
**Demande d'Appui Scientifique et Technique
pour définir et évaluer bibliographiquement les critères
préalables à une approche vaccinale contre la brucellose
chez les bouquetins du massif du Bargy**

**Demande d'AST 2016-SA-0146
Saisine liée 2014-SA-0218**

**RAPPORT
d'appui scientifique et technique**

Juillet 2016

Mots clés

Bouquetin, brucellose, *Brucella melitensis*, *Capra ibex*, chèvre domestique, expérimentation vaccinale, expérimentation faune sauvage, massif du Bargy, ruminant sauvage, souche Rev.1, vaccin OVIREV®, vaccination.

Bargy mountains, brucellosis, *Brucella melitensis*, *Capra ibex*, domestic goat, experimentation on wildlife, OVIREV® vaccine, Rev1 strain, vaccination, vaccine testing, wild ruminants

Présentation des intervenants

PARTICIPATION ANSES

Co-coordination scientifique

Mme Charlotte DUNOYER – Anses-DER-Uersaba

Contribution scientifique

Mme Maryne JAY – Unité Zoonoses Bactériennes - Laboratoire de Santé Animale – Anses – Maisons-Alfort

Mme Claire PONSART – Chef d'Unité Zoonoses Bactériennes – Laboratoire de Santé Animale – Anses – Maisons-Alfort

Mme Elodie MONCHÂTRE-LEROY – Directrice du Laboratoire de la Rage et de la Faune Sauvage- Anses – Nancy

M. Jean-Claude ROUBY - Chef de l'unité Evaluation des médicaments immunologiques – Agence Nationale du Médicament Vétérinaire – Anses - Fougères

Secrétariat administratif

M. Régis MOLINET – Anses

PARTICIPATION ONCFS

Co-coordination scientifique

Mme Sophie ROSSI – Unité Sanitaire de la Faune

Contribution scientifique

M. Jean-Louis BLANC : Directeur interrégional PACA-Corse

M. Jean-Yves CHOLLET – Chef de l'Unité Sanitaire de la Faune

M. Antoine GREILLER – Service départemental de Haute-Savoie

M. Jean-Philippe HERBAUX – Chef du Service départemental de Haute-Savoie

Mme Nirmla SEON-MASSIN – Directrice adjointe de la Recherche et de l'Expertise

Mme Carole TOÏGO – Unité Faune de Montagne

GRUPE DE TRAVAIL DE LA SAISINE 2014-SA-0218

Sollicitation d'experts du GT pour assurer le lien entre la saisine 2014-SA-0218 et la demande d'AST

M. Jose Maria BLASCO – Chercheur, Cita Gobierno De Aragon (Espagne) – Compétences en brucellose domestique et sauvage, vaccinologie, épidémiologie

M. Bruno GARIN-BASTUJI – Directeur de Recherche, Direction des affaires européennes et internationales, Anses - Compétences en bactériologie – brucellose, tuberculose

M. Dominique GAUTHIER – Directeur du Laboratoire Départemental d'Analyses des Hautes-Alpes – Compétences en éthologie des bouquetins, connaissance du massif du Bargy, faune des Alpes

M. Christian GORTAZAR – Chef de département (SaBio), Universidad de Castilla - La Mancha (Espagne) - Compétences en surveillance sanitaire de la faune sauvage, modélisation appliquée aux populations sauvages

M. Luca ROSSI – Vice-directeur de l'école d'agronomie et de médecine vétérinaire, chef d'unité de recherche à l'université de Turin (Italie) – Compétences en physiologie et immunologie des bouquetins, surveillance sanitaire de la faune sauvage, faune des Alpes

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

M. Yves CAZEAU, directeur du GDS des Pyrénées Atlantiques

Mme Corinne NOVELLA, Laboratoire des Pyrénées et des Landes

M. Olivier NOVELLA, cabinet vétérinaire Pyrénées Atlantiques

CONTRIBUTIONS EXTÉRIEURES À L'AGENCE ET A L'ONCFS

Expérimentation sur faune sauvage : MM. Yann LOCATELLI, directeur adjoint, Réserve Zoologique de la Haute Touche, responsable scientifique et expérimentation et R. SIMON, directeur, Réserve Zoologique de la Haute Touche – Museum National d'Histoire Naturelle

Biologie du bouquetin, animaux sauvages en captivité : M. Alexis LECU, Docteur Vétérinaire du Parc zoologique de Paris, Président de l'Association Francophone des Vétérinaires de Parc Zoologique (AFVPZ)

Expérimentation sur chèvres : MM. Pierre SARRADIN, directeur de la Plateforme d'Infectiologie expérimentale (PFIE) de Nouzilly et Edouard GUITTON, directeur-adjoint de la PFIE, INRA Centre Val de Loire.

