de ces données, diverses questions seront abordées.

Caractérisation clinique et épidémiologique

1. Des symptômes présents mais discrets

Des manifestations cliniques de tremblante atypique ont été observées ou filmées [4, 7, 12, 17].

- Le prurit et les tremblements ne sont généralement pas notés, ou de façon discrète. Les symptômes les plus fréquemment rapportés sont les troubles locomoteurs (ataxie, hypermétrie, augmentation du polygone de sustentation), les changements de comportement et l'amaigrissement (photos 1 à 4).
- L'examen approfondi de deux cas a permis de mettre en évidence un déficit proprioceptif et une perte du réflexe à la menace.

La tremblante atypique semble détectée chez des animaux en moyenne plus âgés que lors de tremblante classique : de cinq à sept ans, contre deux à quatre ans dans la forme classique [8, 20]. Des cas atypiques ont néanmoins été décrits à partir de l'âge de deux ans.

- Si le tableau clinique est globalement évocateur d'une atteinte cérébelleuse (hypermétrie, modification du polygone de sustentation), il n'est pas possible, comme pour les autres encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST), d'établir une correspondance précise entre l'histopathologie et la sémiologie. Par exemple, l'atteinte des noyaux du nerf trigéminé n'est pas associée aux manifestations cliniques habituelles (douleurs de la face, grincement des dents, hypersensibilité au réflexe palpébral) [12]. L'influence du génotype sur les manifestations cliniques ou la période d'incubation n'est, pour l'instant, pas documentée.

2. Une prévalence faible

De 2002 à 2006, les prévalences brutes annuelles des tremblantes atypique et classique ont été estimées (tableau et figures 1 et 2).
Les biais de sélection associés au programme de surveillance ont fait l'objet d'une analyse détaillée [1, 6, 15]. L'hétérogénéité spatio-temporelle de l'utilisation des tests de dépistage recommandés pour la détection de la tremblante atypique (conçus par Bio-rad et Idexx) est susceptible d'engendrer un biais supplémentaire, et de rendre délicate la comparaison entre tremblante atypique et tremblante classique. À cela s'ajoute la probable sous-estimation des cas de tremblante atypique due au fait que l'analyse porte préférentiellement sur l'obex (qui n'est pas le siège principal d'accumulation du marqueur de la maladie[1]). En admettant que les biais potentiels n'influencent pas significativement les résultats, l'absence de différence de prévalence brute de la tremblante atypique entre l'abattoir et l'équarrissage pourrait s'expliquer par l'âge élevé des individus atteints, qui tend à converger vers la durée de vie commerciale des animaux.

3. Des cas secondaires rares

Jusqu'à ce jour, en raison d'une police sanitaire adaptée à l'épidémiologie de la tremblante classique, la recherche de cas secondaires dans les élevages où

Mise à jour Le point sur...

Tableau : Prévalence brute des tremblantes atypique et classique en France chez les ovins

Type de tremblante	Canal de surveillance	Prévalence brute en 2006 (%)	Tendance 2002-2006
Atypique	Abattoir	0,055 (0,045 à 0,066)	Faible décroissance en 2006, à confirmer en 2007
	Équarrissage	0,074 (0,058 à 0,092)	Stable
Classique	Abattoir	0,008 (0 à 0,020)	Décroissance
	Équarrissage	0,07 (0,054 à 0,082)	Décroissance

En France, la caractérisation systématique des cas de tremblante diagnostiqués depuis 2004 et l'analyse des cas historiques issus de la surveillance active (depuis 2002) ont permis des estimations de prévalence entre 2002 et 2006. Pour la tremblante atypique, le calcul est uniquement fondé sur le nombre de tests de dépistage recommandés pour la détection des cas (voir aussi le tableau 1 dans le premier volet de cet article, déjà publié[10]). Des biais sont possibles. Le chiffres entre parenthèses correspondent à l'intervalle de confiance à 95 % de la prévalence.

1a **1b** **Ataxie lors de tremblante atypique** (d'origine naturelle).
1a Perte d'équilibre (à gauche : juste avant de chuter) et **1b** faiblesse des postérieurs (à droite : la brebis tend à s'affaisser lorsqu'elle avance en ligne droite). Cette brebis cheviot âgée de six ans est de génotype AF141RQ/AF141RQ. Ses agneaux sont sains. La phase clinique a duré trois mois (source : T. Konold, communication personnelle).

2 **Hypermétrie importante des postérieurs** lors de tremblante atypique. La brebis, âgée de cinq ans et de race welsh mountain, est de génotype AHQ/AFRQ (emprunté de [18]).

3 **Réflexe à la menace.** La brebis ne cligne pas des paupières. Également de race welsh mountain, elle a le même âge et le même génotype que celle présentée à la photo 2 [18].

4 **Ovin atteint de tremblante atypique, sans perte de laine.** Ce symptôme est fréquent (mais pas systématique) lors de tremblante classique. Cet animal accroît aussi son polygone de sustentation, ce qui, associé à l'hypermétrie, évoque une atteinte cérébelleuse.

un premier cas de tremblante atypique a été détecté n'a pas pu être menée de façon satisfaisante [1]. Il semble cependant que ces cas soient rares, et qu'il n'y ait pas de liens épidémiologiques évidents entre les élevages atteints [14].

Questions ouvertes

L'ensemble des observations collectées au laboratoire et par les programmes de surveillance amène à formuler quatre questions, auxquelles des éléments de réponse peuvent être apportés.

1. Quelle est l'origine de la maladie ?

Quatre pistes fournissent des éléments de réponse.

Une prévalence stable

L'apparente stabilité de la prévalence de la tremblante atypique donne à penser qu'il ne s'agit pas d'une maladie émergente. Des analyses complémentaires menées récemment ont permis de classer comme atypique un cas de tremblante détecté au Royaume-Uni en 1989 [5].

Maladie transmissible mais peu infectieuse

Lorsqu'une maladie transmissible est infectieuse, les matières virulentes et les voies de contamination peuvent être caractérisées (encadré 1).
Dans le cas de la tremblante atypique, l'apparente absence de portes d'entrée et de sortie de l'agent infectieux, conjointement aux premières observations épidémiologiques, soulève la question de la nature infectieuse ou non de la maladie.
Le caractère transmissible de la tremblante atypique a été démontré chez la souris transgénique et l'ovin dans des conditions expérimentales [13, 19].
À cette occasion, il a été observé que des prélèvements de système nerveux central (SNC) avec des titres de PrP^{Res} particulièrement bas étaient fortement infectieux.
Toutefois, l'infectiosité des tissus périphériques n'est pas démontrée.
Rien n'est connu sur l'éventuelle transmission de la maladie dans les conditions d'élevage, si ce n'est qu'elle est probablement faible (encadré 2) [1].

Facteurs de risque

À ce jour, la seule étude portant sur les facteurs de risque de la tremblante atypique, réalisée en Norvège, a montré :
- un rôle protecteur du retrait du placenta (comme pour la tremblante classique) ;
- un risque lié à la distribution de compléments minéraux et vitaminiques (CMV) [11].

Ce dernier facteur n'est pas aisé à interpréter et demande à être confirmé. La contamination des CMV par un agent infectieux semble peu probable. Les mécanismes biochimiques faisant intervenir certains ions métalliques (Cu^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}) sur la conformation de la PrP sont encore imprécis.

Aucun des facteurs de risque associés aux mouvements d'animaux n'a été mis en évidence, contrairement à la tremblante classique.

Similarités avec une EST humaine "génétique"

Il existe des similarités immunohistochimiques et biochimiques entre la tremblante atypique et le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), forme d'EST humaine à forte composante génétique [10, 16].

2. Comment interpréter la variabilité histopathologique observée ?

Trois pistes peuvent être proposées.

- Les prélèvements sont recueillis à différents stades de l'évolution de la tremblante atypique. Dans les quelques études où ce type de comparaison a pu être mené, aucune concordance entre l'âge des animaux atteints, ou la présence ou non de manifestations cliniques, et l'étendue des lésions n'a été observée. Cependant, le nombre des observations reste limité.
- Les souches de tremblante atypique pourraient être hétérogènes. Les techniques de caractérisation biochimiques et immunohistochimiques actuellement disponibles ne permettent pas de mettre en évidence de différence, par exemple, entre les isolats de tremblante atypique détectés en France et les isolats Nor98 trouvés en Norvège [3]. Cependant, pour la tremblante classique, ces mêmes méthodes n'ont pas permis de différencier des souches qui sont observés notamment lors d'expériences d'inoculation à des rongeurs.
- Le génotype du cas intervient. Les différences histopathologiques observées ne semblent pas associées à la variabilité du génotype des animaux atteints, mais les données sont, là encore, insuffisantes pour pouvoir conclure avec certitude.

À ce jour, il n'existe aucun résultat portant sur les différences de niveau d'expression du gène PRNP.

3. Quel est le prélèvement de choix pour la tremblante atypique ?

Le diagnostic de la tremblante atypique requiert l'analyse d'un prélèvement de SNC. La recherche à partir de l'obex ne permet de détecter qu'une partie des cas de tremblante atypique (ce qui est aussi vrai dans une moindre mesure pour la tremblante classique).

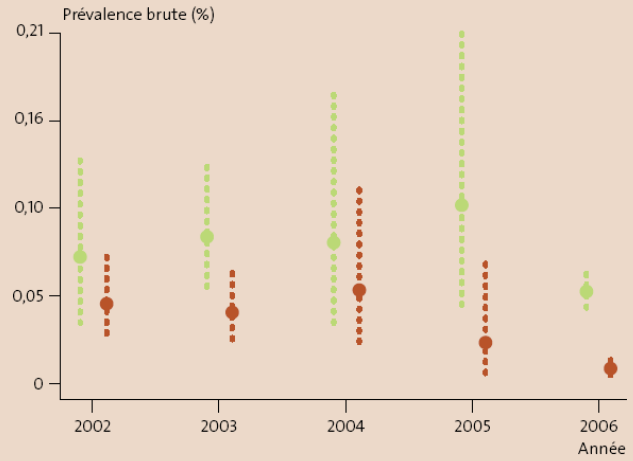
Il n'est pas actuellement possible d'estimer le nombre de cas qui seraient décelés en analysant également le cervelet. Si l'analyse du cervelet est plus sensible que celle du tronc cérébral, sa sensibilité n'est cependant pas de 100 %. Elle ne serait pas compatible avec l'objectif de détection de l'ESB (nécessairement sur l'obex). La double analyse des prélèvements augmenterait considérablement le coût des programmes.

La recherche sur un mélange de tissus d'obex et de cervelet n'a pas été évaluée, mais conduirait certainement à une diminution trop importante de la sensibilité globale.

4. Quel contrôle pour la tremblante atypique ?

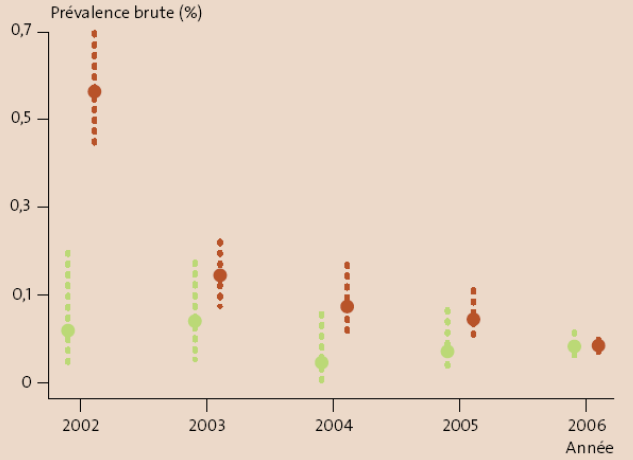
Les risques potentiels associés à la tremblante atypique concernent la santé publique et la santé animale.

Figure 1 : Prévalence des tremblantes atypique et classique chez les ovins à l'abattoir, en France, de 2002 à 2006 et intervalle de confiance à 95 %



En marron : tremblante atypique ; en vert : tremblante classique.

Figure 2 : Prévalence des tremblantes atypique et classique chez les ovins à l'équarrissage, en France, de 2002 à 2006 et intervalle de confiance à 95 %



La prévalence de la tremblante classique en 2002 est surestimée en raison de l'inclusion d'animaux issus de foyer de tremblante et abattus dans le cadre de la police sanitaire.
En marron : tremblante atypique ; en vert : tremblante classique.

Mise à jour Le point sur...

Remerciements à Timm Konold, Veterinary Laboratories Agency Weybridge, UK.

La reproduction des photographies cliniques a été aimablement autorisée par la Veterinary Laboratories Agency (VLA, UK).

Renseignements pour les droits de reproduction des photos : Heather Hulse, The Library, Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addlestone, Surrey, KT15 3NB, UK.

Encadré 1 : Matières virulentes et voies de contamination (cas de la tremblante classique)

• Dans le cas de la tremblante classique, différentes voies de contamination ont été décrites [8]. La principale, comme pour l'ESB, implique le passage de l'agent infectieux à travers les formations lymphoïdes secondaires de l'intestin. La progression de l'infection s'effectue entre autres le long du nerf vague, ce qui explique que le noyau moteur dorsal du nerf vague (NMDNV) est un siège de dépôt précoce de PrP^{sc}, au niveau du système nerveux central SNC (et l'obex est le prélèvement de choix pour la détection *post-mortem* de l'ESB) [2].

• Au cours de l'évolution de la tremblante classique, la diffusion de la PrP^{sc} en dehors du SNC est à l'origine de la virulence de certains tissus périphériques. Le placenta est sans doute le plus important de ces tissus périphériques en termes de transmission de la maladie [18].

Encadré 2 : Une tremblante peu transmissible

Différents éléments font penser que la transmission de la tremblante atypique en conditions d'élevage est probablement faible :
- porte d'entrée/de sortie de l'agent infectieux non identifiée ;
- rareté des cas secondaires (même si les conditions ne sont pas optimales pour les détecter) ;
- absence apparente de liens entre troupeaux (à l'inverse, la tremblante classique est souvent décrite comme une maladie introduite par l'achat d'animaux, même si d'autres voies de contamination d un cheptel existent) et de facteurs de risque liés aux mouvements.

POINTS FORTS

- Dans le tableau clinique, les signes cérébelleux prédominent.
- La tremblante atypique affecte en moyenne des animaux âgés de cinq à six ans.
- L'apparente stabilité de la prévalence de la tremblante atypique fait supposer qu'il ne s'agit pas d'une affection émergente.
- Les mécanismes d'apparition de la maladie sont encore incompris.

• Rien ne permet de documenter le risque en santé publique, si ce n'est les opinions des experts et l'absence de liens épidémiologiques statistiquement significatifs entre la consommation de petits ruminants et les diverses EST humaines connues, qu'ils soient absents ou n'aient pas pu être mis en évidence.

Des expériences de transmission à des modèles de souris transgéniques fourniront des éléments sur la capacité de la tremblante atypique à franchir la barrière d'espèce. S'agissant d'une maladie de découverte très récente (1998), qui atteint des animaux élevés pour la consommation humaine, le recours au principe de précaution se justifie. Le retrait des matériaux à risque spécifié, tel qu'il est actuellement mis en œuvre, constitue une mesure adaptée puisque la PrP^{sc} n'a jamais été détectée hors du SNC.

• Pour la santé animale, l'enjeu économique semble actuellement faible, étant donné l'apparente rareté des cas secondaires et l'âge élevé des animaux atteints.

Cependant, négliger la maladie en ignorant ses facteurs déterminants pourrait conduire à des modifications épidémiologiques ultérieures. Cela pourrait engendrer des crises aux conséquences économiques importantes pour une filière déjà en souffrance.

En raison des inconnues qui subsistent, il convient de poursuivre les études visant à mieux comprendre le schéma épidémiologique de la tremblante atypique et de maintenir des mesures de contrôle minimales. Celles-ci pourront être, le cas échéant, révisées à la lumière des connaissances acquises. ■

Références

1 - Afssa. Avis de l'Afssa sur l'évolution des mesures de police sanitaire dans les cheptels ovins et caprins où un cas de tremblante classique ou atypique a été détecté. 2007:1-9.

2 - Andreoletti O et coll. Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. J. Gen. Virol. 2000. 81(12):3115-3126.

3 - Arsac JN et coll. Similar Biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. Emerg. Infect. Dis. 2007;13(1):58-65.

4 - Benestad SL et coll. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type Nor98. Vet. Rec. 2003;153:202-208.

5 - Bruce ME et coll. Nor98-like sheep scrapie in the United Kingdom in 1989. Vet. Rec. 2007;160(19):665-666.

6 - Cazeau G, Fediaevsky A, Calavas D. Analyse statistique des données de surveillance active des EST chez les petits ruminants en France continentale. Complément aux rapports d'analyse annuels pour la période 2002-2006. Ed. Afssa, Lyon. 2007;1-43.

7 - Epstein V, Pointing S, Halfacre S. Atypical scrapie in the Falkland Islands. Vet. Rec. 2005;157(21):667-668.

8 - Corbiere F et coll. Advanced survival models for risk-factor analysis in scrapie. J. Gen. Virol. 2007;88(2):696-705.

