

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 27 janvier 2025

AVIS

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

relatif à la « demande d'évaluation du risque de résurgence de la brucellose suite à l'utilisation d'embryons issus du foyer de brucellose bovine en Haute Savoie en 2021 »

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

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

Elle contribue également à assurer la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux, l'évaluation des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des aliments et, en évaluant l'impact des produits réglementés, la protection de l'environnement.

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

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 2 septembre 2024 par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) pour la réalisation de l'expertise suivante : « Demande d'évaluation du risque de résurgence de la brucellose suite à l'utilisation d'embryons issus du foyer de brucellose bovine en Haute Savoie en 2021 ».

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

D'après le texte de la saisine : « En 2021, le dernier foyer de brucellose bovine, a conduit à assainir le troupeau par l'abattage de tous les bovins du troupeau. Cependant, les vaches laitières de cet élevage de race Abondance, race rustique locale, produisaient un lait à forte valorisation. L'éleveur et ses ascendants avaient opéré une sélection génétique que celui-ci souhaitait préserver. A cet effet, l'Anses avait été saisie pour un avis sur le prélèvement et l'utilisation d'embryons chez les femelles gestantes de ce foyer. A la suite de l'avis et de la sollicitation de la Commission Européenne, le laboratoire national de référence a prescrit un protocole de collecte le 21 novembre 2021. En 2023, la DDETSP de Haute Savoie a présenté à l'éleveur les scénarii d'utilisation des embryons prélevés sur 12 génisses saines, sous réserve que son troupeau soit déqualifié pendant la période de gestation et qu'il suive le processus d'octroi de qualification. Cette proposition correspondait donc à une perte du statut indemne de son troupeau pendant 15 mois. Or aujourd'hui, les professionnels considèrent que ce processus est trop long.

Le protocole de collecte des embryons a permis de s'assurer que le matériel génétique sauvegardé, n'est pas de nature à générer, par la suite, une résurgence de foyer de brucellose bovine. Considérant que ces 52 embryons sont dorénavant détenus dans un établissement agréé de produits germinaux, le gestionnaire souhaite s'appuyer sur la définition prévue par le règlement délégué (UE) 2020/689 dans son annexe IV partie I Chapitre 1 section 1 paragraphe f point ii) et section 2 pour maintenir la qualification du troupeau receveur.

Un protocole d'utilisation de ces 52 embryons a été présenté début juin par le GDS des Savoie. Celui-ci prévoit leur utilisation en septembre 2024 dans une exploitation distincte de l'ancien foyer de 2021. Cette exploitation située dans l'Ain accueillerait sur son site uniquement des génisses en location vouées à être transplantées. Il est prévu de transférer ces embryons dans 52 de ces 65 génisses en deux fois à deux semaines d'intervalle. »

Dans ce contexte, la DGAL souhaite disposer selon le texte de saisine :

- « d'une évaluation de risque de résurgence de la brucellose suite à l'utilisation de ces embryons,
- d'une évaluation de la surveillance à réaliser et des recommandations concernant la gestion de ces génisses et de leurs futurs veaux, notamment :
 - le devenir des génisses qui ne seront finalement pas transplantées : peuvent-elles être commercialisées vers un autre élevage ou doivent-elles être abattues ?
 - le devenir des génisses transplantées mais qui ne seront finalement pas gravides : peuvent-elles être commercialisées vers un autre élevage ou doivent-elles être abattues ?
 - le devenir des jeunes vaches ayant vêlé : peuvent-elles être commercialisées vers un autre élevage ou doivent-elles être abattues ;
 - la surveillance et la biosécurité renforcée à appliquer à ce troupeau de génisses pendant et après la gestation et aux futurs veaux, sachant que ces derniers partiront rapidement après la naissance dans l'exploitation où les femelles ont été prélevées et que seules les femelles seront conservées. »

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Janvier 2024) ».

L'expertise relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisé (CES) « Santé et Bien-être des animaux (SABA) »

L'Anses a confié l'expertise à un groupe de rapporteurs (Annexe 1). Les travaux ont été présentés au CES SABA tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques le 19 novembre 2024. Ils ont été validés par le CES « SABA » réuni le 17 décembre 2024.

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

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES SABA

Pour répondre aux questions de la saisine, les experts ont sélectionné dans leur corpus bibliographique personnel des publications sur les risques sanitaires associés au transfert d'embryons produits *in vivo* et issus d'élevages brucelliques. Une recherche associant les mots clés « *brucella AND melitensis AND abortus AND (comparison OR biology)* » a été effectuée dans le moteur de recherche Web of Science®. Enfin, un bilan des résultats obtenus sur les prélèvements réalisés chez les génisses donneuses et les embryons collectés dans l'élevage infecté par *B. melitensis*, puis une analyse de risque, ont été réalisés.

3.1. Risques sanitaires associés au transfert embryonnaire

Depuis 60 ans, le développement de l'insémination artificielle (IA) et la cryoconservation des embryons ont conduit au commerce international de matériel génétique bovin. Le transfert des embryons de mammifères domestiques de ferme a commencé son développement dans les années 1970, notamment chez les bovins (Thibier 2024).

Le transfert embryonnaire comme approche de sauvegarde d'un troupeau de haute valeur génétique a déjà été utilisé dans d'autres contextes, notamment dans le cadre de la tuberculose bovine¹ et de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) (Wrathall et al. 2008).

L'interaction des ovocytes et des embryons avec des agents pathogènes a fait l'objet de plusieurs revues de la littérature (Daniel Givens, Gard, et Stringfellow 2007; Van Soom et al. 2007; Bielanski 2014; Thibier 2024; Thibier et Perry 2023). Les ovocytes et les premiers stades embryonnaires, jusqu'au 8^{ème} jour environ après la fécondation, sont entourés d'une enveloppe glycoprotéique acellulaire, la zone pellucide (ZP). Visualisée au microscope électronique à balayage, la ZP est composée d'un réseau fibreux (donc acellulaire) avec de nombreux pores. Les pores sont de taille variable, de l'ordre du micromètre (de 0,5 à 1,5 µm environ) (Santos

¹ Note de service DGAL/SDSPA/N2011-8107

et al. 2008). Ils sont plus grands au niveau de la surface externe, mais leur taille diminue de façon centripète chez les embryons animaux et humains (Bielanski et al. 2006).

Ces structures anatomiques de la ZP permettent l'adhésion et la capture des agents pathogènes, mais les empêchent de pénétrer complètement dans la ZP.

En général, les ovules peuvent être contaminés à différents stades : avant la formation de la ZP, et par la suite par des agents excrétés dans le liquide folliculaire, par des spermatozoïdes contaminés lors de la fécondation ou enfin lors du passage dans l'oviducte et l'utérus (Van Soom et al. 2007).

Dès les années 1980, la communauté vétérinaire s'est mobilisée au sein d'une société savante, l'*International Embryo Technology Society* (IETS). Le but de l'IETS est « de promouvoir la science de la technologie des animaux embryons en promouvant une recherche plus efficace, en diffusant des informations scientifiques et éducatives, en encourageant des normes élevées d'éducation, en maintenant des normes élevées d'éthique, et la coopération avec d'autres organisations qui ont des objectifs similaires » (Thibier 2024). Sur la base de la littérature scientifique sur les interactions embryons-pathogènes, le comité de l'IETS a classé les agents pathogènes susceptibles d'être transmis lors d'un transfert embryonnaire en quatre catégories². La première catégorie se définit comme « les maladies ou les agents pathogènes (...) pour lesquels il y a suffisamment de preuves pour démontrer que le risque de transmission est négligeable, à condition que les embryons possèdent une zone pellucide intacte et qu'ils soient manipulés correctement entre le prélèvement et le transfert » (Thibier 2024). Chaque année, la classification est révisée et mise à jour en fonction des nouveaux articles qui paraissent.

Sur la base de ces données scientifiques pertinentes et solides, le comité de l'IETS a aussi mis en place un certain nombre de protocoles visant à limiter le risque de transmission d'agents pathogènes par le transfert d'embryons³.