Table des matières

Présentation des intervenants.....	3
1 Contexte, objet et modalités de réalisation des travaux.....	6
1.1 Contexte.....	6
1.2 Objet de la demande	6
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	6
2 Critères préalables à une approche vaccinale contre la brucellose chez les bouquetins	8
2.1 Résumé des critères à évaluer et des apports de la littérature.....	8
2.2 Notion de praticabilité.....	12
2.3 Conclusions.....	13
3 Approches expérimentales : utilité et faisabilité.....	14
3.1 Critères nécessitant une approche expérimentale	14
3.2 Disponibilité des animaux prélevés en nature ou nés en captivité	15
3.2.1 Disponibilité des bouquetins nés en nature	15
3.2.2 Disponibilité des bouquetins nés en captivité	16
3.2.3 Disponibilité de chèvres domestiques	17
3.3 Pré-requis réglementaires & logistiques à l'expérimentation sur des animaux de la faune sauvage	17
3.3.1 Dérogation à la destruction d'espèce protégée	17
3.3.2 Protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.....	18
3.3.3 Niveau de confinement	18
3.3.4 Autorisation du projet	19
4 Conclusions	23
5 Bibliographie.....	25
Annexe 1 : Lettre de la demande.....	28

1 Contexte, objet et modalités de réalisation des travaux

1.1 Contexte

Suite à la découverte de deux cas humains de brucellose en 2011, associés à la consommation de lait cru issu d'un élevage bovin laitier en France (Haute Savoie), la présence d'un réservoir sauvage de *Brucella melitensis* biovar 3 a été confirmée en 2012, dans une population de Bouquetin des Alpes (*Capra ibex*) du massif du Bargy (Hars et al. 2013). Cette population de bouquetins a fait l'objet d'études approfondies depuis lors, mettant en évidence une forte séroprévalence (>40%) et un important portage de la bactérie entre 2012 et 2016 (Hars et al. 2015, Freycon 2015, Marchand et al. 2016). La gestion de ce foyer sauvage s'est appuyée sur des abattages partiels ciblés ou non (selon le statut sérologique des animaux) qui ont conduit à diviser par deux la taille de la population, sans permettre néanmoins de diminuer la prévalence de la maladie, ni d'assainir la population (Anses 2015, Marchand et al. 2016). Saisie à plusieurs reprises sur ce sujet, l'Anses a notamment conduit en 2015 une expertise consistant à analyser les données de suivi depuis 2012 sur les bouquetins du massif du Bargy et à évaluer l'efficacité relative des différents modes de lutte sanitaire (Anses 2015). Cette expertise a mis en évidence l'intérêt de la vaccination, en complément d'abattages ciblés, pour le contrôle de la brucellose dans cette population. Les experts ont recommandé l'utilisation du vaccin Rev.1 (vivant atténué) par voie conjonctivale (CR1V) mais ont également recommandé de vérifier l'innocuité de ce vaccin chez le bouquetin avant son utilisation sur le terrain.

1.2 Objet de la demande

Dans la continuité de ces travaux d'évaluation de risque, la DGAL (ministère en charge de l'Agriculture) a sollicité, le 22 juin 2016, un appui scientifique et technique, conjointement auprès de l'Anses et de l'ONCFS, pour définir et évaluer bibliographiquement les critères préalables à une approche vaccinale contre la brucellose chez les bouquetins du massif du Bargy. Les termes de l'AST ont été déclinés selon les 3 points suivants (résumés, voir courrier d'AST en annexe 1)

P1) Quels doivent être les critères incontournables à évaluer en perspective d'une utilisation de la vaccination notamment en perspective d'un maintien du noyau sain ?

P2) Quelles sont les connaissances de la bibliographie qui permettent d'évaluer ces critères ?

P3-1) Quels sont les critères dont l'évaluation nécessite une approche expérimentale ou des travaux scientifiques complémentaires ?