9 - Detwiler LA et Baylis M. The epidemiology of scrapie. Rev. Sci. Tech. OIE. 2003;22(1):121-143.

10 - Gretzschel A et coll. Immunological characterization of abnormal prion protein from atypical scrapie cases in sheep using a panel of monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. 2006;87(12):3715-3722.

11 - Hopp P, Omer MK et Heier BT. A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. J. Gen. Virol. 2006;87(12):3729-3736.

12 - Konold T et coll. Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report. BMC Vet. Res. 2007;3(1):2.

13 - Le Dur A et coll. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. PNAS. 2005;102(44):16031-16036.

14 - Luhken G et coll. Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. Vet. Res. 2007;38(1):65-80.

15 - Morignat E et coll. Estimates of the prevalence of transmissible spongiform encephalopathies in sheep and goats in France in 2002. Vet. Rec. 2006;158(20):683-687.

16 - Nentwig A et coll. Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie. PLoS Pathog. 2007;3(6):e82.

17 - Onnasch H et coll. Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. Vet. Rec. 2004;155:636-637.

18 - Onodera T et coll. Isolation of scrapie agent from the placenta of sheep with natural scrapie in Japan. Microbiol. Immunol. 1993;37(4):311-316.

19 - Simmons MM et coll. Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. BMC. Vet. Res. 2007;3(1):20.

20 - Woolhouse MEJ et coll. Epidemiology and control of scrapie within a sheep flock. Proceedings of the Royal Society of London - B. 1998;265:1205-1210.

Surveillance et prévalence des EST chez les petits ruminants

Bulletin Épidémiologique
N°25/novembre 2007 Trimestriel

SOMMAIRE

Page 1 — Surveillance et prévalence des EST chez les petits ruminants
Page 5 — Le RESSAB - Réseau d'ÉpidémioSurveillance des Salmonelloses Bovines - Résultats 2006
Page 8 — Situation des principales maladies réglementées : 30 septembre 2007

A. Fediaevsky [1][2], S. Bélichon [2], J.-N Arsac [1], G. Caneau [1], D. Calavas [1]
[1] Afssa Lyon, 31 av. T. Garnier, 69364 Lyon Cedex
[2] Inra Theix, UR346 EA, 63122 Saint Genès Champanelle
[3] DGAl, 251, rue da Vaugirard, 75 732 Paris Cedex 15

Surveillance et prévalence des EST chez les petits ruminants

L'éventualité d'une contamination des populations ovines et caprines par l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) a motivé la mise en place de programmes d'épidémiosurveillance des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) des petits ruminants depuis plus de dix ans en France.

L'objectif de cette surveillance était initialement « de connaître et de suivre l'évolution de la situation épidémiologique de la tremblante dans le temps et dans l'espace ». Défini à une époque où il n'existait pas de test permettant de distinguer l'ESB de la tremblante, cet objectif a évolué vers une surveillance des différentes formes d'EST des petits ruminants au fur et à mesure du développement des outils de diagnostic et de discrimination des EST.

DE LA SURVEILLANCE PASSIVE À LA SURVEILLANCE ACTIVE

Un réseau volontaire de surveillance clinique, Action Tremblante Grand Sud, a tout d'abord fonctionné à l'échelle interrégionale de 1991 jusqu'en 1996. Ce réseau a permis de mettre en évidence 94 cas de tremblante répartis dans 82 élevages.

En 1996, la tremblante des ovins et des caprins a été ajoutée à la liste des maladies réputées contagieuses (décret 96-528 du 14 juin 1996) et un réseau de surveillance clinique a été défini au plan national l'année suivante, mobilisant les éleveurs, les vétérinaires, les laboratoires et les services vétérinaires selon un schéma similaire à celui déjà mis en place pour les bovins et l'ESB. En 5 ans, ce réseau a permis de mettre en évidence la tremblante dans 339 élevages, dont la moitié était située dans les Pyrénées-Atlantiques. Cependant, faute de méthode appropriée, il n'y avait pas de distinction entre les différentes souches d'EST et tout cas confirmé était, de fait, considéré comme assimilé à un cas de tremblante.

À partir de 2002, un programme européen de surveillance active des EST des petits ruminants (règlement CE/999/2001 du 22 mai 2001 modifié) est venu compléter le dispositif de surveillance clinique, avec comme objectif principal de fournir une estimation moins biaisée de la prévalence grâce aux outils de diagnostic rapide dorénavant disponibles et de détecter, le cas échéant, la présence d'ESB.

ORGANISATION DE LA SURVEILLANCE ACTIVE

Le programme de surveillance active consiste en un échantillonnage d'ovins et de caprins adultes, abattus pour la consommation humaine d'une part, et collectés à l'équarrissage d'autre part.

En fonction des années et des espèces, les animaux prélevés sont sélectionnés par sondage aléatoire ou de façon systématique. Les objectifs de nombre d'échantillons à analyser sont fixés chaque année par la Direction générale de l'alimentation (DGAl), sur la base d'objectifs

minimaux fournis par la Commission européenne et en fonction d'une analyse actualisée du risque. En pratique, les seuils retenus en France ont toujours permis d'obtenir une précision de l'estimateur de la prévalence supérieure aux exigences européennes.

L'organisation générale du programme de surveillance active est illustrée dans la figure 1. Chaque échantillon, consistant en un prélèvement de tronc cérébral ciblant la région de l'obex, est envoyé au laboratoire départemental dont dépend le site de prélèvement. Chaque laboratoire met en œuvre les tests de diagnostic rapide qu'il a sélectionné parmi ceux agréés au niveau européen, cette liste ayant été révisée à plusieurs reprises. Les échantillons *non négatifs* à une EST sont acheminés vers le laboratoire national de référence (Afssa Lyon) pour confirmation et discrimination.

En complément du dépistage des EST, une proportion limitée (0,1 % à 3 % en fonction des années) des ovins prélevés fait l'objet d'un génotypage du gène PrP codant pour la protéine prion afin de surveiller l'évolution de la résistance génétique aux EST de la population ovine.

DIAGNOSTIC DE SOUCHES

En octobre 2005, l'Agence européenne de sécurité sanitaire des aliments (AESA) a publié une classification des EST des petits ruminants fondée sur des critères phénotypiques, principalement biochimiques, et distinguant trois formes d'EST : l'ESB, la tremblante classique et la tremblante atypique [1].

ESB

Le programme de surveillance active mis en place en France en 2002 prévoyait dès le début que les prélèvements positifs confirmés seraient soumis à une analyse discriminante afin de rechercher la présence d'ESB. Les méthodes diagnostiques permettant cette analyse discriminante (ELISA, Western Blot, Immunohistochimie) étaient alors en cours de développement dans différents centres de recherche européens. C'est donc dans un cadre expérimental que certaines de ces analyses ont été engagées dès 2002 par l'Afssa Lyon, aboutissant en particulier en 2005, après plus de trente mois d'analyses et d'expertises, à la confirmation d'un cas d'ESB sur une chèvre française née en 2000 et abattue en 2002.

Par ailleurs, après que les méthodes de discrimination aient été agréées au niveau européen en 2005, les prélèvements positifs confirmés avant cette date en France ont tous été étudiés rétrospectivement. Néanmoins, seul le premier cas de chaque foyer (cas index) a fait l'objet d'un test discriminant, de même qu'il en a été entre 2005 et 2007 pour les nouveaux cas détectés.

Aucun nouveau cas d'ESB n'a été démontré sur des petits ruminants en France jusqu'à présent. Toutefois, il est apparu que certains isolats d'EST, par exemple l'isolat CH1641, présentaient, dans le cadre des analyses discriminantes de première et seconde intention, un profil électrophorétique voisin (en terme de poids moléculaire apparent) mais pouvant être distingué de l'ESB (en terme de ratio de glycoforms). Difficilement caractérisables, ces isolats peuvent être à l'origine de suspicion d'ESB, et nécessitent alors d'avoir recours à la technique de référence pour déterminer s'il s'agit ou non d'ESB. Cette méthode de référence consiste à caractériser les isolats suspects par inoculation à la souris . Le délai de réponse est de l'ordre de deux ans. L'étude est habituellement prise en charge par le laboratoire communautaire de référence du VLA dans le Surrey (Grande-Bretagne), mais peut l'être parfois par l'Afssa Lyon lorsque la suspicion d'ESB est moins consensuelle.

Tremblantes

Dès 2002 en France et en Allemagne, un certain nombre d'échantillons positifs ont présenté des résultats discordants en fonction des différents tests diagnostiques utilisés[2]. Une partie des échantillons *non négatifs* au test de première intention TeSeE ® Bio Rad n'était jamais confirmée par le test de référence biochimique et, parfois, ne l'était pas par le test de référence immunohistochimique. A contrario, les échantillons *non négatifs* par le test Prionics® étaient très généralement confirmés par les tests de référence en vigueur (biochimie, immunohistochimie). Par la suite, de nombreux pays européens (Belgique, Irlande, Portugal, Royaume-Uni, Suisse) [1] ont rapporté l'identification de ces cas de tremblante désignés comme « atypiques ». Ces isolats de tremblante atypique présentaient des caractéristiques similaires aux isolats baptisés Nor98, identifiés dès 1998 en Norvège [3].

Les protocoles de confirmation ont depuis lors été adaptés et les cas atypiques peuvent aujourd'hui être confirmés sans difficulté par des techniques biochimiques. Par contre, il reste vrai que seuls certains des tests rapides agréés pour la recherche des EST (Bio-rad TeSeE, Bio-Rad TeSeE S/G et Idexx Herdcheck) s'avèrent capables de détecter la tremblante atypique dans les conditions de dépistage actuellement en place sur le terrain. Cette situation conduit à un fort biais dans la répartition spatiale des cas de tremblante atypique que seuls certains laboratoires départementaux, drainant les analyses de certains bassins de production, peuvent détecter.

Suite aux études engagées pour mieux décrire cette maladie, il est apparu que la tremblante atypique se distinguait également de la tremblante classique sur le plan de la physiopathologie et de l'épidémiologie (Avis du CES ESST de l'Afssa n°2006-SA-0195). Notamment, la protéine prion pathologique semble uniquement présente dans le système nerveux central et la contagiosité en élevage semble très limitée, si ce n'est absente. Ces caractéristiques contrastent avec celles, mieux connues, de la tremblante classique qui peut montrer une contagiosité marquée, en particulier lors des agnelages, liée à l'infectiosité des placentas. Le déterminisme génétique de la tremblante atypique est en outre différent de celui de la tremblante classique. Certains génotypes (AHQ, AFRQ) apparaissent particulièrement sensibles à la tremblante atypique, mais aucun génotype ne confère de réelle résistance à cette maladie. Ainsi, en particulier, les animaux génétiquement résistants à la tremblante classique (porteurs d'allèles ARR) peuvent être atteints de tremblante atypique [4].

ESTIMATION DE LA PRÉVALENCE DES EST

L'analyse des résultats du programme de surveillance consiste en une analyse descriptive, prenant en compte la nature et la qualité des données recueillies. Un rendu détaillé est disponible sur le site Internet de l'Afssa (http://www.afssa.fr/), dans l'avis n° 2007-SA-0052 du 20 juillet 2007 et ses annexes.

ESB

À ce jour un seul cas d'EST non distinguable de l'ESB à l'issue des essais sur souris, et donc considéré comme de l'ESB, a été mis en évidence sur une chèvre française par le programme de surveillance. Il est à noter que la nouvelle du résultat du test biologique, publiée en avril 2005, a entraîné une forte intensification de la surveillance des EST chez les caprins à partir de cette date.

Quatre autres prélèvements, collectés entre décembre 2005 et avril 2006 sur des ovins (de génotype ARQ/ARQ), ont présenté des caractéristiques biochimiques suspectes, sans toutefois être complètement similaires à l'ESB. La notification de ces cas, avant même l'obtention des résultats des tests biologiques (qui sont toujours en cours) a conduit à une intensification de la surveillance chez les ovins à partir du début de l'année 2006.

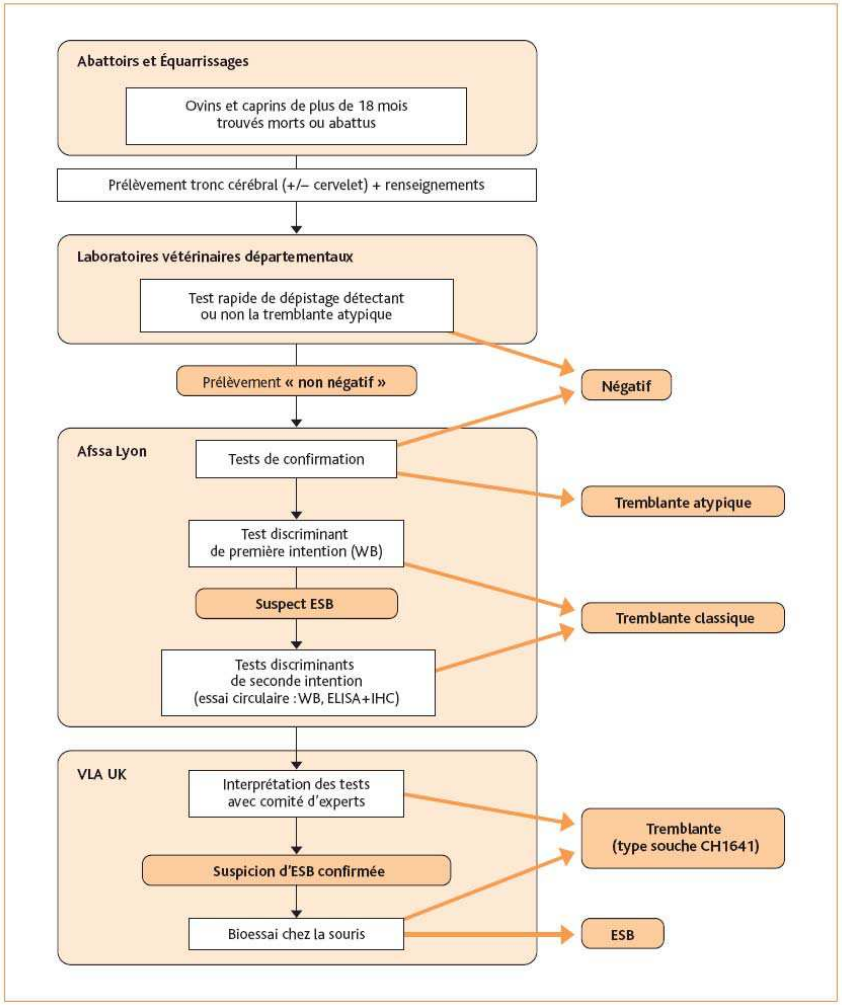


Figure 1 : Schéma du dispositif de surveillance et de diagnostic des EST des petits ruminants

Sur la base des résultats de la surveillance et en tenant compte de ces cas, la prévalence de l'ESB chez les petits ruminants a été récemment précisée. Sa valeur *la plus probable* serait de 0 chez les ovins et chez les caprins à l'équarrissage ; elle serait de 4 cas par million chez les caprins à l'abattoir, compte tenu du cas identifié. En se plaçant dans les conditions les plus défavorables (c'est-à-dire en tenant compte d'une sensibilité imparfaite du programme de surveillance, fixée de façon consensuelle à 50 %, et en considérant la borne supérieure de l'intervalle de confiance de la prévalence), elle serait *au maximum* de 16 et 20 cas par million d'animaux testés respectivement pour les ovins à l'abattoir et à l'équarrissage, et de 30 et 34 cas par million d'animaux testés respectivement pour les caprins à l'abattoir et à l'équarrissage. Il est donc établi que la prévalence de l'ESB chez les petits ruminant est aujourd'hui très faible.

Tremblantes

Les résultats synthétiques de la surveillance active chez les ovins et les caprins entre 2002 et 2006 sont présentés dans le tableau 1. Globalement les deux formes de maladies sont rares avec des prévalences pour l'année 2006, n'excédant pas 7,4 cas index pour 10 000 tests chez les ovins et 1,5 cas index pour 10 000 tests chez les caprins. En raison des biais de sélection et de certaines données manquantes, l'interprétation de ces prévalences doit toutefois être prudente.

Chez les ovins, la prévalence de la tremblante classique est supérieure à l'équarrissage par rapport à l'abattoir d'environ un facteur 10, ce qui est conforme aux connaissances sur la maladie. En revanche, il apparaît que la prévalence de la tremblante atypique est similaire dans les deux sites. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les animaux atteints de tremblante atypique manifestent plus tardivement la maladie, à un âge proche de leur réforme économique. Par ailleurs, la prévalence de la tremblante classique semble diminuer régulièrement entre 2002 et 2006, à l'abattoir comme à l'équarrissage. Cette baisse pourrait être due aux progrès des programmes de sélection génétique en faveur de la résistance à la tremblante (cependant, on n'observe pour l'instant aucune évolution statistiquement significative des fréquences alléliques dans les échantillons de la population générale prélevés chaque année à cette fin), mais aussi aux effets de la police sanitaire, ou encore aux effets d'autres mesures de contrôle, notamment sur l'alimentation animale. L'interdiction totale d'utilisation des farines animales dans l'alimentation des animaux de rente depuis 2001 dans l'Union européenne a en effet mis un terme à toute possibilité de contamination directe ou indirecte des aliments des ruminants, ovins et caprins y compris.