Bien que les données expérimentales montrent que de nombreux agents pathogènes animaux peuvent être associés au sperme et aux embryons, seuls quelques-uns ont la possibilité de pénétrer dans les spermatozoïdes ou de pénétrer dans la ZP intacte et de se répliquer dans les cellules embryonnaires. Le risque de transmission de maladies peut être considérablement réduit ou éliminé en appliquant les protocoles sanitaires recommandés par l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA).

Ainsi, le Chapitre 4.8 – Article 4.8.1.4 du Code Terrestre ouvre la possibilité de mettre en œuvre une production d'embryons *in vivo* à partir de donneuses infectées par *B. abortus*, sachant que *B. abortus* est classée en catégorie 1 selon la classification de l'IETS.

La séquence d'événements nécessaire pour que *B. abortus* ou *B. melitensis* soit transmise par les embryons transférés serait la suivante :

- 1/ les embryons doivent être exposés aux *Brucella* avant d'être prélevés sur des vaches infectées ;
- 2/ les *Brucella* doivent rester adhérentes à la ZP intacte des embryons ;

² [IETS recommendations regarding the risk of disease transmission via in vivo derived embryos.pdf](#)

³ [The International Embryo Technology Society \(IETS\) > Publications > IETS Manual](#)

3/ les *Brucella* capables d'adhérer à la ZP doivent survivre aux cycles de lavage, de congélation et de décongélation ainsi qu'à l'exposition aux antibiotiques et/ ou à la trypsine éventuellement inclus dans le protocole ;

4/ la quantité de *Brucella* qui a pu rester adhérentes à la ZP doit être suffisante pour correspondre à une dose infectieuse lorsque l'embryon est transféré à une receveuse sensible.

Pour certains agents pathogènes (*Streptococcus agalactiae*, *Actinomyces pyogenes*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, *Campylobacter fetus*, et mycoplasmes), la contamination a été rapportée pour l'une ou l'autre de ces étapes mais cela n'a pas été décrit pour *B. abortus*. (Manuel IETS).

La classification de *B. abortus* en catégorie 1 par l'IETS repose sur les résultats d'études indiquant que cette séquence d'événements ne se produit pas pour cette bactérie. La classification est révisée régulièrement en fonctions des nouvelles publications et données.

Les conclusions de ces études peuvent se résumer de la manière suivante :

- absence de mise en évidence d'infection des zygotes issus des femelles brucelliques par *B. abortus* (Andrade et al. 2024; Neglia et al. 2007) ;
- utérus des femelles en œstrus non favorable à la présence de *B. abortus* (Sparling et Stringfellow 1986; Stringfellow et al. 1984; 1985); contrairement à celui des femelles en anœstrus (Voelkel et al. 1983). Ceci suggère que le blastocyste n'est pas exposé à la bactérie jusqu'à la période de récolte des embryons, alors même que la bactérie est détectée au même moment dans d'autres tissus et sécrétions des vaches donneuses infectées (Barrios et al. 1988) ;
- absence d'adhésion à la ZP intacte des embryons même dans l'hypothèse où le blastocyste serait exposé à *B. abortus* dans le tractus génital (Mallek et al. 1984; Stringfellow et al. 1984; Stringfellow, Wolfe, McGuire, et al. 1986; Stringfellow, Wolfe, Lauerman, et al. 1986; Stringfellow et Wright 1989) ;
- lors d'infection expérimentale, élimination de *B. abortus* par les traitements appliqués aux embryons qui font partie intégrante du protocole de traitement pré-implantatoire (lavages, congélation-décongélation), même en l'absence de traitement antibiotique, et y compris lorsqu'ils ont été mis dans une suspension contenant une concentration élevée de *B. abortus* (Mallek et al. 1984; Stringfellow et al. 1984; Stringfellow, Wolfe, McGuire, et al. 1986) ;
- enfin, une étude de portée limitée a montré, chez des bisons (*Bison bison*) que les embryons issus d'une femelle infectée par *B. abortus* ne donnaient pas naissance à des veaux infectés et n'entraînaient pas d'infection de la receveuse (Robison et al. 1998). Il est cependant à noter qu'aucune étude expérimentale chez les bovins domestiques (*Bos taurus*) incluant un suivi des receveuses après transfert d'embryons issus de donneuses infectées n'est à notre connaissance disponible. De même, il n'existe pas de données disponibles relatives au suivi d'élevages bovins domestiques hébergeant des femelles receveuses ayant porté des embryons issus de donneuses infectées ou susceptibles de l'être. Mais il n'existe pas non plus de données disponibles faisant état de suspicions que des élevages aient pu s'infecter par ce biais, en dépit de l'activité considérable de transfert embryonnaire, à l'échelle nationale comme internationale. D'après le comité de l'IETS, « le transfert de plusieurs millions d'embryons au fil des ans, à travers tous les continents, de plusieurs espèces animales,

n'a entraîné aucune transmission de maladies sur une période de quatre décennies. Au plan sanitaire, les embryons se sont avérés être le moyen le plus sûr d'échanger le matériel génétique animal dans le monde entier » (Thibier et Perry 2023).

Un autre élément rassurant réside dans le fait qu'aucune séroconversion n'a été rapportée sur des vaches implantées au cours de la période allant de 1987 à 1992, pendant laquelle des embryons de statut initial non connu importés des Etats-Unis ont été utilisés.

Les données précédemment évoquées portent sur l'espèce bactérienne *B. abortus* tandis que les questions de cette saisine sont en lien avec un foyer de brucellose due à *B. melitensis*. Depuis la première étude ayant séquencé le génome de *B. abortus* (Halling et al. 2005), et l'ayant comparé à celui d'autres espèces de brucelles, plusieurs études relatives à la description et à la comparaison des génomes des brucelles ont été publiées. Ces études soulignent que, malgré des différences de tropisme vis-à-vis des espèces animales infectées ou du pouvoir pathogène, les deux espèces *B. abortus* et *B. melitensis* sont particulièrement proches sur le plan génétique. Si certaines études se sont intéressées aux différences existant entre elles sur le plan de la pathogénie, les déterminants moléculaires (génétiques et/ou protéiques) permettant d'expliquer les différences d'interactions des brucelles avec des espèces hôtes, notamment en termes de tropisme pour les embryons, ne sont pas connus avec précision pour le moment (Chain et al. 2005; Seleem, Boyle, et Sriranganathan 2008; Wareth et al. 2015).

Les experts notent qu'aucun élément n'indique une quelconque différence de tropisme pour l'embryon des bovins entre *B. melitensis* et *B. abortus*. Dans la mesure où il n'est pas possible de l'exclure non plus, une incertitude faible demeure à ce sujet.

3.2. Protocole de production d'embryons *in vivo* mis en œuvre dans le contexte du Bargy

Dans le cadre de la saisine, les vaches donneuses étaient des génisses nullipares de haute valeur génétique nées entre juin et novembre 2020. En considérant qu'en moyenne quatre à cinq embryons par vache sont obtenus après insémination et pour des raisons de faisabilité pratique du protocole, 12 génisses ont été sélectionnées.

Les femelles prélevées ont été isolées dans un autre bâtiment dès que la décision de collecter des embryons a été prise. Il a également été décidé d'appliquer un traitement permettant de planifier le plus rapidement possible la collecte des génisses donneuses, afin de limiter la période d'attente avant la collecte des embryons et de pouvoir appliquer les mesures de police sanitaire. Le traitement mis en œuvre a constitué en la pose de spirale vaginale imprégnée de progestérone pour la synchronisation de l'œstrus (J0), d'un traitement pour provoquer une superovulation (hormone FSH⁴, 2 injections/jour pendant 4 jours), et d'une injection de prostaglandine (en même temps que la 5^{ème} injection de FSH).

Après retrait de la spirale au 9^{ème} jour après sa pose, deux inséminations (sur chaleurs observées, à 12-24 h d'intervalle) ont été réalisées chez les génisses et la collecte des

⁴ Follicle Stimulating Hormone - Hormone de stimulation folliculaire

embryons a eu lieu sept jours après insémination. Tous les embryons ont été congelés pour la méthode de transfert direct, en attendant les résultats des analyses sanitaires.