P3-2) Quelles sont les approches possibles et quelle est la faisabilité de ces protocoles expérimentaux/scientifiques ? En ce qui concerne d'éventuels essais vaccinaux quelles sont les conditions de captivité, de semi-captivité, de liberté ?

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'analyse de la demande d'AST a mis en évidence un recoupement de certaines questions de l'AST avec le traitement de la saisine 2014-SA-0218, dans la mesure où une étude bibliographique

sur la vaccination de la faune sauvage contre la brucellose, avait été menée par le Groupe de Travail (GT) en charge de cette saisine.

Compte tenu du très court délai imparti pour le traitement de cette demande d'AST et du caractère encore très récent du rapport Anses 2015, l'Anses et l'ONCFS ont décidé d'appuyer les réponses aux questions 1, 2 et 3-1 sur le contenu du rapport et de l'Avis Anses 2015 et de traiter la question 3-2 en sollicitant plusieurs experts internes et externes en appui scientifique et technique. Des experts du GT de la saisine 2014-SA-0218 ont notamment été sollicités pour assurer le lien entre la saisine et la présente demande.

Deux réunions téléphoniques se sont déroulées les 26 juin et 8 juillet 2016. Un projet de rapport a été produit par les co-responsables de l'AST le 18 juillet 2016, complété par les différents experts entre le 18 et le 26 juillet 2016. Le présent rapport tient compte des contributions de chacun. Il a été validé conjointement par les Directions Générales respectives de l'Anses et de l'ONCFS.

2 Critères préalables à une approche vaccinale contre la brucellose chez les bouquetins

Réponse aux questions 1 et 2.

2.1 Résumé des critères à évaluer et des apports de la littérature

Les critères à évaluer ont fait l'objet d'un développement dans l'Avis de l'Anses de 2015 (saisine 2014-SA-0218) et sont concordants avec les critères listés *a minima* par le demandeur de l'AST.

Le tableau 1 ci-dessous récapitule l'ensemble des éléments traités dans l'Avis Anses 2015. Les experts avaient notamment conclu que si une stratégie vaccinale était envisagée, le vaccin anti-brucellique utilisant la souche Rev.1, administré par voie conjonctivale (vaccin OVIREV®) et bénéficiant d'une AMM chez la chèvre et le mouton, utilisé à la dose préconisée pour les petits ruminants, serait potentiellement celui qui conviendrait le mieux pour réduire la diffusion de l'infection au sein de la population de bouquetins.

Il convient de préciser que d'autres travaux d'expertise ont été produits sur ce vaccin conjonctival OVIREV®, notamment sur son innocuité chez les ruminants domestiques (Anses 2015, Afssa 2007, Afssa 2008), en lien avec son utilisation dans les années 90 en région PACA, pour lutter contre la brucellose des petits ruminants (Afssa 2007) et plus récemment pour la lutte contre l'épididymite contagieuse du bélier dans les Pyrénées Atlantiques (Afssa 2008).

Au vu des connaissances acquises par la littérature et lors de l'utilisation du vaccin OVIREV® chez les ruminants domestiques, il convient de rappeler que ce médicament vétérinaire immunologique, s'il est employé chez un mouton ou une chèvre sexuellement mature peut, chez l'animal vacciné, entraîner une séroconversion durable et causer un avortement chez les femelles gestantes, si le vaccin est administré pendant la gestation (et uniquement dans ce cas). La souche peut être alors transitoirement excrétée par ces femelles. Le vaccin peut également induire une brucellose (atténuée) chez le manipulateur qui l'utiliserait sans appliquer les mesures de biosécurité requises. Ces inconvénients sont plus limités avec le vaccin administré par voie conjonctivale (actuellement utilisé en France) que par voie sous-cutanée. Il convient donc, quelle que soit l'espèce concernée, de privilégier le vaccin administrable par voie conjonctivale et d'éviter la vaccination des femelles gestantes ou en lactation pour limiter les risques d'avortement ou d'excrétion. Il convient également de sensibiliser le manipulateur au respect des mesures de biosécurité.