Chez les caprins, les deux formes de tremblante sont plus rares que chez les ovins. Les prévalences sont supérieures à l'équarrissage par rapport à l'abattoir mais ces maladies semblent plus sporadiques, sans évolution particulière des prévalences au cours du temps.

SURVEILLANCE ET POLICE SANITAIRE

L'objectif premier de la surveillance des EST chez les ovins et les caprins n'est pas de lutter contre ces maladies, les plans de sondage n'ayant pas été conçus pour dépister le plus grand nombre d'animaux atteints mais pour estimer la prévalence dans les différentes populations. Cependant, elle a conduit à mettre en évidence un nombre important d'élevages atteints, 945 foyers entre 1996 et 2006, et constitue l'unique porte d'entrée des mesures de police sanitaire dans les cheptels atteints.

Les premières mesures officielles de contrôle de la tremblante prises en 1997 consistaient principalement en une surveillance des animaux issus des élevages infectés, accompagnée de l'élimination des suspects cliniques ou de certaines cohortes de naissance. Les restrictions de mouvement, limitées, ont pu contribuer à diminuer la diffusion de la maladie. Cependant ces mesures ne permettaient ni un assainissement efficace du troupeau, ni un arrêt total de la diffusion à partir des foyers.

Lorsque les connaissances sur le déterminisme génétique de la tremblante classique chez les ovins se sont précisées, les mesures de lutte ont pu être adaptées. Les arrêtés du 15 mars 2002, puis du 27 janvier 2003, ont ainsi pris en compte d'une part la susceptibilité génétique chez les ovins pour définir l'élimination des animaux génétiquement sensibles et le renouvellement par des animaux résistants, et, d'autre part, le risque accru de transmission lors des agnelages pour limiter les mesures de restriction aux élevages de naissance et aux élevages de mise bas des cas positifs. En revanche, en l'absence de susceptibilité génétique connue chez les caprins, l'abattage total s'est imposé comme la seule alternative légale. Des protocoles expérimentaux reposant sur un dépistage à partir de biopsies d'amygdale accompagné d'une période de surveillance ont toutefois été mis en œuvre dans quelques élevages.

Ces mesures, définies en 2003, alors que les moyens de faire la distinction entre les différentes souches d'EST n'étaient pas disponibles, apparaissent aujourd'hui partiellement obsolètes. En effet, ces mesures étaient adaptées à la tremblante classique et ont fait la preuve de leur efficacité. Elles sont en revanche incohérentes dans le cas de la tremblante atypique compte tenu des spécificités, notamment génétiques, de la maladie. De nouvelles mesures devraient être bientôt définies, en cohérence avec les connaissances scientifiques récemment acquises, et en conformité avec la réglementation communautaire récemment révisée.

CONCLUSION

En matière d'EST chez les petits ruminants, la surveillance a été fortement influencée par l'évolution des connaissances et l'analyse des risques. D'un programme de surveillance clinique portant sur une seule maladie à prion indifférenciée, considérée comme de la tremblante, nous sommes passés en quelques années à un programme de surveillance active, parfois intensif, portant sur trois maladies distinctes : la tremblante classique, la tremblante atypique et l'ESB.

Malgré les difficultés de mise en œuvre et d'interprétation qui en ont suivi, il convient de souligner que la surveillance des EST chez les petits ruminants a répondu à ses objectifs de départ. Elle a permis (i) d'estimer précisément la prévalence de la tremblante et d'en suivre l'évolution (ii) d'établir que la prévalence de l'ESB chez les petits ruminants est très faible.

Ces programmes ont en outre contribué, par les mesures de police sanitaire qu'ils déclenchent, à amorcer un assainissement du cheptel français contre la tremblante classique, en complément des mesures génétiques, visant à renforcer la résistance générale de la population ovine à la tremblante classique et à l'ESB, mises en œuvre depuis plusieurs années en France.

Dans les années à venir, l'évolution de la surveillance et du contrôle des EST des petits ruminants continuera de se faire à l'aune d'une analyse régulièrement renouvelée du risque que ces maladies peuvent représenter pour la santé publique et la santé animale. Les résultats rassurants en matière d'ESB, et l'image claire de la situation française en matière de tremblante classique et atypique, obtenus grâce aux programmes de surveillance intensifs réalisés ces dernières années devraient en particulier fonder rapidement une révision de la surveillance active vers un programme allégé mais pérennisé.

RÉFÉRENCES

[1] (EFSA) EFSA: Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in Small Ruminants. The EFSA Journal 2005, 276:1-30.

[2] Buschmann A, Biacabe A-G, Ziegler U, Bencsik A, Madec J-Y, Erhardt G, Lühken G, Baron T, Groschup MH: Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. Journal of Virological Methods 2004, 117:27-36.

[3] Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schönheit J, Tranulis MA, Bratberg B: Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type Nor98. The Veterinary Record 2003, 153:202-208.

[4] Moreno CR, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Cazeau G, Andreoletti O, Chadi S, Elsen JM, Calavas D: Which PrP haplotypes in a French sheep population are the most susceptible to atypical scrapie? 2007, 152:1229-1232.

Tableau 1 : Résultats synthétiques de la surveillance active des EST des petits ruminants de 2002 à 2006. TC : Tremblante classique, TA : Tremblante atypique, IC95 % : Intervalle de confiance à 95 %, prévalences exprimées en cas pour 10 000 animaux testés.

Espèce	Plan	Année	Tests (dont Bio-rad ou Idexx)	Cas index TC	Prévalence TC	IC95 % TC	Cas index TA	Prévalence TA	IC95 % TA
Ovins	Abattoir	2002	33663 (14627)	16	4,8	[2,7-7,8]	11	7,5	[3,8-13,4]
		2003	44267 (25477)	19	4,3	[2,5-6,6]	22	8,6	[5,4-13,1]
		2004	12377 (8366)	6	4,8	[2,0-10,8]	4	4,8	[1,3-12,2]
		2005	12170 (7544)	3	2,5	[0,6-7,2]	8	10,6	[4,6-20,9]
		2006	263181 (195942)	21	0,8	[0,0-2,0]	107	5,5	[4,5-6,6]
	Équarrissage	2002	17323 (3839)	104	60,0	[49,2-72,5]	4	10,4	[2,8-26,6]
		2003	18864 (5611)	24	12,7	[8,5-18,9]	7	12,5	[5,0-25,6]
		2004	12228 (5183)	19	15,5	[9,7-24,2]	2	3,9	[0,0-13,9]
		2005	22073 (7980)	29	13,1	[8,9-19,1]	5	6,3	[2,0-14,6]
		2006	228465 (110872)	161	7,0	[5,4-8,2]	82	7,4	[5,9-9,2]
Caprins	Abattoir	2002	14858 (1646)	1	0,7	[0,0-3,8]	0	0,0	[0,0-22,4]
		2003	11200 (2200)	2	1,8	[0,0-6,5]	0	0,0	[0,0-16,8]
		2004	Pas de tests						
		2005	100463 (16401)	0	0,0	[0,0-1,2]	2	1,2	[0,1-4,4]
		2006	112983 (18399)	0	0,0	[0,0-1,2]	0	0,0	[0,0-2,0]
	Équarrissage	2002	12214 (1568)	8	6,5	[2,6-12,8]	1	6,4	[0,2-35,5]
		2003	11952 (3495)	3	2,5	[0,6-7,2]	2	5,7	[0,7-20,6]
		2004	5654 (3382)	1	1,8	[0,0-9,7]	0	0,0	[0,0-10,9]
		2005	47860 (26846)	8	1,7	[0,6-4,0]	4	1,5	[0,4-3,8]
		2006	52611 (30612)	8	1,5	[0,6-3,9]	1	0,3	[0,0-1,8]

Prévalence des formes classique et atypique de tremblante chez les petits ruminants en France entre 2002 et 2006

Prévalence des formes classique et atypique de tremblante chez les petits ruminants en France entre 2002 et 2006

G. CAZEAU[1*], A. FEDIAEVSKY[1, 2], D. CALAVAS[1]

[1] *AFSSA Lyon, 31 Avenue T. Garnier, 69364 Lyon cedex 07, France.*
[2] *INRA, UR 346 Epidémiologie animale, 63122 Saint Genès Champanelle, France*

**Auteur chargé de la correspondance : E-mail : g.cazeau@lyon.afssa.fr*

RÉSUMÉ

Le programme de surveillance active des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) chez les petits ruminants a été mis en place en France en avril 2002. Son objectif premier était de fournir une estimation de la prévalence des EST chez les petits ruminants au plan national, à partir d'un sondage à l'équarrissage et à l'abattoir. En complément au dépistage des EST, le programme prévoyait la détermination du génotype, aux trois codons du gène prion associés à la résistance à la tremblante classique, sur un échantillon d'ovins. Entre avril 2002 et le 31 décembre 2006, 369 922 caprins et 665 296 ovins ont été testés à l'abattoir et à l'équarrissage. Parmi ces derniers, 3 395 ovins ont été génotypés. L'analyse des données a permis de mettre en évidence les variations des taux de sondage en fonction des années, des espèces et des programmes de dépistage, ainsi que sur le plan géographique. Couplé à l'utilisation de plusieurs tests diagnostic, ces facteurs sont sources de biais dans l'estimation des prévalences. La prévalence de la tremblante classique était supérieure à l'équarrissage (ovins $1{,}13*10^{-3}$, caprins $2{,}15*10^{-4}$) par rapport à l'abattoir (ovins $1{,}78*10^{-4}$, caprins $1{,}25*10^{-5}$) ce qui n'était pas le cas de la tremblante atypique. Il apparaît également que la prévalence de la tremblante classique chez les ovins a décru au cours du temps. A partir de l'échantillon analysé, les fréquences alléliques apparaissent stables au cours du temps. Le programme de surveillance a permis de préciser les situations épidémiologiques des différentes formes de tremblante en France et leurs évolutions. Des modifications seraient cependant nécessaires d'une part pour améliorer l'exactitude des mesures de prévalence et d'autre part pour améliorer la précision de la mesure des fréquences alléliques.

Mots-clés : Tremblante, ovins, caprins, épidémiologie descriptive, prévalence, France.

SUMMARY

Prevalence of classical and atypical scrapie in sheep and goats in France between 2002 and 2006

The active surveillance program of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) among small ruminants was implemented in France in April 2002. Its main objective was to provide an estimate of the prevalence of TSEs in small ruminants at the national level, by sampling animals from rendering plants and abattoirs. In addition with the screening of TSEs, the program envisaged the determination of the genotype of the three codons of the gene prion associated with resistance to classical scrapie on a sample of sheep. Between April 2002 and December 31 2006, 369,922 goats and 665,296 sheep were tested from abattoirs and rendering plants. Among the latter, 3,395 sheep were genotyped . The analysis of data pointed out the variations of the sampling ratio according to years, species and surveillance stream, as well as on a geographical level. Coupled with the use of several diagnostic tests, these factors are sources of biases in the estimate of the prevalence. The prevalence of classical scrapie was higher for fallen stock (sheep $1.13*10^{-3}$, goats $2.15*10^{-4}$) than for healthy slaughtered animals (sheep $1.78*10^{-4}$, goats $1.25*10^{-5}$) which was not the case for atypical scrapie. It also appeared that the prevalence of classical scrapie in sheep decreased between 2002 and 2006. From the analysed samples, the allelic frequencies do not seem to vary in time. The active surveillance program made it possible to specify the epidemiological situations of the different forms of scrapie in France and their evolutions. However, modifications would be necessary, on one hand to improve the exactitude of prevalence, and on the other hand to improve the accuracy of allelic frequencies estimates.

Keywords: Scrapie, Sheep, goats, descriptive epidemiology, prevalence, France.

Introduction

Maladie transmissible et contagieuse, avec une forte composante génétique chez les ovins, la tremblante des petits ruminants fait partie des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST). Décrite dès le XVIII[e] siècle chez les ovins [13] puis chez les caprins [11], de nombreux travaux récents ont permis de préciser ses caractéristiques [3-5, 7]. Il s'agit d'une maladie neuro-dégénérative d'évolution fatale qui se caractérise par des lésions de vacuolisation du système nerveux central associées à l'accumulation d'un isomère anormal (PrPSc) de la protéine prion normale (PrPc). L'apparition de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) en 1986 [32], la preuve dès 1993 de sa transmissibilité expérimentale aux petits ruminants par voie orale avec de faibles quantités de matériel infectieux [20], puis la mise en évidence en 1996 de la relation entre l'ESB et un variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) [10, 12, 33] ont fait reconsidérer le risque représenté par les EST des petits ruminants pour l'Homme. En effet, les petits ruminants ont très vraisemblablement été exposés de la même manière que les bovins à l'agent de l'ESB via l'alimentation, aussi doit-on envisager l'hypothèse que des petits ruminants aient été

contaminés par l'ESB, et soient donc potentiellement à risque pour l'Homme. Aussi l'objectif de la surveillance épidémiologique de la tremblante des petits ruminants répond donc avant tout à une problématique de santé publique. Parallèlement aux mesures de contrôle, une surveillance clinique a été mise en place en France en 1996 (DGAL/SDSPA/N97/N°8127). A partir de 2002, en raison de la réévaluation au niveau européen du risque représenté par l'ESB chez les petits ruminants et de la disponibilité de tests rapides, utilisables à large échelle, une surveillance active a été mise en place dans le cadre du règlement européen CE n° 999/2001 qui impose la réalisation d'un certain nombre d'analyses pour estimer la prévalence des EST chez les petits ruminants à l'abattoir et à l'équarrissage et pour détecter la présence d'ESB, le cas échéant. A la fin de la première année de surveillance, un cas non distinguable de l'ESB, le seul jusqu'à ce jour, a été détecté chez une chèvre et confirmé en 2005 [18]. A partir de 2002, en France et dans d'autres pays européens, des cas de tremblante difficiles à confirmer, présentaient des résultats discordants en fonction des méthodes d'analyse. Ces cas présentaient les mêmes caractéristiques que les isolats Nor98 décrits en Norvège [8]. Par la suite l'Autorité européenne pour la sécurité alimentaire a intégré l'ensemble des données disponibles ce qui a conduit à définir une nouvelle entité pathologique, la tremblante atypique [1]. Cette forme de tremblante se distingue de la forme classique sur le plan clinique [22, 29] et physiopathologique [8, 23, 31]. La maladie présente également des particularités génétiques, les allèles les plus à risque sont $A_{136}F_{141}R_{154}Q_{171}$, $A_{136}H_{154}Q_{171}$ et $A_{136}R_{154}R_{171}$ [1, 17, 25, 27]. La maladie a été transmise par voie intracérébrale à des souris [23] et à un ovin [31]. Il semble cependant qu'elle soit peu ou pas contagieuse en conditions naturelles [2, 21, 24].

Cet article a pour objectif de décrire la situation épidémiologique des formes de tremblante classique et atypique en France à partir des données de la surveillance active et son évolution dans le temps entre 2002 et 2006.

Matériel et Méthodes

ORGANISATION DU PROGRAMME DE SURVEILLANCE

Le programme de surveillance active mis en place à partir d'avril 2002 consiste en un sondage aléatoire dans les populations d'ovins et de caprins adultes abattus à des fins de consommation humaine d'une part, trouvés morts ou euthanasiés d'autre part. Les taux de sondage ont été définis annuellement par le Ministère de l'agriculture en prenant en compte les taux minimums requis par le règlement européen n°999/2001 modifié.

Sur le plan de l'organisation générale du programme, chaque échantillon (prélèvement de tronc cérébral) est envoyé au laboratoire vétérinaire départemental (LVD) dont dépend le site de prélèvement. Chaque laboratoire choisit le(s) test(s) de diagnostic rapide qu'il met en œuvre parmi une liste de tests agréés au niveau européen. Les échantillons *non négatifs* sont envoyés au laboratoire national de référence (AFSSA Lyon) pour confirmation par Western Blot et/ou immunohistochimie. Seuls certains tests rapides (Biorad et Idexx) s'avèrent en pratique capables de détecter la tremblante atypique sur le type de prélèvement prévu dans le programme (tronc cérébral) [24, 28]. Tous les cas confirmés font l'objet d'un typage biochimique discriminant permettant de distinguer la tremblante classique, la tremblante atypique et l'ESB.

En complément au dépistage des EST, le programme prévoyait pour les ovins, d'effectuer un prélèvement complémentaire permettant la détermination du génotype du gène PRNP codant pour la protéine prion. La procédure de sélection de ces prélèvements a évolué au cours de la période. En 2002 et 2003, le génotypage devait être effectué aléatoirement sur 1% des ovins prélevés. Les taux de sondage ont été fixés à 3% en 2004 et 2005 et à 1‰ en 2006. Dans le cadre de ce programme, le génotypage des ovins a été réalisé au niveau des codons 136, 154 et 171, par une méthode ne permettant pas de distinguer les allèles H et Q en position 171.