Les embryons collectés ont été lavés selon les recommandations IETS (en incluant une trypsination des embryons). Le protocole complet est présenté en Annexe 2.

La Figure 1 ci-dessous illustre :

- la séquence des événements principaux ayant conduit à la suspicion et confirmation du foyer jusqu'à la décision de collecter les embryons (partie supérieure) ;
- ainsi que les prélèvements et analyses qui ont été effectués sur les génisses (partie inférieure). Les analyses dont les résultats figurent dans le présent document sont indiquées dans des encadrés sur fond bleu ciel.

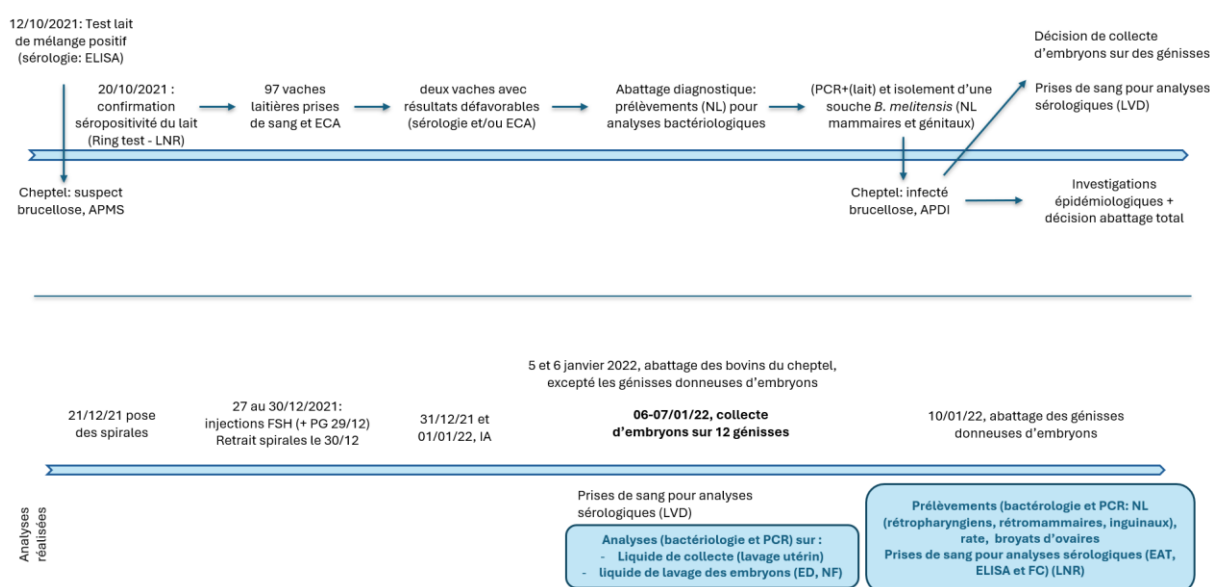


Figure 1 : Chronologie des principaux événements ayant mené à la confirmation du foyer de brucellose et prélèvements effectués sur les génisses donneuses

Légendes : Arrêté préfectoral portant déclaration d'infection (APDI), Arrêté préfectoral de mise sous surveillance (APMS), épreuve à l'antigène tamponné (EAT), Epreuve cutanée allergique (brucelline) (ECA), embryons dégénérés (ED), Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), fraction du complément (FC), Follicle Stimulating Hormone (FSH), insémination artificielle (IA), Laboratoire National de Référence (LNR), Laboratoire vétérinaire départemental (LVD), ovocytes non fécondés (NF), nœuds lymphatiques (NL), Polymerase Chain reaction (PCR), prostaglandines (PG)

3.3. Bilan des résultats de production d'embryons

3.3.1. Analyses réalisées

Les taureaux utilisés étaient tous admis à la monte publique artificielle⁵.

⁵ Arrêté du 11 janvier 2008 fixant les conditions sanitaires exigées pour les agréments visés à l'article L. 222-1 du code rural dans le cadre de la monte publique artificielle des animaux de l'espèce bovine
<https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000017958219/2024-12-05/>

Des prélèvements sanguins sur les génisses ont été réalisés avant le démarrage du traitement hormonal, le jour de la collecte d'embryons et lors de l'abattage pour vérifier l'absence de séroconversion.

Le jour de la collecte d'embryons, deux prélèvements supplémentaires ont été réalisés chez les génisses donneuses : a) un échantillon du liquide de collecte (lavage de l'utérus) ; b) les trois derniers bains ainsi que les embryons non viables et ovocytes non fécondés ont été conservés pour analyse bactériologique. Conformément aux recommandations de l'IETS, les embryons collectés ont été passés dans 10 bains de lavage successifs visant à éliminer les agents pathogènes potentiellement présents et/ou adhérant à la ZP.

Les génisses donneuses qui ont été abattues lors de l'abattage total du troupeau ont par ailleurs été soumises aux mêmes prélèvements que les autres animaux de l'élevage, avec le prélèvement supplémentaire des ovaires, pour analyse du liquide folliculaire.

L'ensemble des résultats est renseigné dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Résultats des analyses des 12 génisses sélectionnées pour la collecte d'embryons

Donneuses*		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Date de naissance		08/06/2020	17/07/2020	29/07/2020	13/08/2020	17/08/2020	02/09/2020	11/09/2020	13/09/2020	23/09/2020	26/09/2020	28/09/2020	15/11/2020
Nombre d'embryons totaux collectés		3	6	4	4	8	10	8	13	8	4	11	5
Nbre d'embryons congelés		2	5	0	4	6	6	2	9	6	1	9	3
Nbre d'embryons dégénérés		0	1	4	0	1	0	4	2	2	0	2	2
Nbre d'ovocytes non fécondés		1	0	0	0	1	4	2	2	0	3	0	0
Présence dans l'alpage du Reposoir en 2021		N	O	N	N	N	N	N	O	N	N	O	N
Sérologie LNR	EAT (N/P)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ELISA (DO)	1,81	1,41	0,75	2,56	40,4	3,83	3,5	2,87	1,58	2,24	1,49	3,11
	FC (UI/ml)	0	0	0	0	0	0	8,33	0	0	16,67	0	0
LVD		LVD 73	LDA 01	LVD 73	LVD 73	LDA 01	LDA 01	LVD 73	LVD 73	LDA 01	LDA 01	LVD 73	LDA 01
GG RM	Bactériologie	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	PCR	N	N(SA)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
GG RP	Bactériologie	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	PCR	N	N(LI)	N	N	N(LI)	N	N	N	N	N	N	N
GG I	Bactériologie	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	PCR	N	N(SA)	N	N	N(LI)	N(SA)	N	N	N	N	N	N
Rate	Bactériologie	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	PCR	N	N(LI)	N	N	N	N(LI)	N	I	N	N	N	N(LI)
Utérus / ECV utérin	Bactériologie	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	PCR	N	NEX	N	N	NEX	NEX	N	N	NEX	NEX	N	NEX
ECV vaginal	Bactériologie	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	PCR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Donneuses*		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Date de naissance		08/06/2020	17/07/2020	29/07/2020	13/08/2020	17/08/2020	02/09/2020	11/09/2020	13/09/2020	23/09/2020	26/09/2020	28/09/2020	15/11/2020
Sang	Bactériologie	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	PCR	N	NEX	N	N	NEX	NEX	N	N	NEX	NEX	N	NEX
LF ou broyats d'ovaire	Bactériologie	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	PCR	N	NEX	N	N	N	N	N	NEX	NEX	NEX	N	NEX
Liquide collecte (lavage de l'utérus)	Bactériologie	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	PCR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
DG / NF/ bain de lavage des embryons	Bactériologie	N	N	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N
	PCR	N	N	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N

Légende : GG RM = ganglions rétro mammaires, GG RP = ganglions rétropharyngiens, GG I= ganglions iliaques, ECV = écouvillon, LF = liquide folliculaire, DG = embryons dégénérés, NF= ovocytes non fécondés, N= négatif, N(SA)= négatif avec signal aspécifique, N(LI)= négatif avec légère inhibition, I=inhibé, NEX= échantillon non exploitable par PCR en raison d'un volume insuffisant ou d'une mauvaise qualité d'échantillon, Laboratoire vétérinaire départemental (LVD) *données ont été anonymisées mais l'Anses conserve la correspondance entre l'identification de la donneuse et le numéro attribué.