En complément des données expérimentales disponibles sur ovins ou caprins domestiques, il convient également de rappeler qu'aucun cas de retour vers la virulence n'a été constaté pour cette souche atténuée malgré son utilisation sur plusieurs dizaines de millions d'ovins et caprins de différentes régions du monde pendant plus de trente ans. De par cette expérience à très large échelle, un éventuel et hypothétique retour à la virulence après vaccination de quelques dizaines ou centaines de bouquetins apparaît négligeable. Par ailleurs, aucune donnée ni expérience ne permet de penser que la vaccination ait pu causer une épizootie ou des séroconversions notables chez les congénères des troupeaux traités, chez les animaux, voire les hommes vivant à leur proximité. A titre d'exemple : ce vaccin est actuellement utilisé en France dans les Pyrénées Atlantiques chez les agneaux, au sein de 3500 troupeaux mixtes ovins laitiers/bovins allaitants, sans qu'aucun problème n'ait été signalé chez les individus non-vaccinés, ni les personnes vivant au contact des troupeaux ovins vaccinés.

Concernant le risque de contamination humaine (au-delà du manipulateur) et des animaux domestiques : l'Avis Anses 2015 rappelle que les conséquences négatives éventuelles de

l'administration contrôlée de la souche vaccinale, apparaissent très faibles par rapport à celles de l'infection des animaux par la souche sauvage de *B. melitensis* présente dans le massif. En outre, comme exposé dans l'Avis Anses 2015, la vaccination doit permettre de limiter l'incidence de la maladie, notamment en réduisant significativement le risque d'avortements ou de mises bas de nouveau-nés infectés et/ou associées à une excrétion. Tout ceci contribue à réduire l'infection dans la population de bouquetins, diminuant d'autant le risque de transmission aux cheptels domestiques, déjà considéré comme quasi-nul à minime (1-2 sur une échelle de 0 à 9) et le risque de transmission à l'homme, considéré comme quasi-nul (1 sur une échelle de 0 à 9) dans l'Avis Anses 2015.

Le développement de la réponse immunitaire chez le bouquetin n'est pas connu bibliographiquement. Il convient néanmoins de souligner que la situation présentée par la problématique de la brucellose du bouquetin sur le massif du Bargy bénéficie de certains éléments favorables, rarement disponibles dans le cadre de mesures de lutte vaccinale dans la faune sauvage (rappelés dans l'Avis Anses 2015), à savoir :

- l'existence d'une AMM pour le vaccin OVIREV® chez les ovins et les caprins ;
- la forte proximité phylogénétique entre la chèvre et le bouquetin.

Les approches classiques d'évaluation de l'efficacité d'un vaccin, avec épreuve virulente sur animaux, ne sont que rarement applicables aux espèces sauvages qui ne peuvent être confinées et manipulées comme les animaux domestiques. Il s'agit là d'une impossibilité technique fondamentale et incontournable, qu'il faut prendre en considération et qui conduit à rechercher des solutions expérimentales alternatives. Le chapitre suivant, consacré aux approches expérimentales, développe des propositions d'approches indirectes, non seulement pour l'innocuité du vaccin pour le bouquetin, mais également pour la connaissance du développement de la réponse immunitaire.

L'utilisation d'un vaccin possédant une AMM en France chez la chèvre et le mouton domestiques, apparaît donc comme la solution la plus adaptée pour une utilisation chez le bouquetin hors RCP selon le principe de la cascade, en respectant les règles de biosécurité d'usage pour le manipulateur.

Afin de sécuriser l'utilisation du vaccin dans des conditions de terrain, le Groupe de Travail avait, dans son Rapport Anses 2015, recommandé de vérifier au préalable l'innocuité de ce vaccin pour le bouquetin. Il est plus précisément recommandé ici de vérifier que l'innocuité est équivalente chez le bouquetin et les espèces domestiques pour lequel ce vaccin est autorisé. Cette vérification serait notamment à envisager à un stade sexuellement mature (hors gestation), qui est la classe la plus communément capturée dans la nature, sur le site du Bargy (Marchand et al. 2016).

La surveillance du foyer post-vaccination devra tenir compte de l'impossibilité de distinguer sérologiquement les individus vaccinés des individus infectés, en ciblant le dépistage sérologique et bactériologique sur des animaux non vaccinés, ce qui suppose un marquage visuel spécifique des sujets qui seront vaccinés.