DONNÉES DISPONIBLES ET SÉLECTION DE L'ÉCHANTILLON D'ÉTUDE

Le programme de surveillance active des EST chez les petits ruminants prévoyait que chaque prélèvement soit accompagné d'une fiche, renseignée par le préleveur au niveau du site de prélèvement – abattoir ou équarrissage. Contrairement aux bovins, les petits ruminants circulent sans passeport individuel. On ne dispose donc pas de document d'accompagnement attestant formellement leur date de naissance, leur numéro d'identification, leur cheptel d'origine, leur sexe et leur race. Ainsi, le renseignement de la race se fait par reconnaissance visuelle et dépend de l'expertise du préleveur et de la singularité de chaque race. Quant à l'origine de l'animal, elle est confondue avec le numéro EDE (donné par l'Etablissement départemental de l'élevage) identifiant l'exploitation correspondant à l'immatriculation de l'animal. Si l'animal a transité par plusieurs exploitations, ce numéro EDE peut correspondre à l'exploitation de naissance ou à une exploitation de transit où l'animal aura été ré-identifié. De plus dans certains cas l'immatriculation de l'animal est illisible ou fait défaut. Les LVD ont en charge la saisie des fiches de renseignements et leur transmission à la base de données nationale sur les EST.

L'analyse de cette base a mis en évidence des doublons, soit de numéros d'identification des animaux, soit de numéros de prélèvement. Les enregistrements qui ont pu être différenciés ont été conservés, les autres supprimés. Ces suppressions n'ont concerné que des résultats négatifs.

ESTIMATION DES TAUX DE SONDAGE

Les taux de sondage en fonction des populations de petits ruminants ont été estimés en rapportant le nombre d'animaux testés (pour la tremblante classique tous tests confondus et pour la tremblante atypique les tests Biorad et Idexx) aux effectifs d'animaux par département (recensements agricoles des populations de petits ruminants de 2002 à 2005).

Le nombre d'exploitations ovines ou caprines ayant eu au moins un animal testé au cours de la période 2002-2006 a été estimé de la façon suivante. Concernant les animaux testés, seuls les prélèvements ayant des numéros EDE pouvant

correspondre réellement à une exploitation ont été pris en compte (les 5 premiers caractères devaient correspondre à un code INSEE communal et les trois derniers caractères devaient être différents de 000, 999 ou XXX).

Afin de déterminer le taux d'exploitations sondées, le nombre d'exploitations ovines et caprines en activité a été estimé à partir de deux sources de données : i) le registre national faisant la correspondance entre les numéros EDE et les numéros d'immatriculation prévus depuis la réforme de l'identification des petits ruminants depuis juillet 2005 et qui compte 145 419 exploitations de petits ruminants (source DGAl), ii) les recensements des exploitations agricoles de 2000 et 2005, respectivement 122 383 et 90 211 exploitations de petits ruminants (source AGRESTE).

ESTIMATION DES PRÉVALENCES

Les prévalences ont été calculées en rapportant le nombre de cas détectés au nombre d'animaux testés, par espèce, par programme et par année, et selon le type de tremblante (classique ou atypique).

La prévalence de la tremblante classique a été calculée à partir du nombre de cas classiques détectés et du nombre total de tests réalisés (tous tests confondus). La prévalence de la tremblante atypique a été calculée à partir du nombre de cas atypiques détectés et du nombre de tests Biorad et Idexx réalisés (seuls tests recommandés pour la détection de la tremblante atypique à partir du tronc cérébral).

ANALYSE STATISTIQUE

L'ensemble des données a été intégré dans une base de données (Microsoft Access 2000 SR-1, Copyright © 1992-1999 Microsoft Corporation). Les différents graphiques ainsi que les comparaisons (Khi-Deux et Khi-Deux de tendance) ont été effectués avec le logiciel S-Plus (S-PLUS® 6.2 for Windows PROFESSIONAL EDITION Copyright 1988, 2003 Insightful Corp.).

Résultats

Après suppression des doublons (près de 10 000 lignes sur les 5 années) ainsi que des 1518 prélèvements inexploitables (absence de prélèvement ou quantité insuffisante, échantillon non analysable ou non conforme), on recense 665 296 ovins et 369 922 caprins testés à l'abattoir et l'équarrissage entre le 1er avril 2002 et le 31 décembre 2006. Le tableau 1 décompose le nombre de prélèvements effectués par espèce et par programme pour chacune des 5 années. On remarque que 74% des ovins et 45% des caprins testés au cours de la période l'ont été en 2006.

PROPORTION D'EXPLOITATIONS AYANT FAIT L'OBJET D'UN PRÉLÈVEMENT

La base de données de l'étude comprenait 142 658 numéros EDE différents. Après élimination des enregistrements dont le numéro EDE n'était pas compatible avec un numéro réel (n = 36 796), 105 862 exploitations ont eu au moins un animal testé (caprin ou ovin) au cours de la période 2002 à 2006.

Parmi ces 105 862 exploitations, 46 568 n'avaient pas de correspondance avec le registre d'immatriculation national. L'écart important entre ces deux bases s'explique difficilement par les erreurs habituelles liées à ce type de données (fermeture d'atelier, non demande d'immatriculation, erreurs de saisie, etc.).

Le taux de sondage pour les exploitations figurant dans le registre d'immatriculation s'élève donc globalement pour la période 2002-2006 à 41 % ((105 862 – 46 568) / 145 419) ; 16,5 % pour la période antérieure à 2006 et 56,3 % pour 2006.

Sur la base des recensements de 2000 et 2005, les taux d'exploitations sondées étaient de 19,6 % pour la période antérieure à 2006 (sur la base des 122 383 exploitations recensées en 2000) et de 90,8 % pour 2006 (sur la base des 90 211 exploitations recensées en 2005).

La figure 1 représente la distribution du nombre de tests par exploitation chez les ovins et les caprins sur la période 2002-2006, abattoir et équarrissage confondus. On remarque que 47 % des exploitations ont eu un ovin testé, et 13 % en ont eu deux. Chez les caprins, 56% des exploitations ont eu un animal testé, et 10% en ont eu deux.

RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE DU TAUX DE SONDAGE

Sur la période 2002-2006, il apparaît que l'hétérogénéité des taux de sondage est agrégée en zones qui semblent reliées à différents bassins de production (données non montrées). Ainsi pour les ovins, la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA) a un des plus faibles taux de sondage, même depuis l'introduction du dépistage exhaustif. Les Pyrénées-Atlantiques connaissent également un faible taux de sondage par rapport à la moyenne nationale en 2006, alors que ce n'était pas le cas auparavant.

En ce qui concerne les caprins, pour lesquels la majeure partie de la population se concentre dans quelques départements, la répartition des taux de sondage départementaux est plus uniforme.

On observe par ailleurs un fort taux de sondage à l'abattoir dans l'Ouest et un fort taux de sondage à l'équarrissage dans le Centre, à la fois pour les ovins et les caprins.

PRÉVALENCE DES TREMBLANTES CLASSIQUE ET ATYPIQUE

La figure 2 représente la prévalence de la tremblante classique chez les ovins, par programme au cours de la période 2002-2006. En moyenne sur cette période, la prévalence de la tremblante classique a été de $6{,}05*10^{-4}$ chez les ovins et de $8{,}38*10^{-5}$ chez les caprins (tableau 2).

Chez les ovins à l'abattoir, la différence de prévalence de la tremblante classique en fonction des années est significative (Khi-deux $p = 6{,}42*10^{-11}$), cette tendance étant à la diminution au cours du temps (Khi-deux de tendance $p = 1{,}11*10^{-12}$).

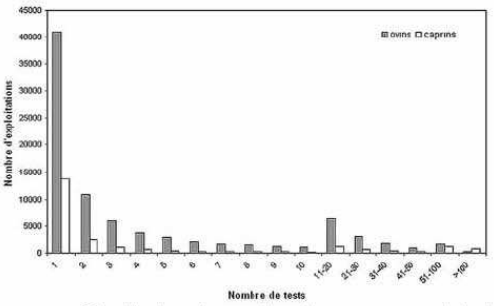


FIGURE 1 : Distribution du nombre de tests par exploitation chez les ovins et les caprins pour la période 2002-2006 (abattoir et équarrissage confondus).

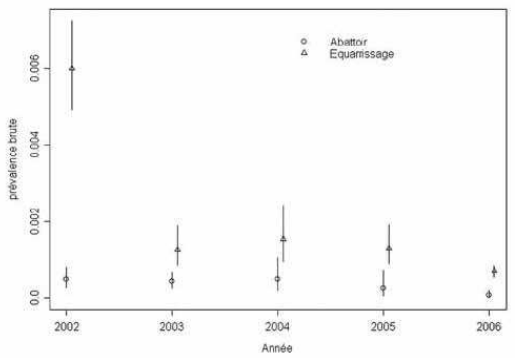


FIGURE 2 : Prévalence de la tremblante classique en France chez les ovins par année et par programme (IC à 95 %).

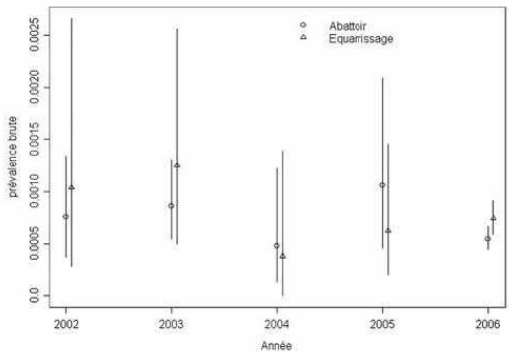


FIGURE 3 : Prévalence de la tremblante atypique en France chez les ovins par année et par programme (IC à 95 %).

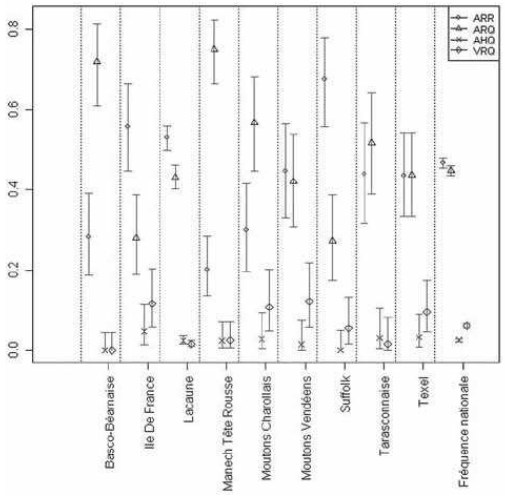


FIGURE 4 : Fréquence de portage allélique et intervalles de confiance à 95 % pour les races ayant eu plus de 30 animaux génotypés (période 2002-2006).

Chez les ovins à l'équarrissage, la différence de prévalence de la tremblante classique en fonction des années est également significative (Khi-deux p = 4,99*10^{-4}). Si l'on retire les ovins (négatifs et positifs) issus du département des Pyrénées-Atlantiques, qui a connu un épisode épidémique au cours des dernières décennies, on note toujours une différence significative de prévalence de la tremblante classique en fonction des années à l'abattoir (Khi-deux p = 4,35*10^{-7}) comme à l'équarrissage (Khi-deux p <2*10^{-16}). De même, pour le département des Pyrénées-Atlantiques (qui contribue pour 5,2 % et 4,3 % des prélèvements respectivement à l'abattoir et à l'équarrissage) la diminution de la prévalence se confirme à l'abattoir (Khi-deux p = 0,03, Khi-deux de tendance p = 1,3*10^{-3}) et plus nettement à l'équarrissage (Khi-deux p <2*10^{-16}, Khi-deux de tendance p <2*10^{-16}). Ainsi, l'observation d'une diminution de la prévalence nationale entre 2002 et 2006 à l'abattoir comme à l'équarrissage n'est pas due à l'évolution de la situation dans les Pyrénées-Atlantiques.

Pour la tremblante classique caprine, il n'y a pas de différence significative en fonction des programmes, ni des années (Khi-Deux, p ~ 0,07).

La figure 3 représente la prévalence de la tremblante atypique chez les ovins, par programme au cours de la période 2002-2006. En moyenne sur cette période, la prévalence de la tremblante atypique a été de 6,54*10-^{4} chez les ovins et de 9,56*10-^{5} chez les caprins (tableau 2).

Chez les ovins, il n'y a pas de différence significative de la prévalence de la tremblante atypique en fonction des années à l'abattoir (Khi-deux p = 0,12) comme à l'équarrissage (Khi-deux p = 0,49). Toutefois, le Khi-deux de tendance à l'abattoir est significatif (p = 0,05). Il en est de même chez les caprins où la prévalence de la tremblante atypique est également stable tout au long de la période à l'abattoir (Khi-deux p = 0,44). Le Khi-deux de tendance ne peut être mis en œuvre en raison de la discontinuité de la surveillance (pas de tests en 2004 à l'abattoir). En revanche, à l'équarrissage, on note une diminution de la prévalence de la tremblante atypique caprine (Khi-deux, p = 0,02, Khi-deux de tendance p = 0,03).

GÉNÉTIQUE DES OVINS ISSUS DE LA SURVEILLANCE

Au total 3 501 ovins négatifs ont été génotypés entre 2002 et 2006 ; 55 prélèvements n'ont pu être analysés à l'abattoir et 51 à l'équarrissage (analyse inexploitable). Sur les 3 395 génotypes obtenus, la distribution des fréquences alléliques a été calculée pour les différentes années à l'abattoir et à l'équarrissage (tableau 3).

A l'abattoir comme à l'équarrissage, la distribution des fréquences alléliques n'est pas significativement différente d'une année sur l'autre (Khi-Deux, $p \sim 0.2$). Si l'on regroupe alors les années, la distribution des allèles n'est pas non plus significativement différente entre les programmes (Khi-Deux , $p = 0{,}25$).

Ainsi, un regroupement années et programmes peut être effectué afin d'estimer la fréquence de portage allélique par race. Seules les races ayant eu plus de trente animaux génotypés sont représentées dans la figure 4.

Trois profils de races se distinguent en fonction de la fréquence de l'allèle ARR :

celles pour lesquelles la fréquence de l'allèle de résistance ARR est faible, inférieure à la fréquence nationale de 47% : Basco-Béarnaise 28%, Manech Tête Rousse 21% et Mouton Charollais 30% ;

celles pour lesquelles la fréquence de l'allèle ARR est supérieure à la fréquence nationale : Suffolk 68%, Ile de France 56% et Lacaune 53% ;

celles dont la fréquence de l'allèle ARR se situe dans la moyenne nationale : Texel, Tarasconnaise, Moutons vendéens.

		Prélèvements abattoir		Prélèvements équarrissage	
		Prévus	**Réalisés**	**Prévus**	**Réalisés**
2002	**Ovins**	41 200	33 694	18 700	17 443
	Caprins	18 800	14 860	16 800	12 227
2003	**Ovins**		44 310		18 897
	Caprins		11 203		11 958
2004	**Ovins**	10 000	12 388	10 000	12 251
	Caprins	aucun	75	5 000	5 655
2005	**Ovins**	10 000	12 181	10 000	22 109
	Caprins	60 000	100 465	Tous	47 873
2006	**Ovins**	10 000*	263 311	Tous	228 712
	Caprins	tous	112 984	Tous	52 622

*exhaustif d'avril à décembre

TABLEAU 1 : Nombre de prélèvements du programme de surveillance active prévus et réalisés entre 2002 et 2006.

Discussion

A partir des données de la surveillance active des EST chez les petits ruminants en France entre 2002 et 2006, il a été possible de décrire la répartition de ces maladies et leur évolution dans le temps.

Entre 2002 et 2006 les taux de sondage ont subi des variations en fonction des années, des espèces et des programmes de dépistage (équarrissage, abattoir). L'estimation de la proportion d'exploitations sondées s'avère délicate et varie selon la référence prise pour le recensement des exploitations. Par exemple, le registre d'immatriculation national comptabilise les détenteurs dès le premier animal déclaré, à la différence des recensements AGRESTE qui ne comptent que les exploitations professionnelles. Aussi, aucun de ces deux dénominateurs n'est entièrement satisfaisant. Les estimations à partir de ces deux sources s'accordent cependant pour indiquer qu'entre 2002 et 2005, moins d'un quart des exploitations de petits ruminants ont eu au moins un animal testé. En ajoutant l'année 2006, c'est plus de la moitié (sans doute près des trois quarts) des exploitations de petits ruminants qui ont eu au moins un animal testé.

En l'absence de données sur les effectifs des exploitations sondées en France, la capacité de détecter un foyer en fonction du nombre d'animaux testés est difficilement estimable. On observe en toute logique que la probabilité de détecter une exploitation atteinte de tremblante augmente avec le nombre d'animaux testés dans l'exploitation. Cependant étant donnée la prévalence très faible des deux formes de tremblante, la probabilité de détecter une EST dans une exploitation dans laquelle un ou deux animaux ont été testés au cours de la période 2002-2006 (60 % des exploitations ont fait l'objet d'un seul prélèvement) est très faible.