Légende : seuil de positivité pour EAT (présence d'agglutination = P) ; FC (20 UI/mL) ; ELISA sérum (négatif < 110 % ; douteux entre 110 et 120 %, positif > 120 %)

3.3.2. Interprétation des résultats

Dans le cheptel, parmi les animaux testés, peu de résultats non négatifs ont été observés, comme indiqué dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Liste des femelles du cheptel (mais ne faisant pas partie des génisses prélevées) ayant présenté au moins un test individuel positif ou des résultats négatifs proches du seuil de positivité (possiblement en cours de séroconversion, tests réalisés au LNR Brucellose, Anses)

Vaches*	A	B	C	D	E	F
Date de naissance	12/07/2019	23/07/2018	27/12/2017	08/04/2019	18/07/2019	18/07/2019
EAT	++++	0	+	+	0	0
FC	AC	AC	16,67	33,33	0	0
ELISA sérum	228,23%	0,57%	103,88%	109,93%	106,54%	117,85%
ELISA X2	130,57%	0%	4,34%	35,79%	22,77%	43,97%

Légende : AC = anticomplémentaire (ininterprétable) ; seuil de positivité pour EAT (présence d'agglutination, + à ++++) ; FC (20 UI/mL) ; ELISA sérum (douteux entre 110 et 120 %, positif > 120 %), ELISA X2 (positif > 65 %), *données anonymisées mais l'Anses conserve la correspondance entre l'identification de l'animal et le numéro attribué.

Sur toutes les génisses donneuses, 10 analyses bactériologiques et trois analyses sérologiques ont été réalisées.

Parmi les donneuses retenues, un signal faible en fixation du complément (FC) a été obtenu pour deux d'entre elles. La FC, méthode reconnue comme plus spécifique que les autres tests sérologiques utilisés en médecine vétérinaire, n'est cependant pas précise. Un écart de l'ordre d'une dilution ne permet donc pas de conclure à un écart entre deux résultats et les signaux faibles ne peuvent être interprétés comme positifs. En outre, ces deux génisses ont présenté un titre très faible en test ELISA et un résultat négatif au test EAT (épreuve à l'antigène tamponné), dont la sensibilité est plus élevée, ce qui a confirmé que ces deux génisses étaient séronégatives.

Quelques résultats PCR caractérisés par des signaux faibles ont été interprétés comme négatifs. En effet, aucun isolement de *B. abortus* ou *B. melitensis* n'a jamais été obtenu par le LNR Brucellose lorsque les Ct (le cycle d'amplification de la PCR à partir duquel le génome viral présent dans l'échantillon est détecté) observés sont supérieurs à 33-34. En pratique, un résultat en PCR supérieur à 38 est considéré comme négatif. Cette interprétation a été confortée par les résultats tous négatifs des autres tests réalisés sur les mêmes animaux, notamment les analyses bactériologiques.

En outre, les experts ont calculé, sur la base de la sensibilité de l'isolement bactériologique (méthode de référence) quel pouvait être dans le pire des scénarios le risque qu'une génisse infectée ait pu donner un résultat faussement négatif en bactériologie.

Sous réserve que les différents prélèvements sur un même animal puissent être considérés comme indépendants, il est en effet possible de calculer, sur la base de la sensibilité individuelle, la sensibilité cumulée de la bactériologie chez un même animal ayant subi 10 prélèvements concomitants, comme cela a été le cas pour les génisses de l'élevage pressenties comme donneuses et testées.

La sensibilité individuelle de l'isolement de *Brucella spp.* a été estimée à 33,33 % étant donné que le prélèvement de trois paires de nœuds lymphatiques est jugé nécessaire pour pouvoir exclure qu'une vache est infectée lorsque les trois échantillons fournissent un résultat négatif en culture.

Quant à la sensibilité individuelle du test PCR pour *Brucella spp.*, elle est estimée comme supérieure à 95 %.

Dans ce contexte, la valeur de la sensibilité cumulée à l'échelle d'un bovin correspondrait pour chacun des tests à :

$$Se_c = 1 - (1 - Se_i)^n$$

avec : Se_i = sensibilité individuelle ; Se_c = sensibilité cumulée ; n = nombre de tests indépendants réalisés

Dans le cas de l'isolement, avec une Se_i de 33,33 %, la valeur de Se_c est donc égale à 98,26 % pour 10 échantillons indépendants testés concomitamment, soit un risque résiduel de 1,74 % de ne pas détecter un animal infecté.

Dans le cas de la PCR, il convient de prendre en compte ici le fait que le nombre d'échantillons testés par bovin a varié, puisque comme l'indique le Tableau 1, certains échantillons n'ont pu être exploités (NEX) et pour un bovin une inhibition (I) a rendu le résultat non interprétable pour un échantillon.

Dans l'hypothèse la plus sévère où les résultats N(SA) et N(LI) (cf Tableau 1) seraient également pris en compte comme non interprétables, six échantillons au moins par bovin pourraient être exploitables pour le calcul de la Se_c , sauf pour la donneuse n°2, avec trois échantillons exploitables en PCR (avec résultats négatifs). La Se_c oscillerait donc pour la PCR entre 99,9875 % (pour une vache) et 100 % pour les 11 autres vaches (puisque pour ces 11 donneuses, la valeur de la Se_c oscillerait entre $1 - (0,05)^6$ et $Se_c = 1 - (0,05)^{10}$, soit entre $(1 - 1,5625.10^{-8})$ et $(1 - 9,7656.10^{-14})$. La probabilité pour la donneuse n°2 de ne pas être détectée à tort comme infectée serait de 0,0125 % pour le seul test PCR, avant prise en compte des résultats de l'isolement (10 résultats négatifs) et de la sérologie (les trois tests avec résultats négatifs).

L'ensemble de ces éléments concourent à conclure que toutes les génisses donneuses étaient indemnes.

En conclusion, l'ensemble des résultats des différents prélèvements réalisés sur chaque génisse donneuse d'embryons a permis de conclure qu'aucune d'entre elles n'était infectée.

3.4. Réponses aux questions de la saisine

3.4.1. Risque de résurgence

Considérant que :

- l'ensemble des résultats des différents prélèvements réalisés sur chaque génisse donneuse d'embryons a permis de conclure au fait qu'aucune d'entre elles n'était infectée ;
- d'après le manuel de l'IETS, la brucellose à *B. abortus* est classée en première catégorie se définissant comme « les maladies ou les agents pathogènes (...) pour lesquels il y a suffisamment de preuves pour démontrer que le risque de transmission est négligeable, à condition que les embryons possèdent une zone pellucide intacte et qu'ils soient manipulés correctement entre le prélèvement et le transfert » ;
- aucun élément n'indique ni ne suggère une quelconque différence de tropisme pour l'embryon des bovins entre *B. melitensis* et *B. abortus* (il n'est toutefois pas possible de l'exclure, une incertitude demeure donc à ce sujet) ;
- d'après le comité de l'IETS, « le transfert de plusieurs millions d'embryons au fil des ans, à travers tous les continents, de plusieurs espèces animales, n'a entraîné aucune transmission de maladies sur une période de quatre décennies. Au plan sanitaire, les embryons se sont avérés être le moyen le plus sûr d'échanger le matériel génétique animale dans le monde entier » (Thibier et Perry 2023) ;
- les travaux publiés disponibles indiquent : 1/ qu'il n'y a pas de mise en évidence d'infection des zygotes issus des femelles brucelliques par *B. abortus*, 2/ que l'utérus des femelles en œstrus n'est pas favorable à la présence de *B. abortus*, contrairement à celui des femelles en anœstrus, et donc que le blastocyste n'est pas exposé à la bactérie jusqu'à la période de récolte des embryons, 3/ l'absence d'adhésion à la ZP intacte des embryons même dans l'hypothèse où le blastocyste serait exposé à *B. abortus* dans le tractus génital, 4/ et que, lors d'infection expérimentale, les traitements

appliqués sur les embryons qui font partie intégrante du protocole de traitement préimplantatoire, permettent d'éliminer toute trace de la bactérie, même en l'absence de traitement antibiotique. ;

➤ **En conclusion, les experts considèrent que le niveau de probabilité de résurgence de la brucellose suite à l'utilisation de ces embryons est compris entre 0 et 1 sur l'échelle AFSSA 2008 (qui va de 0 à 9, cf. Annexe 3)**

Les experts ont souhaité qualifier l'incertitude associée à cette évaluation de risque selon les modalités d'expression, de qualification et d'attribution des « indices d'incertitude » utilisés à l'Anses (Annexe 4).