Tableau 1 : Apports de l'Avis Anses 2015 aux questions 1, 2 et 3-1 de la demande d'AST

Questions AST	Éléments du rapport Anses	Références bibliographiques
1 : Quels doivent être les critères incontournables à évaluer en perspective d'une utilisation de la vaccination ? 2 : Quelles sont les connaissances bibliographiques qui permettent d'évaluer ces critères ?		
Les critères suivant sont <i>a minima</i> à développer sur la base des <u>vaccins existants</u> :	<p>Dans le contexte du Massif du Bargy (infection de bouquetins, c'est-à-dire de caprinés proches de la chèvre par <i>B. melitensis</i> biovar 3), la seule souche vaccinale qui pourrait être proposée pour le bouquetin serait donc la souche de <i>B. melitensis</i> Rev.1, la seule reconnue suffisamment sûre et efficace pour une vaccination des chèvres domestiques contre cette espèce de <i>Brucella</i>.</p> <p>Si une stratégie vaccinale était ainsi envisagée, le vaccin Rev.1, vaccin anti-brucellique de référence pour la chèvre, serait potentiellement celui qui conviendrait le mieux pour réduire la diffusion de l'infection au sein de la population de bouquetins. Utilisé à la dose préconisée pour les petits ruminants (0,5-2 x 10⁹UFC) et administré par voie conjonctivale aux jeunes animaux impubères, ce vaccin serait celui qui, malgré les difficultés pratiques (capture, contention, marquage, répétition annuelle), induirait le moins de risques pour l'environnement et permettrait de maintenir un suivi de la population par sérologie (tableau 9 p 130)</p>	<p>Anses, 2015 p 127</p> <p>Anses, 2015, p 131</p>
- L'innocuité après administration à l'animal	<p>Aucune étude n'a été menée jusqu'ici pour tester les souches vaccinales disponibles chez des bouquetins (<i>Capra ibex</i>), ni chez d'autres caprinés en dehors de la chèvre domestique. La taxonomie du genre <i>Capra</i> relève d'une spéciation récente ; cette taxonomie n'a pas évolué depuis quelques décennies et mériterait une révision au vu des études génétiques et phylogéniques récentes. Il s'avère en particulier que le bouquetin des Alpes s'hybride régulièrement tant en captivité qu'en nature avec la chèvre domestique (<i>Capra aegagrus hircus</i>), en donnant des produits en F1 féconds. Cela illustre que la distanciation génétique et la vicariance érigeant un taxon au rang d'espèce ne sont pas achevées. Ainsi, le bouquetin pourrait être considéré comme très proche de la chèvre. Il est donc possible d'admettre que les données relatives à la chèvre puissent être en partie transposables au bouquetin, sachant qu'on ne dispose de données, ni sur la sensibilité de cette dernière espèce aux souches sauvages, ni sur sa sensibilité aux souches vaccinales disponibles, ni sur son aptitude à développer une immunité protectrice vis-à-vis du genre <i>Brucella</i> ; on ne peut cependant pas considérer d'emblée que ces caractéristiques seraient identiques chez la chèvre et le bouquetin des Alpes.</p> <p>La souche Rev.1 possède un pouvoir pathogène résiduel qui varie selon l'espèce, l'âge et l'état physiologique des animaux lors de la vaccination, la voie d'administration et la dose vaccinale. Elle peut être une cause d'avortements chez la brebis et la chèvre, notamment lorsqu'elle est administrée par la voie sous-cutanée à mi-gestation. En pratique, ces effets délétères sont évités ou minimisés en ciblant les périodes d'administration les moins à risque lorsque la vaccination doit être pratiquée sur l'ensemble des animaux des troupeaux, en privilégiant le mode d'administration par instillation conjonctivale, en ciblant la vaccination des jeunes avant la puberté (3-6 mois). La vaccination avec la souche Rev-1 est dénuée, dans tous les cas, d'effets délétères chez l'animal impubère.</p> <p>Chez les adultes, la vaccination est plutôt recommandée chez les animaux non-gestants, en fin de gestation ou pendant la lactation, pour limiter les avortements et/ou l'excrétion génitale potentiellement induits par le vaccin. Bien que l'innocuité ait été démontrée chez les brebis en lactation, chez la chèvre allaitante, le vaccin peut être excrété dans le lait mais très rarement.</p>	<p>Anses, 2015 p 127</p> <p>Anses, 2015, p 120-121 Blasco, 1997</p> <p>Alton 1985, 1987, Jones and Marly 1975</p>
- L'innocuité pour le manipulateur pendant l'administration	La souche Rev-1 a un pouvoir pathogène pour l'homme, nécessitant des équipements de protection et des précautions pour éviter sa contamination (piqûres, auto-injection, projection sur les lèvres ou dans l'œil) lors de leur administration à l'animal.	Anses, 2015 p 120
- La réversibilité de la souche vaccinale	La probabilité d'une réversion vers la virulence de la souche Rev.1 est négligeable ; en particulier, la possibilité d'un quelconque retour à la virulence suite à des recombinaisons avec des souches sauvages est considérée comme très improbable.	Anses, 2015, p 132
- Le développement de la réponse immunitaire	Même avec les vaccins jugés les plus efficaces, il faut considérer que la protection conférée est relative puisque la vaccination n'empêche pas dans tous les cas l'infection par une souche sauvage. La vaccination permet toutefois d'augmenter la dose minimale infectieuse par rapport à un animal non vacciné, de limiter l'intensité de l'infection et de réduire le risque d'excrétion, notamment en réduisant significativement le risque d'avortements ou de mises bas de nouveau-nés infectés et/ou associées à une excrétion. A l'échelon d'un troupeau, elle permet de limiter la diffusion de l'agent pathogène et de réduire le coût économique de la	Anses, 2015 p 121-122