En ce qui concerne les taux de sondage sur le plan géographique, il faut noter une hétérogénéité durant toute la période étudiée. Même pendant les phases d'exhaustivité des programmes, décidées chez les caprins en 2005 à l'équarrissage et chez les ovins en 2006 à l'équarrissage puis à l'abattoir, il

		Tremblante classique		Tremblante atypique	
Plan	**Année**	**Prévalence**	**IC (95%)**	**Prévalence**	**IC (95%)**
OVINS					
Abattoir	**2002**	$4{,}80*10^{-4}$	$[2{,}70*10^{-4} - 7{,}80*10^{-4}]$	$7{,}51*10^{-4}$	$[3{,}75*10^{-4} - 1{,}34*10^{-3}]$
	2003	$4{,}30*10^{-4}$	$[2{,}50*10^{-4} - 6{,}60*10^{-4}]$	$8{,}63*10^{-4}$	$[5{,}41*10^{-4} - 1{,}31*10^{-3}]$
	2004	$4{,}80*10^{-4}$	$[2{,}00*10^{-4} - 1{,}08*10^{-3}]$	$4{,}78*10^{-4}$	$[1{,}30*10^{-4} - 1{,}22*10^{-3}]$
	2005	$2{,}50*10^{-4}$	$[6{,}00*10^{-5} - 7{,}20*10^{-4}]$	$1{,}06*10^{-3}$	$[4{,}57*10^{-4} - 2{,}09*10^{-3}]$
	2006	$8{,}00*10^{-5}$	$[0{,}00 - 2{,}00*10^{-4}]$	$5{,}46*10^{-4}$	$[4{,}48*10^{-4} - 6{,}60*10^{-4}]$
	Moyenne	$*1{,}78*10^{-4}$*	$*[1{,}37*10^{-4} - 2{,}26*10^{-4}]$*	$*6{,}03*10^{-4}$*	$*[5{,}11*10^{-4} - 7{,}07*10^{-4}]$*
Equarrissage	**2002**	$6{,}00*10^{-3}$	$[4{,}92*10^{-3} - 7{,}25*10^{-3}]$	$1{,}04*10^{-3}$	$[2{,}84*10^{-4} - 2{,}66*10^{-3}]$
	2003	$1{,}27*10^{-3}$	$[8{,}50*10^{-4} - 1{,}89*10^{-3}]$	$1{,}25*10^{-3}$	$[5{,}01*10^{-4} - 2{,}56*10^{-3}]$
	2004	$1{,}55*10^{-3}$	$[9{,}70*10^{-4} - 2{,}42*10^{-3}]$	$3{,}86*10^{-4}$	$[0{,}00 - 1{,}39*10^{-3}]$
	2005	$1{,}31*10^{-3}$	$[8{,}90*10^{-4} - 1{,}91*10^{-3}]$	$6{,}26*10^{-4}$	$[2{,}00*10^{-4} - 1{,}46*10^{-3}]$
	2006	$7{,}00*10^{-4}$	$[5{,}40*10^{-4} - 8{,}20*10^{-4}]$	$7{,}39*10^{-4}$	$[5{,}88*10^{-4} - 9{,}17*10^{-4}]$
	Moyenne	$*1{,}13*10^{-3}$*	$*[1{,}01*10^{-3} - 1{,}25*10^{-3}]$*	$*7{,}49*10^{-4}$*	$*[6{,}10*10^{-4} - 9{,}11*10^{-4}]$*
Tous programmes confondus		$\mathbf{6{,}05*10^{-4}}$	$\mathbf{[5{,}47*10^{-4} – 6{,}67*10^{-4}]}$	$\mathbf{6{,}54*10^{-4}}$	$\mathbf{[5{,}76*10^{-4} – 7{,}40*10^{-4}]}$
CAPRINS					
Abattoir	**2002**	$7{,}00*10^{-5}$	$[0{,}00 - 3{,}80*10^{-4}]$	0,00	$[0{,}00 - 2{,}24*10^{-3}]$
	2003	$1{,}80*10^{-4}$	$[0{,}00 - 6{,}50*10^{-4}]$	0,00	$[0{,}00 - 1{,}68*10^{-3}]$
	2004	Pas de test			
	2005	0,00	$[0{,}00 - 1{,}20*10^{-4}]$	$1{,}22*10^{-4}$	$[1{,}48*10^{-5} - 4{,}40*10^{-4}]$
	2006	0,00	$[0{,}00 - 1{,}20*10^{-4}]$	0,00	$[0{,}00 - 2{,}00*10^{-4}]$
	Moyenne	$*1{,}25*10^{-5}$*	$*[2{,}58*10^{-6} - 3{,}66*10^{-5}]$*	$*5{,}18*10^{-5}$*	$*[6{,}27*10^{-6} - 1{,}86*10^{-4}]$*
Equarrissage	**2002**	$6{,}50*10^{-4}$	$[2{,}60*10^{-4} - 1{,}28*10^{-3}]$	$6{,}37*10^{-4}$	$[1{,}61*10^{-5} - 3{,}55*10^{-3}]$
	2003	$2{,}50*10^{-4}$	$[6{,}00*10^{-5} - 7{,}20*10^{-4}]$	$5{,}72*10^{-4}$	$[6{,}93*10^{-5} - 2{,}06*10^{-3}]$
	2004	$1{,}80*10^{-4}$	$[0{,}00 - 9{,}70*10^{-4}]$	0,00	$[0{,}00 - 1{,}09*10^{-3}]$
	2005	$1{,}70*10^{-4}$	$[6{,}00*10^{-5} - 4{,}00*10^{-4}]$	$1{,}49*10^{-4}$	$[4{,}06*10^{-5} - 3{,}81*10^{-4}]$
	2006	$1{,}50*10^{-4}$	$[6{,}00*10^{-5} - 3{,}90*10^{-4}]$	$3{,}27*10^{-5}$	$[8{,}27*10^{-7} - 1{,}82*10^{-4}]$
	Moyenne	$*2{,}15*10^{-4}$*	$*[1{,}43*10^{-4} - 3{,}11*10^{-4}]$*	$*1{,}21*10^{-4}$*	$*[5{,}24*10^{-5} - 2{,}39*10^{-4}]$*
Tous programmes confondus		$\mathbf{8{,}38*10^{-5}}$	$[5{,}70*10^{-5} - 1{,}19*10^{-4}]$	$\mathbf{9{,}56*10^{-5}}$	$\mathbf{[4{,}59*10^{-5} – 1{,}76*10^{-4}]}$

TABLEAU 2 : Prévalences annuelles et moyennes des formes classique et atypique de tremblante sur l'ensemble de la période 2002 – 2006 par programme et par espèce.

		Années					
		2002	**2003**	**2004**	**2005**	**2006**	**TOTAL**
Equarrissage	**% ARQ**	47%	42%	47%	44%	37%	**43%**
	% VRQ	5%	4%	7%	7%	4%	**6%**
	% AHQ	1%	4%	2%	3%	2%	**3%**
	% ARR	47%	50%	44%	46%	57%	**48%**
Abattoir	**% ARQ**	46%	48%	48%	45%	44%	**46%**
	% VRQ	6%	7%	6%	7%	4%	**6%**
	% AHQ	3%	2%	3%	2%	2%	**2%**
	% ARR	45%	43%	43%	46%	50%	**46%**

TABLEAU 3 : Distribution des fréquences alléliques ARR, ARQ, AHQ et VRQ par année à l'équarrissage et à l'abattoir chez les ovins négatifs.

Plan	Année	*Prévalence*
Abattoir	2002	$9,83*10^{-4}$
	2003	$3,31*10^{-4}$
	2004	$2,71*10^{-4}$
	2005	$2,93*10^{-4}$
	2006	0,00
Equarrissage	2002	$6,35*10^{-3}$
	2003	$2,54*10^{-3}$
	2004	$1,66*10^{-3}$
	2005	$1,87*10^{-3}$
	2006	$9,11*10^{-4}$

TABLEAU 4 : Prévalence de la tremblante classique par année et par programme chez les ovins de race Lacaune.

n'a pas été possible d'atteindre des taux de sondage homogènes au plan géographique. Ainsi pour les ovins, la région PACA a eu un des plus faibles taux de sondage, même depuis l'introduction du dépistage exhaustif. Les Pyrénées-Atlantiques ont également connu un relativement faible taux de sondage en 2006, ce qui est regrettable car ce département sert par ailleurs d'observatoire pour un certain nombre d'études épidémiologiques [6, 14]. Cela pourrait traduire un problème conjoncturel : le manque de nourriture pendant la période de sécheresse de 2006 ayant pu entraîner une réforme précoce d'une partie des animaux (Corbière F. communication personnelle). On a observé un fort taux de sondage à l'abattoir dans l'Ouest et un fort taux de sondage à l'équarrissage dans le Centre à la fois pour les ovins et les caprins, alors que ce ne sont pas les zones d'élevage de petits ruminants les plus importantes. Il est possible que cela traduise un effet lié aux sites de prélèvements (abattoirs de grande taille dans l'Ouest, site d'équarrissage important dans le Centre).

Au delà des problèmes conjoncturels ne permettant pas d'atteindre les objectifs dans certains départements, il est probable que des biais de sélection des animaux se soient maintenus entre 2002 et 2006, éventuellement dus à un échappement volontaire ou non de la part des éleveurs.

Cette hétérogénéité du taux de sondage dans le temps et l'espace a pour conséquences : i) une estimation moins précise de la prévalence de la tremblante classique dans les zones moins sondées, et donc une estimation biaisée de la prévalence nationale brute [26] sachant que la prévalence de la tremblante classique n'apparaît pas homogène au plan géographique, ii) une sous-estimation de la prévalence de la tremblante classique si un échappement volontaire de la part des éleveurs a lieu. Cependant, cela ne concernerait vraisemblablement qu'un nombre limité d'animaux, car la positivité de l'obex apparaît être précoce par rapport à l'apparition des signes cliniques, iii) un biais supplémentaire dans l'estimation de la prévalence de la tremblante atypique. En effet, l'hétérogénéité géographique des taux de sondage est accentuée par la répartition géographique inégale de l'utilisation des tests rapides capables de la détecter.

Chez les ovins, au cours de la période 2002–2006, la prévalence de la tremblante classique a été en moyenne de $1,8*10^{-4}$ à l'abattoir et de $1,1*10^{-3}$ à l'équarrissage (tableau 2). Elle a donc été supérieure à l'équarrissage d'environ un facteur 5. Ceci est conforme à la plupart des observations faites dans d'autres pays [9, 15, 16]. Cet écart est vraisemblablement imputable aux animaux dont la mort a été causée ou favorisée par les manifestations cliniques de la tremblante classique. Pour la tremblante atypique ovine on n'observe pas de différence de prévalence entre l'abattoir et l'équarrissage. Compte tenu des grands effectifs testés, il est peu probable qu'une différence de l'ordre d'un rapport de 2 ne soit pas détectée en raison d'un défaut de puissance. On peut donc présumer d'une réelle absence de différence de prévalence entre ces deux canaux de surveillance, ce qui est d'ailleurs observé dans la plupart des pays ayant détecté des cas de tremblante atypique [19]. Elle pourrait s'expliquer par l'âge élevé à l'apparition des signes cliniques [1, 24] qui tend à se confondre avec la durée de vie commerciale des animaux.

La prévalence de la tremblante classique ovine présente une diminution significative entre 2002 et 2006 à l'abattoir et à l'équarrissage. Une analyse antérieure de la mise en œuvre du programme de 2002 [26], a fait ressortir des erreurs de classement des animaux en fonction du programme, certains prélèvements issus des mesures prises dans les exploitations atteintes ayant été classés dans le programme équarrissage. Cependant, même en éliminant l'année 2002, la différence de prévalence reste significative (Khi-deux p = $4,55*10^{-5}$) et la tendance à la diminution entre 2003 et 2006 est significative (Khi-deux de tendance p = $3,41*10^{-5}$). Cette diminution de prévalence est possiblement multifactorielle. Elle pourrait s'expliquer par un effet du contrôle de la maladie dans les cheptels atteints, notamment grâce aux restrictions de mouvements et à la recherche des animaux appartenant à la cohorte de naissance du cas. Par ailleurs, il a été montré que certains aliments concentrés avaient pu être une source de contamination pour la tremblante classique [30]. Les mesures de retrait des MRS puis l'interdiction des farines animales auraient contribué à réduire l'exposition alimentaire à la tremblante classique. Compte tenu de la longue période d'incubation de la maladie et de sa relativement faible contagiosité, il est vraisemblable que l'effet de ces mesures puisse se mesurer avec un décalage de quelques années. La diminution de la prévalence peut également s'expliquer par la sélection génétique des animaux résistants et l'élimination des animaux sensibles. Au vu de l'échantillon d'animaux génotypés, l'évolution des fréquences alléliques n'est pas statistiquement significative. Cependant la fréquence de l'allèle ARR augmente et la fréquence de l'allèle VRQ diminue. Cette augmentation de portage de l'allèle ARR est d'ailleurs proche du seuil de significativité pour la race Lacaune (Khi-deux p = 0,06) qui connaît une diminution marquée de la prévalence de tremblante classique (tableau 4 : à l'abattoir Khi-deux p = $1,55*10^{-6}$, Khi-deux de tendance p = $2,23*10^{-7}$; à l'équarrissage Khi-deux p = $8,44*10^{-5}$, Khi-deux de tendance p = $7,02*10^{-6}$). Une évolution récente de la structure génétique ne pourrait être observée que parmi la population la plus jeune, qui n'est actuellement pas testée. Par ailleurs, les élevages sélectionneurs connaissent déjà une évolution favorable de la structure génétique de leur troupeau (avis 2007-SA/052 de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évolution du programme de surveillance des EST chez les petits ruminants au regard du risque ESB pour le consommateur), celle-ci étant d'autant plus rapide que

l'insémination artificielle est pratiquée. Au niveau de la population générale, l'évolution est plus lente.

La prévalence de la tremblante atypique semble plus stable. La faible décroissance observée à l'abattoir pourrait résulter d'un déséquilibre des effectifs testés en 2006 et nécessite d'être confirmée dans l'avenir.

Comme chez les ovins, la prévalence de la tremblante classique chez les caprins est également inférieure à l'abattoir par rapport à l'équarrissage (tableau 2). Sur la période 2002-2006, elle a été en moyenne de $1{,}25*10^{-5}$ à l'abattoir et de $2{,}2*10^{-4}$ à l'équarrissage. Elle a donc été supérieure à l'équarrissage d'environ un facteur 17.

La prévalence de la tremblante atypique chez les caprins est en moyenne de $1{,}21*10^{-4}$ à l'équarrissage ce qui est à peine inférieur à celle des ovins (tableau 2). En revanche à l'abattoir, la prévalence de la tremblante atypique chez les caprins est presque 10 fois plus faible que chez les ovins (respectivement $5{,}18*10^{-5}$ et $6{,}03*10^{-4}$). Toutefois ce rapport est à prendre avec précaution car en 2004 aucun caprin n'a été testé à l'abattoir.

De façon générale les deux formes de tremblante sont rares chez les ovins, elles le sont encore plus chez les caprins.

Conclusion

Le programme de surveillance fait apparaître des différences épidémiologiques entre les différentes formes de tremblante chez les ovins et chez les caprins. Dans le cas de la tremblante classique, une diminution de la prévalence est observée alors qu'une telle tendance ne se manifeste pas dans le cas de la tremblante atypique.

Dans un contexte où la maladie se raréfie, le programme de surveillance et son analyse peuvent s'avérer plus sensibles aux biais de sélection et à la qualité des données. Il serait également souhaitable de pouvoir mettre en relation l'évolution génétique et celle de la prévalence de la tremblante. Cela nécessiterait une augmentation des effectifs d'échantillons d'ADN analysés ou l'observation privilégiée d'une population cible de taille plus restreinte.