Les principales incertitudes retenues sont les suivantes :

- dans le cadre de la saisine, le foyer de brucellose bovine dont sont issues les génisses donneuses était dû à *Brucella melitensis*. La majorité des données bibliographiques disponibles au moment de l'expertise portent sur *B. abortus* et aucune donnée de transfert d'embryon ne concerne *B. melitensis*. Dans la bibliographie, aucun élément n'indique une quelconque différence de tropisme pour l'embryon des bovins entre *B. melitensis* et *B. abortus*, mais aucun élément ne permet de l'exclure non plus. L'incertitude est de 2⁶ sur l'échelle de 1 à 4 ;
- certaines analyses sur les génisses sont revenues inexploitable ou avec des signaux non spécifiques mais *a contrario*, tous les résultats exploitables sont négatifs, dont toutes les analyses bactériologiques (isolement et PCR). L'incertitude est donc faible (1⁷ sur l'échelle de 1 à 4).

Les incertitudes étant faibles, les experts confirment leurs conclusions.

3.4.2. Surveillance des animaux entrés dans le protocole

- Surveillance des génisses qui ne seront finalement pas transplantées

Si certaines génisses ne peuvent être transplantées à J7 (absence de chaleur induite et/ou de corps jaune), les experts recommandent que ces génisses non retenues soient isolées et séparées des femelles qui vont être transplantées, dans un autre bâtiment. Elles pourront ensuite être commercialisées.

- Surveillance des génisses transplantées

- Génisses non gravides avec un diagnostic de gestation précoce négatif

Les experts proposent plusieurs options aux gestionnaires. Ces génisses :

- peuvent rester dans l'effectif jusqu'à la fin de la période de mise-bas de leurs congénères, et également au-delà si aucune génisse gravide n'a séroconverti ;
- peuvent être commercialisées dans un autre élevage sous réserve d'une sérologie négative avant cette commercialisation ;

⁶ La note attribuée est fondée sur un nombre limité d'études scientifiques ou sur un système de collecte de données de fiabilité limitée ET la présence de convergence entre auteurs et/ou experts.

⁷ La note attribuée est fondée sur des résultats convergents d'études scientifiques ou sur un système de collecte de données de fiabilité reconnue.

- peuvent être abattues après le diagnostic de non gestation. Des analyses sérologiques et l'analyse des trois paires de nœuds lymphatiques (retro-mammaires, rétro-pharyngiens, iliaques) doivent alors être réalisées.

➤ *Génisses gravides mais interruption de la gestation, quel que soit le stade*

Les mesures prévues dans la réglementation⁸ pour la surveillance des avortements afin d'exclure la brucellose seront respectées : un prélèvement sanguin et un écouvillonnage utérin seront réalisés rapidement après le constat d'interruption de gestation pour la réalisation d'analyses sérologiques et bactériologiques.

➤ *Des jeunes vaches ayant vêlé*

Le jour de la mise bas, les experts recommandent de réaliser une prise de sang et un écouvillonnage vaginal.

Toute naissance d'un veau mort ou mortalité du veau dans les 48h après la mise-bas entraînera impérativement :

- des analyses bactériologiques sur le veau ;
- des analyses bactériologiques et sérologiques sur les femelles transplantées, avec écouvillonnage vaginal et prise de sang réalisés dans les 72 heures.

Cette surveillance assure de détecter un animal infecté au plus tard lors de la mise-bas.

Les experts recommandent d'appliquer strictement la réglementation relative au port d'équipements de protection individuelle lors des mises-bas.

• Surveillance des veaux

Dès lors que tous les résultats des tests ont été favorables, les veaux nés viables sont confirmés comme étant indemnes, de même que le statut de leur troupeau d'appartenance.

Dans tous les cas de figure abordés ci-dessus, des résultats non favorables aux analyses sérologiques et bactériologiques doivent entraîner l'application de la réglementation en vigueur.

Les observations cliniques et les résultats d'analyses (sérologiques et bactériologiques) devront être enregistrés et conservés afin 1/ de contribuer à combler les lacunes actuelles de connaissances (liées au fait qu'il s'agit d'un foyer de brucellose due à *B. melitensis*) et 2/ de réviser éventuellement les recommandations de cet avis.

⁸ [Arrêté du 22 avril 2008 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la brucellose des bovinés - Légifrance](#)

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

Cette expertise s'inscrit donc le contexte d'un accompagnement de la préservation du patrimoine génétique d'un troupeau, postérieurement aux mesures de police sanitaire ayant conduit à l'abatage de ce troupeau consécutif à l'identification d'individus brucelliques. Dans ce contexte, l'Anses avait d'ores et déjà formulé, par le laboratoire national de référence brucellose au sein de son laboratoire de santé animale, le protocole de prélèvement des embryons. La présente expertise traite donc des conditions assurant la sécurité de leur utilisation.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du CES SABA « brucellose embryons » relatives à l'évaluation du risque de résurgence de la brucellose suite à l'utilisation d'embryons issus du foyer de brucellose bovine en Haute Savoie en 2021.

En prenant en compte les résultats des prélèvements réalisés sur chaque génisse donneuse d'embryons et les éléments bibliographiques sur les risques sanitaires associés au transfert d'embryons, l'Anses considère, à date, que la probabilité de résurgence de la brucellose du fait de l'utilisation de ces embryons est nulle à quasi nulle. Cette probabilité de résurgence pourra être réévaluée en cas d'acquisitions de nouvelles données (observations de terrain, analyses sérologiques et bactériologique).

Dans une perspective de sécurisation complémentaire, l'Anses recommande la surveillance des animaux ayant participé au protocole selon les différents critères proposés par les experts : transplantation réalisée ou non, génisses gravides ou non, conduite à terme de la gestation. A noter qu'une interruption de gestation, quel que soit le stade, et toute naissance d'un veau mort ou mortalité du veau dans les 48 h après la mise-bas, entraînera impérativement l'application des mesures prévues dans la réglementation en vigueur.

Au-delà du sujet spécifique de cette saisine, et bien qu'elle soit obligatoire, la déclaration des avortements bovins en France reste perfectible. L'Anses rappelle que la surveillance de la brucellose en France, comme dans tout pays indemne, repose prioritairement sur la surveillance événementielle des avortements, premier signe d'apparition d'un foyer primaire. A ce titre, l'Anses recommande de renforcer la déclaration des avortements en France.

Pr Benoît Vallet

MOTS-CLÉS

Brucellose, bovin, transfert d'embryons, analyse de risque.

Brucellosis, bovine, embryo transfer, risk analysis.