	<p>maladie.</p> <p>Pour le Vaccin Rev.1, il a été démontré que la protection conférée chez les ovins est efficace au moins pendant deux gestations successives. D'autres données suggèrent l'existence d'une protection constante de la chèvre durant au moins 4 ans et demi après vaccination. Ces données sont corroborées par l'expérience acquise en Europe du Sud qui démontre que la durée de protection est vraisemblablement plus longue.</p>	<p>Verger et al. 1995 WHO 1986</p>
- L'interférence avec la surveillance pour le suivi de la situation liée à la réponse humorale	<p>Un inconvénient reconnu des souches vaccinales B19 et Rev.1 est d'induire la production d'anticorps dirigés contre le PS-O du lipopolysaccharide (LPS) bactérien (présent chez toutes les <i>Brucella</i> naturellement en phase S, <i>B. abortus</i> et <i>B. melitensis</i> notamment), rendant très difficile la différenciation entre les animaux vaccinés et infectés avec les tests sérologiques de dépistage utilisés classiquement (EAT, ELISA ou FC).</p> <p>En France, et d'une façon plus générale dans toute l'Union Européenne, l'emploi d'un vaccin Rev.1 administrable par instillation conjonctivale fut privilégié pour la vaccination des jeunes femelles ovines ou caprines. En effet, cette voie d'administration entraîne une réponse sérologique de faible intensité, limitée dans la majorité des cas à quelques mois et permettant la mise en place des contrôles sérologiques dès l'âge de 12-18 mois.</p> <p>Les risques sont aussi liés à l'impossibilité d'un suivi sérologique des animaux vaccinés pendant plusieurs années. Ce risque peut être néanmoins minimisé, un suivi sanitaire pouvant être organisé sur les animaux non vaccinés (les jeunes de l'année et les animaux ayant pu jusque-là échapper à la capture, donc encore non vaccinés) et sur les animaux vaccinés jeunes (à condition d'utiliser la vaccination intra-conjonctivale, induisant des traces sérologiques non durables – 4 mois maximum chez la chèvre et le mouton domestiques)</p>	<p>Anses, 2015 p 123</p> <p>Anses, 2015 p 49</p>
- La capacité de diffusion de la souche dans l'environnement	<p>En cas de vaccination de femelles gestantes, risque d'avortements → risque d'excrétion de la souche vaccinale. Vérifié chez brebis et chèvre par voie sous-cutanée.</p> <p>Lors d'avortements après vaccination chez des chèvres, la souche vaccinale est régulièrement présente dans le lait, les sécrétions vaginales et les avortons.</p> <p>Le risque d'impact sur la gestation peut être limité en tenant compte du rythme de reproduction chez cette espèce (période de rut en décembre-janvier et mises bas en juin-juillet) et en ciblant la vaccination en période de non gestation, ou en évitant de vacciner les femelles gestantes.</p>	<p>Blasco, 1997</p> <p>Anses, 2015 p 132 Anses, 2015 p 48</p>
- Le risque de contamination humaine (au-delà du manipulateur)	<p>Les conséquences négatives éventuelles de l'administration contrôlée de la souche vaccinale apparaissent, enfin, très faibles par rapport à celles de l'infection des animaux par la souche sauvage de <i>B. melitensis</i> présente dans le massif.</p>	<p>Anses, 2015 p 49</p>
- Le risque de contamination des animaux domestiques	<p>La vaccination permet d'augmenter la dose minimale infectieuse par rapport à un animal non vacciné, de limiter l'intensité de l'infection et de réduire le risque d'excrétion, notamment en réduisant significativement le risque d'avortements ou de mises bas de nouveau-nés infectés et/ou associées à une excrétion.</p>	<p>Anses, 2015 p 121-122</p>
- D'autres critères, secondaires à ce stade, sont à développer autant que possible dans les délais impartis tels que les contraintes liées à l'inoculation sur le plan logistique, financier et écologique.	<p>Un élément très important dans les essais réalisés est le mode d'administration du vaccin. L'administration manuelle individuelle (unique mode permettant une bonne homogénéisation de la suspension vaccinale et permettant de s'assurer de la dose de vaccin effectivement inoculée) nécessite la capture des animaux, avec tous les problèmes pratiques que pose cette capture.</p> <p>Ne peut être évalué sans l'établissement d'un protocole de vaccination</p>	<p>Anses, 2015 p 124</p>
3.1 : Quels sont les critères dont l'évaluation nécessite une approche expérimentale ou des travaux scientifiques complémentaires ?	<p>Au total, en préalable à toute éventuelle campagne de vaccination, il apparaît indispensable de conduire, <i>a minima</i>, des expérimentations destinées à vérifier la sensibilité du bouquetin des Alpes (mâles et femelles aux différents âges et stades physiologiques) à la souche Rev.1 en partant des modes d'administration privilégiant l'innocuité (voie conjonctivale) et les doses (0,5-2 x 10⁹ CFU) préconisées chez les caprins domestiques.</p>	<p>Anses, 2015 p 128</p>