Références

1. - EFSA: Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in Small Ruminants. *The EFSA Journal*, 2005, **276**, 1-30.
2. - AFSSA: Avis de l'AFSSA sur l'évolution des mesures de police sanitaire dans les cheptels ovins et caprins où un cas de tremblante classique ou atypique a été détecté. 2007, 1-9.
3. - ANDREOLETTI O., BERTHON P., MARC D., SARRADIN P., GROSCLAUDE J., VAN KEULEN L., SCHELCHER F., ELSEN J. M., LANTIER F.: Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol*, 2000, **81**, 3115-3126.
4. - ANDREOLETTI O., LACROUX C., CHABERT A., MONNEREAU L., TABOURET G., LANTIER F., BERTHON P., EYCHENNE F., LAFOND-BENESTAD S., ELSEN J. M., SCHELCHER F.: PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol*, 2002, **83**, 2607-2616.
5. - ANDREOLETTI O., SIMON S., LACROUX C., MOREL N., TABOURET G., CHABERT A., LUGAN S., CORBIERE F., FERRE P., FOUCRAS G., LAUDE H., EYCHENNE F., GRASSI J., SCHELCHER F.: PrPSc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med*, 2004, **10**, 591-593.
6. - BARILLET F., PALHIÈRE I., J.M. A., BROCHART M., M. B., X. A., F. F., J.M. A., J.P. B., M. B., G. F., C. S., ANDREOLETTI O., CORBIERE F., SCHELCHER F.: Le programme français d'éradication de la tremblante du cheptel ovin fondé sur l'utilisation de la génétique. INRA *Productions Animales*, 2004, **Hors série**, 87-100.
7. - BELT P. B. G. M., MUILHEMAN J. H., SCHREUDER B. E. C., BOS-DE-RUIJTER J., GIELKENS A. L. J., SMITS M. A.: Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. . *J Gen Virol*, 1995, **76**, 509-517.
8. - BENESTAD S. L., SARRADIN P., THU B., SCHÖNHEIT J., TRANULIS M. A., BRATBERG B.: Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type Nor98. *Vet Rec*, 2003, **153**, 202-208.
9. - BIRD S.-M.: European Union's rapid TSE testing in adult cattle and sheep: implementation and results in 2001 and 2002. *Stat. Methods Med Res*, 2003, **12**, 261-278.
10. - BRUCE M. E., WILL R. G., IRONSIDE J. W., MCCONNELL I., DRUMMOND D., SUTTLE A., MCCARDLE L., CHREE A., HOPE J., BIRKETT C., COUSENS S., FRASER H., BOSTOCK C. J.: Transmission to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 1997, **389**, 498-501.
11. - CHELLE P.-L.: Un cas de tremblante chez la chèvre. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 1942, **15**, 294-295.
12. - COLLINGE J., ROSSOR M.: A new variant of prion disease. *The Lancet*, 1996, **347**, 916-917.
13. - COMBER T., MORBORNE H.: A letter to Dr Hunter, physician in York, concerning the rickets in sheep. *Real Improvements in Agriculture, Letters to Reade Peacock.*, 1772, 73-83.
14. - CORBIERE F., BARILLET F., ANDREOLETTI O., FIDELLE F., LAPHITZ-BORDET N., SCHELCHER F., JOLY P.: Advanced survival models for risk-factor analysis in scrapie. *J Gen Virol*, 2007, **88**, 696-705.
15. - DEL RIO VILAS V. J., HOPP P., NUNES T., RU G., SIVAM K., ORTIZ-PELAEZ A.: Explaining the heterogeneous scrapie surveillance figures across Europe: a meta-regression approach. *BMC Vet Res*, 2007, **3**, 13.
16. - DEL RIO VILAS V. J., RYAN J., ELLIOTT H. G., TONGUE S. C., WILESMITH J. W.: Prevalence of scrapie in sheep: results from fallen stock surveys in Great Britain in 2002 and 2003. *Vet Rec*, 2005, **157**, 744-745.
17. - EFSA: Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards of the European Food Safety Authority on the Breeding programme for TSE resistance in sheep. *The EFSA Journal*, 2006, **382**, 1-46.
18. - ELOIT M., ADJOU K., COULPIER M., FONTAINE J. J., HAMEL R., LILIN T., MESSIAEN S., ANDREOLETTI O., BARON T., BENCSIK A., BIACABE A.-G., BERINGUE V., LAUDE H., LE DUR A., VILOTTE J.-L., COMOY E., DESLYS J.-P., GRASSI J., SIMON S., LANTIER F., SARRADIN P.: BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec*, 2005, **156**, 523-524.
19. - FEDIAEVSKY A., TONGUE S., NÖREMARK M., HOPP P.: Atypical and classical scrapie in sheep: prevalence estimates from healthy slaughter and fallen stock surveillance programmes in 20 European countries. Neuroprion 2007, Edinburgh, Scotland, 2007.
20. - FOSTER J. D., HOPE J., FRASER H.: Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Rec*, 1993, **133**, 339-341.
21. - HOPP P., OMER M. K., HEIER B. T.: A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. *J Gen Virol*, 2006, **87**, 3729-3736.
22. - KONOLD T., DAVIS A., BONE G., BRACEGIRDLE J., EVERITT S., CHAPLIN M., SAUNDERS G. C., CAWTHRAW S., SIMMONS M. M.: Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report. *BMC Vet Res*, 2007, **3**, 2.

23. - LE DUR A., BERINGUE V., ANDREOLETTI O., REINE F., LAI T. L., BARON T., BRATBERG B., VILOTTE J.-L., SARRADIN P., BENESTAD S. L., LAUDE H.: A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *PNAS*, 2005, **102**, 16031-16036.

24. - LUHKEN G., BUSCHMANN A., BRANDT H., EIDEN M., GROSCHUP M. H., ERHARDT G.: Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Vet Res*, 2007, **38**, 65-80.

25. - MORENO C. R., MOAZAMI-GOUDARZI K., LAURENT P., CAZEAU G., ANDREOLETTI O., CHADI S., ELSEN J. M., CALAVAS D.: Which PrP haplotypes in a French sheep population are the most susceptible to atypical scrapie? *Arch Virol*, 2007, **152**, 1229-1232.

26. - MORIGNAT E., CAZEAU G., BIACABE A. G., VINARD J. L., BENCSIK A., MADEC J. Y., DUCROT C., BARON T., CALAVAS D.: Estimates of the prevalence of transmissible spongiform encephalopathies in sheep and goats in France in 2002. *Vet Rec*, 2006, **158**, 683-687.

27. - MOUM T., OLSAKER I., HOPP P., MOLDAL T., VALHEIM M., BENESTAD S. L.: Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol*, 2005, **86**, 231-235.

28. - NÖREMARK M., HOPP P.: Reported occurence of Atypical Scrapie in Europe. 11th Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Cairns, 2006, 1-3.

29. - ONNASCH H., GUNN H. M., BRADSHAW B. J., BENESTAD S. L., BASSETT H. F.: Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Vet Rec*, 2004, **155**, 636-637.

30. - PHILIPPE S., DUCROT C., ROY P., REMONTET L., JARRIGE N., CALAVAS D.: Sheep Feed and Scrapie, France. **EID**, 2005, **11**, 1274-1279.

31. - SIMMONS M. M., KONOLD T., SIMMONS H. A., SPENCER Y. I., LOCKEY R., SPIROPOULOS J., EVERITT S., CLIFFORD D.: Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Vet Res*, 2007, **3**, 20.

32. - WELLS G. A. H., SCOTT A. C., JOHNSON C. T., GUNNING R. F., HANCOCK R. D., JEFFREY M., DAWSON M., BRADLEY R.: A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, 1987, **121**, 419-420.

33. - WILL R. G., IRONSIDE J. W., ZEIDLER M., COUSENS S. N., ESTIBEIRO K., ALPEROVITCH A., POSER S., POCCHIARI M., HOFMAN A., SMITH P. G.: A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet*, 1996, **347**, 921-925.

Fichier additionnel de l'article 1 : détails des prévalences de tremblante atypique et de tremblante classique estimées dans les différents pays européens

Description: Provide the number of samples analysed, number of cases and prevalence estimates for each country, each year and each surveillance stream.

Country	Year	Stream	Test	Tests	AS	ASPE (‰)	ASPE CI 95%	CS	CSPE (‰)	CSPE CI 95%
Basque Country (Spain)	2002	Fallen	Enfer-test	98	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 36,9
		Healthy	Enfer-test	663	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 5,5
	2003	Fallen	Enfer-test	66	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 54,4
			Prionics-Check LIA test	179	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 20,4
		Healthy	Enfer-test	532	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 6,9
			Prionics-Check LIA test	293	0	NA	NA	1	3.41	0.0 - 18,9
	2004	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	275	2	7.27	0.1 - 26,0	0	0.0	0.0 - 13,3
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	457	0	0.0	0.0 - 8,0	0	0.0	0.0 - 8,0
	2005	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	208	0	0.0	0.0 - 17,6	0	0.0	0.0 - 17,6
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	289	1	3.46	0.0 - 19,1	0	0.0	0.0 - 12,7
	2006	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	175	0	0.0	0.0 - 20,9	0	0.0	0.0 - 20,9
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	500	0	0.0	0.0 - 7,4	0	0.0	0.0 - 7,4
Belgium	2002	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	780	0	0.0	0.0 - 4,7	2	2.56	0.0 - 9,2
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	2195	1	0.46	0.0 - 2,5	0	0.0	0.0 - 1,7
	2003	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	499	0	0.0	0.0 - 7,4	2	4.01	0.0 - 14,4
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	2447	0	0.0	0.0 - 1,5	0	0.0	0.0 - 1,5
	2004	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	1650	1	0.61	0.0 - 3,4	2	1.21	0.0 - 4,4
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	39	0	0.0	0.0 - 90,3	1	25.64	0.1 - 134,8
	2005	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	1588	2	1.26	0.0 - 4,5	0	0.0	0.0 - 2,3
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	703	0	0.0	0.0 - 5,2	0	0.0	0.0 - 5,2

Cyprus (TSE positive)	2003	Fallen	Prionics Check Western test & Prionics-Check LIA test	114	0	NA	NA	28	245.61	17.0 - 335,1
	2004	Fallen	Prionics-Check LIA test	93	0	NA	NA	24	258.06	17.3 - 359,2
		Healthy	Prionics-Check LIA test	212	0	NA	NA	32	150.94	10.6 - 206,4
	2005	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	5	0	0.0	0.0 - 521,8	0	0.0	0.0 - 521,8
			Prionics-Check LIA test	41	0	NA	NA	14	341.46	20.1 - 505,9
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	382	0	0.0	0.0 - 9,6	33	86.39	6.0 - 119,2
			Prionics-Check LIA test	1499	0	NA	NA	81	54.04	4.3 - 66,7
	2006	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	42	0	0.0	0.0 - 84,1	1	23.81	0.1 - 125,7
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	4240	0	0.0	0.0 - 0,9	346	81.60	7.4 - 90,3
Czech Republic	2002	Fallen	Enfer TSE Kit version 2.0	228	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 24,2
			Prionics Check Western test	657	0	NA	NA	1	4.39	0.0 - 5,6
		Healthy	Enfer TSE Kit version 2.0	51	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 69,8
			Prionics Check Western test	183	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 20,0
	2003	Fallen	Enfer TSE Kit version 2.0	618	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 6,0
			Prionics Check Western test	1729	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 2,1
			Prionics-Check LIA test	14	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 231,6
		Healthy	Enfer TSE Kit version 2.0	151	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 36,3
			Prionics Check Western test	413	0	NA	NA	1	6.62	0.0 - 8,9
			Prionics-Check LIA test	14	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 231,6
	2004	Fallen	Enfer TSE Kit version 2.0	56	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 63,8
			Prionics Check Western test	800	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 4,6
			Prionics-Check LIA test	50	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 71,1
		Healthy	Enfer TSE Kit version 2.0	5	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 521,8
			Prionics Check Western test	39	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 90,3
			Prionics-Check LIA test	14	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 231,6
	2005	Fallen	Enfer TSE Kit version 2.0	94	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 38,5
			Prionics Check Western test	257	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 14,3
			Prionics-Check LIA test	8	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 369,4
		Healthy	Enfer TSE Kit version 2.0	72	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 75,0

			Prionics Check Western test	15	0	NA	NA	1	13.89	0.0 - 218,0
			Prionics-Check LIA test	1	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 975,0
	2006	Fallen	Enfer TSE Kit version 2.0	15	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 218,0
			Prionics Check PrioSTRIP	6	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 459,3
			Prionics-Check Lia Small Ruminant	3	0	0.0	0.0 - 707,6	0	0.0	0.0 - 707,6
			Prionics-Check Western Small Ruminant test	38	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 92,5
		Healthy	Enfer TSE Kit version 2.0	29	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 119,4
			Prionics-Check LIA test	1	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 975,0
Denmark	2002	Fallen	Prionics Check Western test	409	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 9,0
		Healthy	Enfer-test	30	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 115,7
			Prionics Check Western test	571	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 6,4
	2003	Fallen	Prionics Check Western test	1104	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 3,3
		Healthy	Enfer-test	310	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 11,8
			Prionics Check Western test	531	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 6,9
	2004	Fallen	Prionics Check Western test	5214	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 0,7
		Healthy	Enfer-test	15	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 218,0
			Prionics Check Western test	57	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 62,7
	2005	Fallen	Prionics Check Western test	4297	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 0,9
		Healthy	Enfer-test	37	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 94,9
			Prionics Check Western test	44	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 80,4
	2006	Fallen	Idexx HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit, EIA	1912	2	1.05	0.0 - 3,8	0	0.0	0.0 - 1,9
			Prionics Check Western test	2426	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 1,5
		Healthy	Idexx HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit, EIA	2440	1	0.41	0.0 - 2,3	0	0.0	0.0 - 1,5
			Prionics Check Western test	1250	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 2,9
Estonia	2002	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	18	0	0.0	0.0 - 185,3	0	0.0	0.0 - 185,3
	2003	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	10	0	0.0	0.0 - 308,5	0	0.0	0.0 - 308,5
	2004	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	56	0	0.0	0.0 - 63,8	0	0.0	0.0 - 63,8

		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	354	0	0.0	0.0 - 10,4	0	0.0	0.0 - 10,4
	2005	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	281	0	0.0	0.0 - 13,0	0	0.0	0.0 - 13,0
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	970	0	0.0	0.0 - 3,8	0	0.0	0.0 - 3,8
	2006	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	415	0	0.0	0.0 - 8,8	0	0.0	0.0 - 8,8
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	1988	0	0.0	0.0 - 1,9	0	0.0	0.0 - 1,9
Finland	2002	Fallen	Prionics Check Western test	349	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 10,5
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	2053	0	0.0	0.0 - 1,8	0	0.0	0.0 - 1,8
	2003	Fallen	Prionics Check Western test	685	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 5,4
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	1989	0	0.0	0.0 - 1,9	0	0.0	0.0 - 1,9
	2004	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	807	1	1.24	0.0 - 6,9	0	0.0	0.0 - 4,6
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	498	0	0.0	0.0 - 7,4	0	0.0	0.0 - 7,4
	2005	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	902	1	1.11	0.0 - 6,2	0	0.0	0.0 - 4,1
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	392	0	0.0	0.0 - 9,4	0	0.0	0.0 - 9,4
	2006	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	672	1	1.49	0.0 - 8,3	0	0.0	0.0 - 5,5
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	184	0	0.0	0.0 - 19,8	0	0.0	0.0 - 19,8
France	2002	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	3873	4	1.03	0.0 - 2,6	28	7.23	0.5 - 10,4
			Prionics Check Western test	13570	0	NA	NA	76	5.60	0.4 - 7,0
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	14652	11	0.75	0.0 - 1,3	13	0.89	0.0 - 1,5
			Prionics Check Western test	19042	0	NA	NA	3	0.16	0.0 - 0,5
	2003	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	5627	7	1.24	0.1 - 2,6	14	2.49	0.1 - 4,2
			Prionics Check Western test	12997	0	NA	NA	27	2.08	0.1 - 3,0
			Prionics-Check LIA test	273	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 13,4
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	25511	22	0.86	0.1 - 1,3	10	3.9	0.0 - 0,7
			Prionics Check Western test	18606	0	NA	NA	9	0.48	0.0 - 0,9
			Prionics-Check LIA test	193	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 18,9
	2004	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	5207	2	0.38	0.0 - 1,4	7	1.34	0.1 - 2,8
			Enfer-test	119	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 30,5
			Prionics Check Western test	5142	0	NA	NA	8	1.56	0.1 - 3,1
			Prionics-Check LIA test	1797	0	NA	NA	4	2.23	0.1 - 5,7
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	8373	7	0.84	0.0 - 1,7	4	0.48	0.0 - 1,2

			Enfer-test	21	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 161,1
			Prionics Check Western test	2846	0	NA	NA	2	0.70	0.0 - 2,5
			Prionics-Check LIA test	1148	0	NA	NA	1	0.87	0.0 - 4,8
	2005	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	7999	5	0.63	0.0 - 1,5	13	1.63	0.1 - 2,8
			Enfer-test	222	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 16,5
			Prionics Check Western test	8130	0	NA	NA	13	1.60	0.1 - 2,7
			Prionics-Check LIA test	5758	0	NA	NA	3	0.52	0.0 - 1,5
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	7554	8	1.06	0.0 - 2,1	2	0.26	0.0 - 1,0
			Enfer-test	162	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 22,5
			Prionics Check PrioSTRIP	3	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 707,6
			Prionics Check Western test	3405	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 1,1
			Prionics-Check LIA test	1057	0	NA	NA	1	0.95	0.0 - 5,3
	2006	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	89277	67	0.75	0.1 - 1,0	67	0.75	0.1 - 1,0
			Enfer-test	1457	0	NA	NA	2	1.37	0.0 - 4,9
			Idexx HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit, EIA	21762	15	0.69	0.0 - 1,1	16	0.74	0.0 - 1,2
			Prionics Check Western test	73391	0	NA	NA	55	0.75	0.1 - 1,0
			Prionics-Check LIA test	42825	0	NA	NA	21	0.49	0.0 - 0,7
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	172965	99	0.57	0.0 - 0,7	9	0.05	0.0 - 0,1
			Enfer TSE Kit version 2.0	183	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 20,0
			Idexx HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit, EIA	23095	9	0.39	0.0 - 0,7	1	0.04	0.0 - 0,2
			Prionics Check PrioSTRIP	7	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 409,6
			Prionics Check Western test	44158	0	NA	NA	9	0.20	0.0 - 0,4
			Prionics-Check LIA test	22903	0	NA	NA	2	0.09	0.0 - 0,3
Great Britain	2002	Fallen	Prionics Check Western test	903	0	NA	NA	7	7.75	0.3 - 15,9
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	15797	18	1.14	0.1 - 1,8	17	1.08	0.1 - 1,7
			Prionics Check Western test	14318	0	NA	NA	17	1.19	0.1 - 1,9
	2003	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	2759	7	2.54	0.1 - 5,2	8	2.90	0.1 - 5,7
			Prionics Check Western test	1300	0	NA	NA	4	3.08	0.1 - 7,9