BIBLIOGRAPHIE

- Andrade, Rafaella Silva, Dircéia Aparecida Da Costa Custódio, Leonardo Silva Fernandes do Vale, Érika Aparecida Oliveira, Andrey Pereira Lage, et Elaine Maria Seles Dorneles. 2024. « Is it safe to use ovarian follicular fluid from cows seropositive for brucellosis in the production of in vitro embryos? » *Reproduction in Domestic Animals* 59 (7) : e14672. <https://doi.org/10.1111/rda.14672>.
- Barrios, D.R., D.C. Kraemer, E. Bessoudo, et L.G. Adams. 1988. « Failure to isolate *Brucella abortus* from embryos or ova from culture-positive superovulated cows ». *Theriogenology* 29 (2) : 353-61. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90238-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90238-5).
- Bielanski, A. 2014. « Biosafety in Embryos and Semen Cryopreservation, Storage, Management and Transport ». Dans *Reproductive Sciences in Animal Conservation*. Sous la direction de William V. Holt, Janine L. Brown, et Pierre Comizzoli, 753 : 429-65. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York, NY : Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0820-2_17.
- Bielanski, A., J. Algire, G.C.B. Randall, et O. Surujballi. 2006. « Risk of transmission of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis by embryo transfer of in vivo and in vitro fertilized bovine embryos ». *Theriogenology* 66 (2) : 260-66. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.11.010>.
- Chain, Patrick S. G., Diego J. Comerci, Marcelo E. Tolmasky, Frank W. Larimer, Stephanie A. Malfatti, Lisa M. Vergez, Fernan Aguero, Miriam L. Land, Rodolfo A. Ugalde, et Emilio Garcia. 2005. « Whole-Genome Analyses of Speciation Events in Pathogenic *Brucellae* ». *Infection and Immunity* 73 (12) : 8353-61. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8353-8361.2005>.
- Daniel Givens, M., Julie A. Gard, et David A. Stringfellow. 2007. « Relative risks and approaches to biosecurity in the use of embryo technologies in livestock ». *Theriogenology* 68 (3) : 298-307. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.004>.
- Halling, Shirley M., Brooke D. Peterson-Burch, Betsy J. Bricker, Richard L. Zuerner, Zhang Qing, Ling-Ling Li, Vivek Kapur, David P. Alt, et Steven C. Olsen. 2005. « Completion of the Genome Sequence of *Brucella abortus* and Comparison to the Highly Similar Genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis* ». *Journal of Bacteriology* 187 (8) : 2715-26. <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2715-2726.2005>.
- Mallek, Z., B. Guérin, M. Nibart, M. Parez, et M. Thibier. 1984. « Conséquences de la contamination in vitro des embryons de souris et de vaches par *Brucella abortus* ». *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, n° 4 : 479. <https://doi.org/10.4267/2042/65002>.
- Neglia, G., L. Zicarelli, Di Palo, E. Picillo, L. Attanasio, L. Boccia, B. Gasparrini, et al. 2007. « *Brucella* DNA is not detected in in-vitro produced embryos derived from ovaries of

- naturally infected buffaloes ». *Italian Journal of Animal Science* 6 (sup2) : 900-903. <https://doi.org/10.4081/ijas.2007.s2.900>.
- Robison, C. D., D. S. Davis, J. W. Templeton, M. Westhusin, W. B. Foxworth, M. J. Gilsdorf, et L. G. Adams. 1998. « CONSERVATION OF GERM PLASM FROM BISON INFECTED WITH BRUCELLA ABORTUS ». *Journal of Wildlife Diseases* 34 (3) : 582-89. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-34.3.582>.
- Santos, P, A Chaveiro, N Simões, et F Moreira Da Silva. 2008. « Bovine Oocyte Quality in Relation to Ultrastructural Characteristics of Zona Pellucida, Polyspermic Penetration and Developmental Competence ». *Reproduction in Domestic Animals* 43 (6) : 685-89. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00970.x>.
- Seleem, Mohamed N., Stephen M. Boyle, et Nammalwar Sriranganathan. 2008. « Brucella: A pathogen without classic virulence genes ». *Veterinary Microbiology* 129 (1-2) : 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.023>.
- Sparling, P.H., et D.A. Stringfellow. 1986. « Detection of , , in the cervical mucus of nulliparous heifers ». *Theriogenology* 25 (5) : 721-32. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90130-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90130-5).
- Stringfellow, D. A., D. F. Wolfe, L. H. Lauerman, et P. H. Sparling. 1986. « Resistance of preimplantation bovine embryos to infection with Brucella abortus ». *American Journal of Veterinary Research* 47 (9) : 1924-27.
- Stringfellow, D.A., B.W. Gray, P.H. Sparling, V.S. Panangala, P.A. Galik, et R.R. Young-White. 1985. « The effects of superovulation on infection in the bovine uterus ». *Theriogenology* 23 (4) : 701-10. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(85\)90205-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(85)90205-5).
- Stringfellow, D.A., C.M. Scanlan, R.R. Brown, G.B. Meadows, B.W. Gray, et R.R. Young-White. 1984. « Culture of bovine embryos after exposure to ». *Theriogenology* 21 (6) : 1005-12. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90395-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90395-9).
- Stringfellow, D.A., D.F. Wolfe, J.A. McGuire, L.H. Lauerman, B.W. Gray, et P.H. Sparling. 1986. « Effects of embryo-freezing and thawing techniques on the survivability of Brucella abortus ». *Theriogenology* 26 (5) : 553-59. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90161-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90161-5).
- Stringfellow, D.A., et J.C. Wright. 1989. « A review of the epidemiologic aspects of embryo transfer from -infected cows ». *Theriogenology* 31 (5) : 997-1006. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90483-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90483-4).
- Thibier, Michel. 2024. « Quarante ans de recherches sur l'interaction entre embryons et agents pathogènes. Pourquoi les embryons sont-ils le moyen le plus sûr d'échanges de gènes dans le monde (modèle bovin) ? » *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 177. <https://doi.org/10.3406/bavf.2024.71086>.
- Thibier, Michel, et George Perry. 2023. « IETS management of the challenges associated with embryo pathogen interaction ». *Reproduction, Fertility and Development* 36 (2) : 16-26. <https://doi.org/10.1071/RD23144>.
- Van Soom, A., H. Imberechts, Ph. Delahaut, E. Thiry, V. Van Roy, K. Walravens, S. Roels, et C. Saegerman. 2007. « Sanitary control in bovine embryo transfer How far should we go? A review ». *Veterinary Quarterly* 29 (1) : 2-17. <https://doi.org/10.1080/01652176.2007.9695223>.
- Voelkel, S.A., K.W. Stuckey, C.R. Looney, F.M. Enright, P.E. Humes, et R.A. Godke. 1983. « An attempt to isolate Brucella abortus from uterine flushings of brucellosis-reactor donor cattle ». *Theriogenology* 19 (3) : 355-66. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90091-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90091-2).
- Wareth, Gamal, Falk Melzer, Christoph Weise, Heinrich Neubauer, Uwe Roesler, et Jayaseelan Murugaiyan. 2015. « Proteomics-based identification of immunodominant proteins of Brucellae using sera from infected hosts points towards enhanced pathogen

survival during the infection ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 456 (1) : 202-6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.11.059>.

Wrathall, A. E., G. R. Holyoak, I. M. Parsonson, et H. A. Simmons. 2008. « Risks of transmitting ruminant spongiform encephalopathies (prion diseases) by semen and embryo transfer techniques ». *Theriogenology* 70 (5) : 725-45. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.049>.

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2025). Demande d'évaluation du risque de résurgence de la brucellose suite à l'utilisation d'embryons issus du foyer de brucellose bovine en Haute Savoie en 2021. Saisine 2024-SA-0135. Maisons-Alfort : Anses, 25 p.

ANNEXE 1

Présentation des intervenants

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

RAPPORTEURS

Mme Nadia HADDAD – Professeur, École Nationale Vétérinaire d'Alfort - Infectiologie, maladies réglementées, zoonoses

Mme Carole PEROZ – Maître de conférences, VetAgro Sup – Infectiologie, immunologie, maladies réglementées, approche intégrée de la santé animale

Mme Claire PONSART – Chef de l'unité des zoonoses bactériennes, Laboratoire de Santé Animale, Anses Maisons-Alfort - Bactériologie, zoonoses, diagnostic de laboratoire

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

- CES SABA – 19 novembre et 17 décembre 2024

Président

M. Gilles MEYER – Professeur, ENVT + virologie, immunologie, vaccinologie

Membres

M. Xavier BAILLY – Ingénieur de Recherche, INRAE Saint Genes Champanelle - Épidémiologie moléculaire, écologie de la santé, épidémio-surveillance, modélisation, bactériologie

Mme Catherine BELLOC – Professeur, Oniris - École Vétérinaire de Nantes - Infectiologie, approche intégrée de la santé animale, maladies des monogastriques

M. Stéphane BERTAGNOLI – Professeur, École Nationale Vétérinaire de Toulouse - Virologie, immunologie, vaccination, maladies des lagomorphes

M. Alain BOISSY – Directeur de Recherche INRAE Clermont-Ferrand – Theix - Bien-être animal

Mme Séverine BOULLIER – Professeur, École Nationale Vétérinaire de Toulouse – Immunologie, vaccinologie

M. Henri-Jean BOULOUIS – Retraité, École Nationale Vétérinaire d'Alfort - Bactériologie, diagnostic de laboratoire, immunologie, vaccinologie

Mme Aurélie COURCOUL – Directrice de la Recherche et des Etudes Doctorales, Oniris - École Nationale Vétérinaire de Nantes - Épidémiologie, appréciation des risques (modélisation), réglementation

Mme Alice DE BOYER DES ROCHES – Professeur, VetAgro Sup - Bien-être animal, animaux de rente, douleur, comportement, zootechnie

Mme Barbara DUFOUR – Professeur émérite, École Nationale Vétérinaire d'Alfort - Épidémiologie, maladies infectieuses, analyse du risque, zoonoses, lutte collective

Mme Emmanuelle GILOT-FROMONT – Professeur, VetAgro Sup – Épidémiologie quantitative, évaluation de risque, interface faune sauvage-animaux domestiques, maladies réglementées

M. Etienne GIRAUD – Chargé de recherche, INRAE Toulouse – Microbiologie, antibiotiques, antibiorésistance, environnement, écologie microbienne

M. Lionel GRISOT – Vétérinaire praticien - Médecine vétérinaire, médicament vétérinaire, maladies des ruminants

Mme Claire GUINAT – Chargée de Recherche, INRAE Toulouse - Épidémiologie, génétique (analyses phylodynamiques), maladies infectieuses

Mme Nadia HADDAD – Professeur, École Nationale Vétérinaire d'Alfort - Infectiologie, maladies réglementées, zoonoses

Karine HUBER – Directrice de recherche, INRAE - Entomologie médicale et vétérinaire, maladies vectorielles, épidémiologie

Mme Elsa JOURDAIN – Chargée de recherche, INRAE Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes-Zoonoses, épidémiologie, interface faune sauvage-animaux domestiques

M. Hervé JUIN – Ingénieur de recherches, INRAE Centre Poitou-Charentes – Bien-être animal, physiologie et nutrition des volailles

Mme Sophie LE BOUQUIN – LE NEVEU – Cheffe d'Unité Adjointe, Unité Épidémiologie, Santé et Bien-Etre, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort - Épidémiologie, évaluation de risque, approche intégrée de la santé animale

Mme Caroline LE MARÉCHAL – Chargée de projet - Responsable LNR Botulisme aviaire, Unité HQPAP, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort - Bactériologie, diagnostic de laboratoire, zoonose, botulisme aviaire, clostridies

Mme Sophie LE PODER – Maître de conférences, École Nationale Vétérinaire d'Alfort - virologie, immunologie, vaccinologie

M. Yves MILLEMANN – Professeur, École Nationale Vétérinaire d'Alfort – Pathologie des ruminants, infectiologie, antibiorésistance, médicament vétérinaire

M. Pierre MORMÈDE – Directeur de recherche émérite INRAE - Bien-être animal, stress

Mme Carole PEROZ – Maître de conférences, VetAgro Sup – Infectiologie, maladies réglementées, approche intégrée de la santé animale

Mme Claire PONSART – Chef de l'unité des zoonoses bactériennes, Laboratoire de Santé Animale, Anses Maisons-Alfort - Bactériologie, zoonoses, diagnostic de laboratoire

Mme Céline RICHOMME – Chargée de projets scientifiques, Anses-Laboratoire de la rage et la faune sauvage de Nancy – Épidémiologie, faune sauvage, interface faune sauvage-animaux domestiques, écologie

M. Claude SAEGERMAN – Professeur, Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège - Épidémiologie, évaluation de risque et biosécurité

M. Jean-François VALARCHER – Professeur, Swedish university of agricultural sciences (SLU) – Pathologie des ruminants, infectiologie, Immunologie, épidémiologie

Mme Isabelle VALLÉE – Chef de l'unité BIPAR, Responsable LNR Parasites transmis par les aliments, Anses Maisons-Alfort – Parasitologie, zoonoses, immunologie, diagnostic

Mme Agnès WARET-SZKUTA – Maître de conférences, École Nationale Vétérinaire de Toulouse – Pathologie porcine, épidémiologie

Mme Natacha WORONOFF-REHN – Directrice, laboratoire vétérinaire départemental du Doubs – Infectiologie, parasitologie immunologie, biologie moléculaire, diagnostic

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme Justine CORRE – Coordinatrice scientifique – Anses, DER Unité d'évaluation des risques liés au bien-être, à la santé et à l'alimentation des animaux, et aux vecteurs

Mme Florence ÉTORÉ – Cheffe d'unité – Anses, DER Unité d'évaluation des risques liés au bien-être, à la santé et à l'alimentation des animaux, et aux vecteurs

Secrétariat administratif

M. Régis MOLINET – Anses

ANNEXE 2 PROTOCOLE DE SAUVEGARDE DE LA GENETIQUE D'UN ELEVAGE RECONNU INFECTE DE BRUCELLOSE

Les objectifs de ce protocole sanitaire sont de :

- disposer d'un protocole permettant de sauvegarder le matériel génétique de certains animaux de l'élevage infecté de brucellose bovine, choisis sur leur valeur génétique par l'éleveur, afin de lui permettre, après abattage des animaux de son troupeau, de redémarrer une production de valeur génétique comparable à celle du troupeau actuel (sous condition de l'accord de la Commission européenne) ;
- s'assurer que le matériel génétique sauvegardé, ne sera pas de nature à générer, par la suite, une résurgence du foyer de brucellose bovine.

Le protocole développé tient compte des travaux et des recommandations publiées par la Société Internationale de Transfert Embryonnaire (IETS - *international embryo transfer society*). Il précise les différentes étapes qui permettent d'aboutir au prélèvement et à la congélation des embryons. Il s'appuie sur la production d'embryons qui sont obtenus soit *in vivo* après insémination des femelles donneuses, sélectionnées sur leur statut sanitaire présumé indemne de brucellose bovine.

Réglementation européenne et internationale (OIE – OMSA)

- La loi de Santé Animale (LSA) et le code OIE ne font aucune différence entre *B. abortus* et *B. melitensis* dans ses dispositions concernant la brucellose bovine notamment (en conséquence tous les textes plus anciens faisant référence à la brucellose bovine à *B. abortus* s'appliquent de fait à la brucellose due à *B. melitensis*).
- Le statut indemne d'un établissement est conditionné notamment au fait que tous les produits germinaux (embryons compris) introduits ou utilisés dans l'établissement proviennent d'élevages indemnes d'infection à *B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis* sans vaccination ou d'établissements agréés de produits germinaux (qui doivent également être indemnes de Brucellose) (RÈGLEMENT DÉLÉGUÉ (UE) 2020/689 - Annexe IV partie I Chapitre 1 Section 1 paragraphe f).
- Le code OIE Chapitre 8.4 – paragraphe article 8.4.18 mentionne l'obligation d'être indemne de brucellose pour l'élevage d'origine des femelles donneuses.
- Le manuel de l'IETS et le Code OIE Chapitre 4.8 – Article 4.8.4 décrivent les exigences sanitaires applicables aux donneuses d'embryons : indemnes de signes cliniques ; ne doivent pas provenir d'un élevage sous mesures de restriction, à l'exception des maladies listées en catégorie 1 du manuel de l'OIE.

- Le Code OIE Chapitre 4.8 – Article 4.8.1.4 ouvre la possibilité de le faire pour *B. abortus* avec la classification de *B. abortus* en catégorie 1 en fonction du risque de transmission de la maladie pour les embryons produits *in vivo* : maladie pour laquelle il y a suffisamment de données scientifiques permettant de considérer que le risque de transmission est négligeable si les embryons ont été produits et manipulés selon les recommandations du Manuel de l'IETS.