		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	64139	45	0.70	0.1 - 0,9	35	0.55	0.0 - 0,8
			Prionics Check Western test	7111	0	NA	NA	11	1.55	0.1 - 2,8
	2004	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	4371	4	0.92	0.0 - 2,3	12	2.75	0.1 - 4,8
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	10588	12	1.13	0.1 - 2,0	9	0.85	0.0 - 1,6
	2005	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	8278	6	0.72	0.0 - 1,6	26	3.14	0.2 - 4,6
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	11106	16	1.44	0.1 - 2,3	12	1.08	0.1 - 1,9
	2006	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	18864	12	0.64	0.0 - 1,1	33	1.75	0.1 - 2,5
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	46259	35	0.76	0.1 - 1,1	8	0.17	0.0 - 0,3
Iceland	2002	Fallen	Histopathology and/or Immunohistochemistry	10	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 308,5
		Healthy	Histopathology and/or Immunohistochemistry	5538	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 0,7
	2003	Fallen	Histopathology and/or Immunohistochemistry	10	0	NA	NA	1	100.00	0.3 - 445,0
		Healthy	Histopathology and/or Immunohistochemistry	5124	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 0,7
	2004	Fallen	Histopathology and/or Immunohistochemistry	10	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 308,5
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	2984	1	0.34	0.0 - 1,9	2	0.67	0.0 - 2,4
			Histopathology and/or Immunohistochemistry	5779	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 0,6
	2005	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	33	0	0.0	0.0 - 105,8	1	30.30	0.1 - 157,6
			Histopathology and/or Immunohistochemistry	10	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 308,5
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	2425	0	0.0	0.0 - 1,5	0	0.0	0.0 - 1,5
			Histopathology and/or Immunohistochemistry	866	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 4,3
	2006	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	8	0	0.0	0.0 - 369,4	0	0.0	0.0 - 369,4
			BioRad TeSeE Sheep/Goat test	52	0	0.0	0.0 - 68,5	1	19.23	0.0 - 102,6
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	2899	0	0.0	0.0 - 1,3	0	0.0	0.0 - 1,3

			BioRad TeSeE Sheep/Goat test	768	0	0.0	0.0 - 4,8	0	0.0	0.0 - 4,8
Ireland	2002	Fallen	Enfer-test	5222	0	NA	NA	33	6.32	0.4 - 8,9
		Healthy	Enfer-test	54813	0	NA	NA	13	0.24	0.0 - 0,4
	2003	Fallen	Enfer-test	2649	0	NA	NA	18	6.80	0.4 - 10,7
			Prionics Check Western test & Prionics-Check LIA test	199	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 18,4
		Healthy	Enfer-test	51588	0	NA	NA	9	0.17	0.0 - 0,3
	2004	Fallen	Enfer-test	8982	0	NA	NA	29	3.23	0.2 - 4,6
			Prionics Check Western test & Prionics-Check LIA test	650	0	NA	NA	8	12.31	0.5 - 24,1
		Healthy	Enfer-test	10686	0	NA	NA	5	0.47	0.0 - 1,1
	2005	Fallen	Enfer TSE Kit version 2.0	9220	0	NA	NA	21	2.28	0.1 - 3,5
			Prionics Check Western test & Prionics-Check LIA test	1154	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 3,2
		Healthy	Enfer TSE Kit version 2.0	10689	0	NA	NA	1	0.09	0.0 - 0,5
	2006	Fallen	Enfer TSE Kit version 2.0	12492	0	NA	NA	34	2.72	0.2 - 3,8
			Prionics Check Western test & Prionics-Check LIA test	1185	0	NA	NA	2	1.69	0.0 - 6,1
		Healthy	Enfer TSE Kit version 2.0	41677	0	NA	NA	9	0.22	0.0 - 0,4
Italy	2002	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	98	0	0.0	0.0 - 36,9	0	0.0	0.0 - 36,9
			Enfer-test	1	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 975,0
			Prionics Check Western test	2630	0	NA	NA	15	5.70	0.3 - 9,4
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	1814	0	0.0	0.0 - 2,0	3	1.65	0.0 - 4,8
			Enfer-test	316	0	NA	NA	3	9.49	0.2 - 27,5
			Prionics Check Western test	18375	0	NA	NA	14	0.76	0.0 - 1,3
	2003	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	12	0	0.0	0.0 - 264,6	0	0.0	0.0 - 264,6
			Enfer-test	190	0	NA	NA	1	5.26	0.0 - 29,0
			Prionics Check Western test	4820	0	NA	NA	12	2.49	0.1 - 4,3
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	217	0	0.0	0.0 - 16,9	0	0.0	0.0 - 16,9
			Enfer-test	4435	0	NA	NA	3	0.68	0.0 - 2,0

			Prionics Check Western test	30212	0	NA	NA	11	0.36	0.0 - 0,7
	2004	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	311	0	0.0	0.0 - 11,8	0	0.0	0.0 - 11,8
			Enfer-test	1368	0	NA	NA	2	1.46	0.0 - 5,3
			Prionics Check Western test	3229	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 2,2
			Prionics-Check LIA test	459	0	NA	NA	2	0.62	0.0 - 8,0
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	184	0	0.0	0.0 - 19,8	0	0.0	0.0 - 19,8
			Enfer-test	3548	0	NA	NA	3	0.85	0.0 - 2,5
			Prionics Check Western test	11357	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 1,0
			Prionics-Check LIA test	1868	0	NA	NA	5	0.44	0.0 - 2,0
	2005	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	6295	2	0.32	0.0 - 1,1	13	2.07	0.1 - 3,5
			Enfer-test	685	0	NA	NA	1	1.46	0.0 - 8,1
			Prionics Check Western test	372	0	NA	NA	1	0.96	0.0 - 9,9
			Prionics-Check LIA test	1046	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 5,3
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	9622	4	0.42	0.0 - 1,1	3	0.31	0.0 - 0,9
			Enfer-test	1979	0	NA	NA	2	1.01	0.0 - 3,6
			Prionics Check Western test	471	0	NA	NA	1	0.46	0.0 - 7,8
			Prionics-Check LIA test	2153	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 2,6
	2006	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	7122	4	0.56	0.0 - 1,4	25	3.51	0.2 - 5,2
			Enfer-test	857	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 4,3
			Prionics-Check LIA test	1248	0	NA	NA	2	1.60	0.0 - 5,8
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	27632	12	0.43	0.0 - 0,8	7	0.25	0.0 - 0,5
			Enfer-test	5939	0	NA	NA	1	0.17	0.0 - 0,9
			Prionics-Check LIA test	5182	0	NA	NA	5	0.96	0.0 - 2,3
Lithuania	2002	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	10	0	0.0	0.0 - 308,5	0	0.0	0.0 - 308,5
			Enfer-test	8	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 369,4
			Histopathology and/or Immunohistochemistry	2	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 841,9
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	18	0	0.0	0.0 - 185,3	0	0.0	0.0 - 185,3
			Enfer-test	14	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 231,6
			Histopathology and/or	7	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 409,6

			Immunohistochemistry							
	2003	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	31	0	0.0	0.0 - 112,2	0	0.0	0.0 - 112,2
			Enfer-test	4	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 602,4
			Histopathology and/or Immunohistochemistry	4	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 602,4
	2004	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	33	0	0.0	0.0 - 105,8	0	0.0	0.0 - 105,8
			Enfer-test	4	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 602,4
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	191	0	0.0	0.0 - 19,1	0	0.0	0.0 - 19,1
			Enfer-test	3	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 707,6
	2005	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	28	0	0.0	0.0 - 123,4	0	0.0	0.0 - 123,4
			Enfer TSE Kit version 2.0	49	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 72,5
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	457	0	0.0	0.0 - 8,0	0	0.0	0.0 - 8,0
			Enfer TSE Kit version 2.0	489	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 7,5
	2006	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	120	0	0.0	0.0 - 30,3	0	0.0	0.0 - 30,3
			Enfer TSE Kit version 2.0	56	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 63,8
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	1104	0	0.0	0.0 - 3,3	0	0.0	0.0 - 3,3
			Enfer TSE Kit version 2.0	721	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 5,1
Netherlands	2002	Fallen	Prionics Check Western test	3864	0	NA	NA	12	3.11	0.2 - 5,4
		Healthy	Prionics Check Western test	19642	0	NA	NA	27	1.37	0.1 - 2,0
	2003	Fallen	Prionics Check Western test	3994	0	NA	NA	7	1.75	0.1 - 3,6
		Healthy	Prionics Check Western test	20944	0	NA	NA	44	2.10	0.2 - 2,8
	2004	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	1000	0	0.0	0.0 - 3,7	2	2.00	0.0 - 7,2
			Prionics Check Western test	10134	0	NA	NA	26	2.57	0.2 - 3,8
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	1000	0	0.0	0.0 - 3,7	1	1.00	0.0 - 5,6
			Prionics Check Western test	8851	0	NA	NA	12	1.36	0.1 - 2,4
	2005	Fallen	Prionics Check Western test	10192	0	NA	NA	24	2.35	0.2 - 3,5
			Prionics-Check Western Blot modified	7541	1	0.13	0.0 - 0,7	19	2.52	0.2 - 3,9
		Healthy	Prionics Check Western test	9111	0	NA	NA	14	1.54	0.1 - 2,6
			Prionics-Check Western Blot modified	5988	1	0.17	0.0 - 0,9	11	1.84	0.1 - 3,3
	2006	Fallen	Prionics Check Western test	5501	0	NA	NA	13	2.36	0.1 - 4,0

			Prionics-Check Western Small Ruminant test	1544	0	0.0	0.0 - 2,4	3	1.94	0.0 - 5,7
		Healthy	Prionics Check Western test	3839	0	NA	NA	4	1.04	0.0 - 2,7
			Prionics-Check Western Small Ruminant test	2490	0	0.0	0.0 - 1,5	1	0.40	0.0 - 2,2
Northern Ireland	2002	Fallen	Enfer-test	519	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 7,1
		Healthy	Enfer-test	1438	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 2,6
	2003	Fallen	Enfer test and BioRad TeSeE	1067	0	NA	NA	1	0.94	0.0 - 5,2
		Healthy	Enfer test and BioRad TeSeE	1268	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 2,9
	2004	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	725	0	0.0	0.0 - 5,1	0	0.0	0.0 - 5,1
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	715	0	0.0	0.0 - 5,1	0	0.0	0.0 - 5,1
	2005	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	1489	0	0.0	0.0 - 2,5	1	0.67	0.0 - 3,7
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	710	0	0.0	0.0 - 5,2	2	2.82	0.0 - 10,1
	2006	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	2341	1	0.43	0.0 - 2,4	2	0.85	0.0 - 3,1
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	2716	1	0.37	0.0 - 2,0	0	0.0	0.0 - 1,4
Norway	2002	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	1822	3	1.65	0.0 - 4,8	0	0.0	0.0 - 2,0
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	13552	3	0.22	0.0 - 0,6	0	0.0	0.0 - 0,3
	2003	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	3357	8	2.38	0.1 - 4,7	0	0.0	0.0 - 1,1
			Histopathology and/or Immunohistochemistry	6	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 459,3
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	33523	5	0.15	0.0 - 0,3	0	0.0	0.0 - 0,1
	2004	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	3367	4	1.19	0.0 - 3,0	0	0.0	0.0 - 1,1
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	10462	8	0.76	0.0 - 1,5	0	0.0	0.0 - 0,4
	2005	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	3622	1	0.28	0.0 - 1,5	0	0.0	0.0 - 1,0
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	10889	2	0.18	0.0 - 0,7	0	0.0	0.0 - 0,3
	2006	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	104	0	0.0	0.0 - 34,8	0	0.0	0.0 - 34,8
			BioRad TeSeE Sheep/Goat test	4492	4	0.89	0.0 - 2,3	1	0.22	0.0 - 1,2
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	657	0	0.0	0.0 - 5,6	0	0.0	0.0 - 5,6
			BioRad TeSeE Sheep/Goat test	9653	4	0.41	0.0 - 1,1	0	0.0	0.0 - 0,4
Portugal	2002	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	318	0	0.0	0.0 - 11,5	0	0.0	0.0 - 11,5

		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	1276	0	0.0	0.0 - 2,9	0	0.0	0.0 - 2,9
	2003	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	278	0	0.0	0.0 - 13,2	0	0.0	0.0 - 13,2
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	10801	1	0.09	0.0 - 0,5	0	0.0	0.0 - 0,3
	2004	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	1336	2	1.50	0.0 - 5,4	0	0.0	0.0 - 2,8
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	42753	26	0.61	0.0 - 0,9	0	0.0	0.0 - 0,1
	2005	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	20981	25	1.19	0.1 - 1,8	0	0.0	0.0 - 0,2
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	51285	32	0.62	0.0 - 0,9	0	0.0	0.0 - 0,1
	2006	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	8880	11	1.24	0.1 - 2,2	0	0.0	0.0 - 0,4
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	53748	52	0.97	0.1 - 1,3	0	0.0	0.0 - 0,1
Slovenia	2003	Fallen	Enfer TSE Kit version 2.0	201	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 18,2
			Prionics Check Western test	315	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 11,6
		Healthy	Enfer TSE Kit version 2.0	51	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 69,8
	2004	Fallen	Enfer TSE Kit version 2.0	834	0	NA	NA	12	14.39	0.7 - 25,0
			Prionics Check Western test	93	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 38,9
		Healthy	Enfer TSE Kit version 2.0	140	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 26,0
	2005	Fallen	Enfer TSE Kit version 2.0	1599	0	NA	NA	37	23.14	1.6 - 31,8
			Prionics Check Western test	164	0	NA	NA	1	6.10	0.0 - 33,5
		Healthy	Enfer TSE Kit version 2.0	215	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 17,0
			Prionics Check Western test	9	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 336,3
	2006	Fallen	Enfer TSE Kit version 2.0	1123	0	NA	NA	10	8.90	0.4 - 16,3
		Healthy	Enfer TSE Kit version 2.0	77	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 46,8
Sweden	2002	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	1259	0	0.0	0.0 - 2,9	0	0.0	0.0 - 2,9
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	3992	0	0.0	0.0 - 0,9	0	0.0	0.0 - 0,9
	2003	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	2974	2	0.67	0.0 - 2,4	0	0.0	0.0 - 1,2
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	5176	2	0.39	0.0 - 1,4	0	0.0	0.0 - 0,7
	2004	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	3050	2	0.66	0.0 - 2,4	0	0.0	0.0 - 1,2
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	166	0	0.0	0.0 - 22,0	0	0.0	0.0 - 22,0
	2005	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	3176	1	0.31	0.0 - 1,8	0	0.0	0.0 - 1,2
		Healthy	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	2	0	0.0	0.0 - 841,9	0	0.0	0.0 - 841,9
	2006	Fallen	BioRad Platelia test and BioRad TeSeE	3712	3	0.81	0.0 - 2,4	0	0.0	0.0 - 1,0

Switzerland	2002	Fallen	Histopathology and/or Immunohistochemistry	53	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 67,2
	2003	Fallen	Histopathology and/or Immunohistochemistry	28	0	NA	NA	0	0.0	0.0 - 123,4
	2004	Fallen	Prionics-Check Western Small Ruminant and BioRad TeSeE Sheep/Goat test	2372	2	0.84	0.0 - 3,0	0	0.0	0.0 - 1,6
		Healthy	BioRad TeSeE Sheep/Goat test	16774	1	0.06	0.0 - 0,3	1	0.06	0.0 - 0,3
			Prionics-Check Western Small Ruminant test	16568	2	0.12	0.0 - 0,4	0	0.0	0.0 - 0,2

Questionnaire de l'enquête cas-témoins

Questionnaire d'enquête n° |__|__|__|

ETUDE DES FACTEURS DE RISQUE DE LA TREMBLANTE ATYPIQUE

Raison sociale ou nom de l'exploitant

|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|

Date de visite |__|__| |__|__| **2007**

Campagne de naissance de l'animal référence « C_0 » |__|__|__|__|

ATTENTION : NE COMMENCER A RENSEIGNER LE QUESTIONNAIRE QU'APRES AVOIR RENSEIGNE LA FICHE INTITULEE "FICHE D'INCLUSION" !