Exigences à satisfaire sur les femelles sélectionnées, en vue de la collecte ou de la production et de la conservation, d'embryons produits *in vivo*

Sur les génisses de haute valeur génétique présentant les garanties sanitaires listées ci-après, la technique de collecte d'embryons produits *in vivo* et la congélation de ces embryons pourra être mise en œuvre.

Critère de sélection des génisses donneuses d'embryons

- Génisses pubères n'ayant pas été mises à la reproduction préalablement dans l'élevage infecté ;
- Génisses mises à l'isolement du reste du troupeau après l'obtention d'un résultat sérologique négatif pour l'ensemble des tests EAT / iELISA / FC ;
- Génisses ne présentant pas de signes cliniques (examen clinique) le jour de démarrage du protocole.

Critère de sélection du taureau utilisé

Le sperme utilisé pour les inséminations devra être issu d'un taureau agréé pour la monte publique.

Protocole type et examens complémentaires requis sur les génisses

La réalisation d'examens complémentaires est requise sur les femelles donneuses avant la collecte des embryons ou des ovocytes. Le statut sanitaire des embryons produits devra également être vérifié par des examens complémentaires réalisés à partir de différents échantillons (milieux de collecte, milieux de lavage et embryons dégénérés ou ovule non fécondé pour les embryons produits *in vivo*).

a - Examens à réaliser 17 jours avant la collecte des embryons

Toutes les femelles choisies par l'éleveur pour la conservation de leur matériel génétique devront être soumises individuellement aux examens suivants :

- résultat sérologique négatif pour l'ensemble des tests EAT / iELISA / FC à partir d'un prélèvement de sérum ;
- un examen clinique permettant de constater l'absence de signes cliniques de maladie ainsi que l'intégrité de l'appareil génital. Les résultats de ces examens seront communiqués à la DDPP.

La collecte des embryons et la mise en paillettes pour congélation et conservation, ne pourront être effectuées qu'après obtention de résultats négatifs ou favorables aux examens et contrôles listés ci-dessus.

b – Protocole type à appliquer : superovulation sur synchronisation des chaleurs

Le traitement ci-dessous est le plus rapide en termes de planification et devrait être recommandé pour limiter la période d'attente avant la collecte des embryons. Il est constitué d'une pose de spirale vaginale (J0), d'un traitement de superovulation (hormone FSH, 2 injections / j ; injection de prostaglandines à la 5^{ème} injection de FSH). Après retrait de la spirale, deux inséminations sont réalisées sur chaleurs observées et la collecte a lieu sept jours après insémination.

Tous les embryons seront congelés pour la méthode de transfert direct, en attendant les résultats des analyses sanitaires.

c - Examens à réaliser le jour de la collecte des embryons produits *in vivo*

Toutes les femelles dont l'éleveur aura choisi de conserver les embryons et qui satisfont aux exigences du a) devront être soumises individuellement, le jour de la collecte, aux examens suivants :

- un examen clinique permettant de constater l'absence de signes cliniques de maladie ainsi que l'intégrité de l'appareil génital ; en cas d'anomalie constatée à ce stade, aucune collecte d'embryons ne pourra être envisagée sur les animaux concernés ;
- une prise de sang (tube sec) pour test sérologique EAT / iELISA / FC aboutissant à des résultats négatifs sur tous les tests réalisés ;
- un examen de recherche du génome bactérien de *Brucella* réalisé par la méthode RT-PCR et recherche de la bactérie par culture bactériologique sur un échantillon du liquide de collecte ;
- un examen de recherche du génome bactérien de *Brucella* réalisé par la méthode PCR TR et recherche de la bactérie par culture bactériologique sur les ovules non fécondés et/ou sur les embryons dégénérés ; en cas de résultat positif à l'un de ces examens, les embryons qui auront été congelés seront détruits.

Une attention particulière sera portée à l'application des bonnes pratiques mentionnées dans le manuel de l'IETS :

- vérifier l'intégrité de la zone pellucide des embryons (ne pas autoriser les biopsies) ;
- respecter la dilution 1/100^{ème} entre chaque lavage (et changer la pointe de la pipette à chaque lavage) ;
- trypsiner les embryons lors des 10 lavages réglementaires (trypsine utilisée par exemple pour l'IBR et demandée par certains pays à l'export) ;
- réaliser un examen de recherche du génome bactérien de *Brucella* par la méthode RT-PCR et recherche de la bactérie par culture bactériologique sur les trois derniers bains de lavage ; en cas de résultat positif à l'un de ces examens, les embryons qui auront été congelés seront détruits.

Les embryons collectés sur ces vaches pourront être traités en lot notamment pour ce qui concerne les opérations de lavage et de congélation, à condition de ne pas mélanger les embryons de vaches donneuses différentes.

Ils ne pourront être remis en place qu'après réalisation des examens listés en c). et obtention des résultats négatifs ou favorables attendus.

d - Examens à réaliser le jour de l'abattage des vaches donneuses d'embryons produits *in vivo*

Toutes les femelles donneuses d'embryons qui satisfont aux exigences précédentes devront être soumises individuellement, après abattage, aux examens listés ci-dessous :

- réalisation de deux écouvillons vaginaux (référence : Copan modelé 480CE eSwab™) et,
- prélèvement des ganglions rétro-pharyngiens, rétro-mammaires et génitaux, rate, utérus et ovaires qui seront soumis à une recherche du génome bactérien de *Brucella* réalisé par la méthode PCR TR et recherche de la bactérie par culture bactériologique aboutissant à l'obtention d'un résultat négatif ;
- une prise de sang (tube sec) pour test sérologique EAT / IELISA / FC.

Seuls les embryons produits à partir d'animaux ne présentant pas de résultats positifs seront conservés. Ces embryons ne pourront être remis en place que sur des femelles receveuses de l'élevage (opération de monte privée réalisée sur les femelles de repeuplement).

e – Précautions à prendre lors de la manipulation des donneuses et des embryons

L'utilisation de matériel jetable sera privilégiée pour la réalisation de l'insémination et la collecte : sonde de collecte, consommables pour la collecte et la recherche des embryons.

Le protocole de désinfection du matériel non jetable sera établi selon les recommandations du LNR, avec l'utilisation d'un désinfectant validé pour l'inactivation de *Brucella*.

Le personnel manipulant les animaux lors de la pose et retrait de spirale, insémination et collecte devra porter des équipements de protection individuels, comportant *a minima* : combinaison et surbottes jetables, paire de gants, masque FFP2 et lunettes de protection.

ANNEXE 3 QUALITATIFS DES PROBABILITES POUR L'ESTIMATION QUALITATIVE DU RISQUE

Tableau 3 : Valeurs chiffrées proposées par chaque qualificatif de probabilité et correspondance avec les valeurs ordinales (Afssa 2008)

Echelle ordinale	Qualitatifs
0	Nulle
1	Quasi-nulle
2	Minime
3	Extrêmement faible
4	Très faible
5	Faible
6	Peu élevée
7	Assez élevée
8	Elevée
9	Très élevée

ANNEXE 4 MODALITES D'EXPRESSION, DE QUALIFICATION ET D'ATTRIBUTION DES « INDICES D'INCERTITUDE »

Tableau 4 : Modalités d'expression, de qualification et d'attribution des « indices d'incertitude » de la notation

Expression de l'incertitude		Critères d'attribution des indices d'incertitude
Indice (i)	Qualification	
1	Faible	La note attribuée est fondée sur des résultats convergents d'études scientifiques ou sur un système de collecte de données de fiabilité reconnue.
2	Moyen	La note attribuée est fondée sur un nombre limité d'études scientifiques ou sur un système de collecte de données de fiabilité limitée ET la présence de convergence entre auteurs et/ou experts.
3	Elevé	La note attribuée est fondée sur : - un nombre limité d'études scientifiques ou sur un système de collecte de données de fiabilité limitée ET l'absence de consensus entre auteurs et/ou experts ; - ou sur un avis individuel d'expert en l'absence d'études scientifiques ou de système de collecte de données.
4	Absence de données	Aucune note n'est attribuée du fait de l'absence totale de données et d'avis d'expert.