INFORMATIONS SUR L'ELEVAGE

1. FORMATION
Avez-vous (ou un de vos associés) suivi une formation agricole de niveau bac (professionnel ou général) ou d'un niveau plus élevé ?
Oui ❑ Non ❑

2. ANNEE DE DEBUT D'EXPLOITATION DU TROUPEAU
Depuis quelle année vous occupez-vous de ce troupeau ? |__|__|__|__|

3. ORIGINE DU TROUPEAU
Quelle est l'origine du troupeau ? *(plusieurs réponses possibles)*
Familiale ❑ Extérieure à la famille ❑

4. RACES PRESENTES
4.1 Quelles sont les races présentes dans le troupeau ?
(si plus de 6 races pures ou croisées sont présentes, n'indiquer que les plus fréquentes)
|__|__| |__|__| |__|__| |__|__| |__|__| |__|__|

4.2 Quelle est la dominante raciale du troupeau ? |__|__|

DONNEES STRUCTURELLES

5. NOMBRE DE FEMELLES REPRODUCTRICES
Combien avez-vous mis de femelles à la reproduction lors de la Campagne C_{2006} et de la Campagne C_0 ?

Compter séparément les brebis (femelles ayant déjà mis bas) et les agnelles (femelles n'ayant pas encore mis bas).

5.1 Campagne C_{2006} Brebis |__|__|__|__| Agnelles |__|__|__|__|

5.2 Campagne C_0 Brebis |__|__|__|__| Agnelles |__|__|__|__|

6. NOMBRE DE REFORMES
Combien avez-vous réformé de femelles ayant déjà mis bas durant la Campagne C_{2006} ? |__|__|__|__|

7. NOMBRE DE MORTS
Combien de femelles ayant déjà mis bas sont mortes durant la Campagne C_{2006} ? |__|__|__|__|

▸ **PRODUCTION**

8. VOCATION DE L'ELEVAGE

8.1 Quelle était la vocation commerciale de l'exploitation pour la Campagne C_0 ?

Laitière (ou fromagère) ❑ Allaitante ❑ Mixte ❑ (co-existence de deux troupeaux)

8.2 Quelle était la vocation commerciale de l'exploitation pour la Campagne C_{2006} ?

Laitière (ou fromagère) ❑ Allaitante ❑ Mixte ❑ (co-existence de deux troupeaux)

8.3 Si vous avez changé, au cours de quelle Campagne a eu lieu le changement ? |_|_|_|_|

9. VENTE DE REPRODUCTEURS

Entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{2005}, avez-vous vendu des reproducteurs ?

Répondez <u>oui</u> si une des propositions suivantes est vérifiée :

- Vous avez vendu à plusieurs reprises des ovins (mâles ou femelles) à des élevages ou des groupements pour la reproduction ;
- Vous avez envoyé des animaux en centre de sélection.

Oui ❑ Non ❑

10. GROUPEMENT DE PRODUCTEURS

10.1 Entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{2006}, avez-vous été adhérent d'un groupement de producteurs ?

Oui ❑ Non ❑

10.2 Si <u>oui</u>, lequel (lesquels) *(Inscrire le nom des groupements ; en cas de changement de nom d'un groupement de producteurs mettre les deux noms et les relier par une flèche).*

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

11. AGRICULTURE BIOLOGIQUE

Entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{2005}, avez-vous été en agriculture biologique ou êtes-vous en cours de conversion vers l'agriculture biologique ?

Oui ❑ Non ❑

12. CONTROLE SANITAIRE OFFICIEL DE LA TREMBLANTE

Entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{2005}, avez-vous participé au Contrôle Sanitaire Officiel de la tremblante (CSO) ?

Oui ❑ Non ❑

13. SUIVI D'ELEVAGE

Entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{2005}, avez-vous fait l'objet d'un suivi d'élevage ?

Répondez <u>oui</u> si une des propositions suivantes est vérifiée :

- Vous avez participé au contrôle laitier ;
- Vous avez participé à un suivi technique et économique ;
- Vous avez participé à un suivi sanitaire de performance ;
- Vous avez participé à une autre forme régulière d'audit / conseil.

Oui ❑ Non ❑

▸ **INTRODUCTIONS ET CONTACTS**

14. ACHATS DE MALES

14.1 Entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{2006}, avez-vous acheté des mâles ?

Répondez <u>oui</u> si vous avez acheté, pour la reproduction, des agneaux mâles, des antenais ou des béliers.

Oui ❑ Non ❑

14.2 Si <u>oui</u>, de combien d'élevages différents provenaient-ils ? (période C_0 – C_{2006}) |_|_|

14.3 En tout, combien avez-vous acheté de mâles pendant les Campagnes C_{2004} et C_{2005} ? |_|_|_|_|

15. ACHATS DE FEMELLES

15.1 Entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{2006}, avez-vous acheté des femelles ?

Répondez <u>oui</u> si vous avez acheté, pour la reproduction, des agnelles, des antenaises ou des brebis.

Oui ❑ Non ❑

15.2 Si <u>oui</u>, de combien d'élevages différents provenaient-elles ? (période C_0 – C_{2006}) |_|_|

15.3 En tout, combien avez-vous acheté de femelles pendant les Campagnes C_{2004} et C_{2005} ? |_|_|_|_|

16. CONTACTS OCCASIONNELS

Y a-t-il eu des contacts occasionnels avec d'autres troupeaux entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{2006} ?

Répondez <u>oui</u> si une des propositions suivantes est vérifiée :

- Des animaux de votre troupeau sont partis en transhumance avec des animaux provenant d'autres troupeaux ;
- Vous avez eu des pâturages ou des parcours communs (vos animaux étant présents en même temps que ceux provenant d'autres troupeaux) ;
- Vous avez pris des animaux en pension ou vous avez mis des animaux en pension chez un autre éleveur.

Oui ❑ Non ❑

ALIMENTATION

17. LACTOREMPLACEURS

17.1 L'animal référence a t-il reçu des lactoremplaceurs?

Jamais ☐ Occasionnellement ☐ Toujours ☐

17.2 Si oui, pouvez-vous indiquer le nom du ou des produit(s) en vous appuyant dans la mesure du possible sur les factures ?

Lactoremplaceur F

_____ ☐

_____ ☐

_____ ☐

18. COMPOSANTS ALIMENTAIRES

Quels ont été les aliments distribués à l'animal référence pendant les Campagnes C_0, C_{0+1} et C_{0+2} ? (dans la mesure du possible se reporter aux factures)

Type d'aliment	C_0	C_{0+1}	C_{0+2}
• Paille	☐	☐	☐
• Foin	☐	☐	☐
• Ensilage herbe	☐	☐	☐
• Ensilage maïs	☐	☐	☐
• Grains (céréales)	☐	☐	☐
• Tourteaux	☐	☐	☐
• Drêches	☐	☐	☐
• Pulpes	☐	☐	☐
• Aliment composé ou complément alimentaire (pré-mélange du commerce)	☐	☐	☐
• Mélasse	☐	☐	☐
• Complément minéral et vitaminique	☐	☐	☐
• Autre (préciser)	☐	☐	☐
• Autre (préciser)	☐	☐	☐
• Autre (préciser)	☐	☐	☐

19. COUVERTURE MINERALE

19.1 Avez-vous distribué un complément minéral entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{2006} ?

Répondez oui si vous avez distribué un complément minéral et vitaminique (CMV), que celui-ci ait été acheté déjà mélangé à d'autres aliments ou que vous l'ayez acheté séparément. (NB : les pierres à lécher ne doivent pas être comptées ici (cf question 20))

Oui ☐ Non ☐

19.2 Si oui, pouvez-vous compléter le tableau pour les Campagnes C_0 à C_{2006} ?
(Dans la mesure du possible reportez-vous aux factures.)

Campagne	Marque	Nom déposé	F
			☐
			☐
			☐
			☐
			☐
			☐
			☐
			☐
			☐
			☐

20. PIERRES A LECHER

20.1 Avez-vous utilisé pour les ovins, des pierres à lécher entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{2006} ?

Oui ☐ Non ☐

20.2 Si oui, ces pierres étaient-elles enrichies en minéraux autres que du sel ?

Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas ☐

20.3 Pouvez-vous compléter le tableau suivant pour les Campagnes C_0 à C_{0XX5} ?
(Dans la mesure du possible reportez-vous aux factures.)

Campagne	Marque	Nom déposé	Nombre	Poids (kg)	Mix	F
					❑	❑
					❑	❑
					❑	❑
					❑	❑
					❑	❑
					❑	❑
					❑	❑
					❑	❑
					❑	❑

MP : Minéraux

21. ALIMENTATION D'AUTRES RUMINANTS

21.1 Des caprins ou des bovins étaient-ils présents dans l'exploitation entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{0+2} *(plusieurs réponses possibles)*

Caprins Oui ❑ Non ❑
Bovins Oui ❑ Non ❑

21.2 Entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{0+2}, les ovins ont-ils eu accès à des aliments du commerce destinés aux bovins ou aux caprins ?
Oui ❑ Non ❑

21.3 Entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{0+2}, les ovins ont-ils eu accès à des compléments minéraux ou à des pierres à lécher destinés aux bovins ou aux caprins ?
Oui ❑ Non ❑

22. ALIMENTS POUR PORCS ET VOLAILLES

22.1 Combien de porcs étaient présents par an entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{0+2} ?

Additionnez le nombre de truies, de verrats et de porcs charcutiers (sevrés à l'engraissement) présents chaque année dans l'exploitation entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{0+2}

└ ┴ ┴ ┴ ┘

22.2 Avez-vous acheté des aliments pour porcs entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{0+2} ?
Oui ❑ Non ❑

22.3 Combien de volailles étaient présentes entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{0+2} ?
Additionnez les effectifs des bandes élevées dans l'exploitation pendant cette période, toutes espèces d'oiseaux confondues.
Ne comptez pas les volailles de basse-cour (moins de 50 oiseaux).

└ ┴ ┴ ┴ ┘

22.4 Avez-vous acheté des aliments pour volailles entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{0+2} ?
Oui ❑ Non ❑

PRATIQUES CULTURALES

23. TRAITEMENTS PESTICIDES

23.1 Avez-vous appliqué des traitements pesticides sur des produits destinés à l'alimentation des ovins ?

Répondez oui si entre le début de la Campagne C_0 et la fin de la Campagne C_{0XX5}, vous avez effectué un traitement fongicide, insecticide ou herbicide sur une parcelle cultivée pour la production d'aliments pour ovins (foin, ensilage, concentrés, ...) ou sur les produits après récolte.
Oui ❑ Non ❑

23.2 Si oui, pouvez-vous préciser la nature du traitement (plusieurs réponses possibles) ?
Fongicide ❑ Insecticide ❑ Herbicide ❑

23.3 Pouvez-vous compléter le tableau suivant concernant les produits utilisés pour les Campagnes C_0 à C_{2006} ?
(Dans la mesure du possible reportez-vous aux factures.)

Campagne	Culture	N° autorisation	Nom déposé	F
				❑
				❑
				❑
				❑
				❑
				❑
				❑
				❑
				❑
				❑

Reproduction

24. Periode de mise bas
Au cours de quels mois de l'année ont lieu habituellement les agnelages ?

Juil	Août	Sept	Oct	Nov	Déc	Jan	Fév	Mars	Avril	Mai	Juin
❑	❑	❑	❑	❑	❑	❑	❑	❑	❑	❑	❑

25. Placenta
25.1 Pendant la Campagne C_6, utilisiez-vous des cases d'adoption au moment de l'agnelage ?
Oui ❑ Non ❑

25.2 Pendant la Campagne C_6, retiriez-vous les placentas ?
Jamais ou très rarement ❑ Occasionnellement ❑ Toujours ou le plus souvent ❑

Sante

26. Administration de mineraux
Les ovins ont-ils reçu des médicaments à base de mélanges de vitamines et de minéraux entre le début de la Campagne C_6 et la fin de la Campagne C_{2006} ?

Répondez oui si vous ou votre vétérinaire utilisez des médicaments injectables, en solution buvable ou en poudre à base de vitamines et de minéraux pour traiter (diarrhée, infertilité) ou de façon préventive (reproduction, sevrage, parasitisme).

Oui ❑ Non ❑ Ne sait pas ❑

27. Antiparasitaire externe
27.1 Entre le début de la Campagne C_6 et la fin de la Campagne C_{2006}, avez-vous administré des traitements contre les parasites externes ?

Répondez oui si vous avez organisé des traitements antiparasitaires collectifs contre certains parasites externes (gale, tiques, poux).

Oui ❑ Non ❑

27.2 Pouvez-vous compléter le tableau suivant concernant les produits utilisés pour les Campagnes C_6 à C_{2006} ?
(Dans la mesure du possible reportez-vous aux factures.)

Campagne	Produit	Voie d'administration	F	Agneaux	Agnelles	Brebis	Béliers
			❑	❑	❑	❑	❑
			❑	❑	❑	❑	❑
			❑	❑	❑	❑	❑
			❑	❑	❑	❑	❑
			❑	❑	❑	❑	❑
			❑	❑	❑	❑	❑
			❑	❑	❑	❑	❑
			❑	❑	❑	❑	❑
			❑	❑	❑	❑	❑
			❑	❑	❑	❑	❑
			❑	❑	❑	❑	❑

28. TRAITEMENT INSECTICIDE DES LOCAUX

28.1 Avez-vous effectué des traitements insecticides dans les locaux d'élevage ?

Répondez <u>oui</u> si vous avez effectué au moins un traitement sous forme d'aérosol, de fumigation ou de pulvérisation entre le début de la Campagne C_y et la fin de la Campagne C_{zzzz}.

Oui ❒ Non ❒

28.2 Pouvez-vous compléter le tableau suivant concernant les produits utilisés pour les Campagnes C_y à C_{zzzz} ?
(Dans la mesure du possible reportez-vous aux factures.)

Campagne	Marque	Nom déposé	F
			❒
			❒
			❒
			❒
			❒
			❒
			❒
			❒
			❒
			❒

Merci de votre participation !

Etudes épidémiologiques de la tremblante atypique ovine

La tremblante atypique a été découverte suite à l'intensification du dépistage des encéphalopathies spongiformes transmissibles des petits ruminants. Les premiers éléments disponibles suggéraient que cette forme pourrait ne pas être d'origine infectieuse, à la différence de la forme classique de tremblante. Cette nouvelle forme a soulevé des questions sur sa dangerosité pour l'homme et l'animal et ses conséquences éventuelles sur l'efficacité des programmes de lutte contre la tremblante.

L'objectif global de la thèse, était de décrire la situation épidémiologique de la maladie chez les ovins et d'en explorer les facteurs de risque. Nous avons entrepris une étude descriptive des résultats de la surveillance de la tremblante en France et en Europe, une exploration des facteurs de risque liés aux pratiques d'élevage et à la génétique ainsi qu'une étude de l'agrégation des cas sur le plan géographique et dans les troupeaux atteints. Dans la plupart des cas nous avons comparé nos résultats à ceux obtenus pour la tremblante classique.

Ces études ont montré que la tremblante atypique avait une prévalence assez homogène entre les différentes sous-populations comparées, de l'ordre de six cas pour dix mille animaux testés, ce qui contrastait avec les résultats pour la tremblante classique, nettement plus variables. Les facteurs de risque génétique étaient marqués et aucun facteur de risque évoquant une origine infectieuse de la maladie n'a été identifié. De plus, la prévalence de la tremblante atypique n'était pas différente dans les troupeaux atteints et dans la population générale et les cas n'avaient pas tendance à s'agréger. Ces résultats confortent l'idée que la tremblante atypique est peu ou pas contagieuse, ce qui est compatible avec une origine non infectieuse.

Mots-clés : EST, tremblante atypique, tremblante classique, prion, ovin, épidémiologie, médecine vétérinaire, épidémiosurveillance

Epidemiological studies on ovine atypical scrapie

Atypical scrapie was discovered following the intensification of transmissible spongiform encephalopathy screening in small ruminants. The first evidences suggested that it could have a non infectious origin conversely to classical scrapie. This new type of scrapie raised questions on its dangerousness for men and animals and on its possible consequences on the efficacy of the scrapie control programs.

The overall aim of the thesis was to describe the epidemiological situation of the disease in ovine and to describe the risk factors. We undertook a descriptive study based on surveillance data in France and in Europe, an exploratory study of the risk factors at the farm level and towards genetic risk and we studied the clustering of cases in space and in positive flocks. In most circumstances we compared our results with classical scrapie.

The results of these studies were that atypical scrapie prevalence was quite similar between the different subpopulations compared, around six cases per ten thousands of animals tested, in contrast with classical scrapie which varied more. The genetic risk factors were strong and no risk factor associated with an infectious origin was identified. In addition the prevalence of atypical scrapie in positive flocks was not different from the prevalence in the general population and cases did not tend to cluster. These results supported the idea that atypical scrapie is not or hardly contagious which is compliant with a non infectious origin.

Keywords: TSE, atypical scrapie, classical scrapie, prion, ovine, epidemiology, veterinary medicine, epidemiological surveillance,