2.2 Notion de praticabilité

Bien qu'il ne s'agisse pas d'un critère à évaluer en amont d'une utilisation du vaccin OVIREV® chez le bouquetin à proprement parler, la demande d'AST requiert des experts « *la prise en compte d'autres critères, secondaires à ce stade et à développer autant que possible dans les délais impartis, tels que les contraintes liées à l'innoculation sur les plans logistique, financier et écologique* ». Dans le court délai disponible, les experts ont précisé dans un 1^{er} temps, sur la base de l'expérience des équipes de l'ONCFS, les possibilités concrètes de déploiement logistique de la vaccination des bouquetins dans le massif du Bargy.

Dans la mesure où la vaccination suppose la prise en main des animaux pour instillation conjonctivale d'une part, et n'est pas efficace chez les animaux infectés d'autre part, l'opération suppose la capture des bouquetins, puis la réalisation à leur chevet d'un test sérologique rapide (celui-ci est disponible et validé) et d'un test de gestation (par échographie ou test rapide à valider), permettant d'établir si l'animal capturé est une femelle potentiellement gravide. Une fois ces opérations réalisées et le statut de l'individu connu, la vaccination peut être mise en œuvre sur les animaux séronégatifs non gestants, avec marquage spécifique (#vaccinés), les femelles séronégatives et gestantes, non vaccinées, étant marquées différemment et les individus séropositifs étant euthanasiés.

Compte tenu des connaissances acquises sur ce site par une équipe de l'ONCFS, et selon les techniques de capture actuellement connues et appliquées en France, sur ce massif (téléanesthésie), la capture des bouquetins est essentiellement réalisable entre mi-avril et mi-juin, avec un optimum du 20 avril au 1^{er} juin, lorsque les bouquetins descendent sur les pâtures. Au-delà de ces dates, les animaux retournent en altitude, les femelles suitées et leurs cabris sont particulièrement inapprochables et vigiles. La capture de quelques individus (une dizaine) à l'automne est parfois réalisable, mais sa conduite est dictée par les conditions météorologiques. Une baisse importante de la taille de population est connue pour augmenter la vigilance des bouquetins et limiter le succès de la capture (cf. expériences acquises dans les Dolomites ou en Vanoise suite à des épizooties). Dans la population de bouquetins du Bargy, qui a été estimée à 567 individus hors cabris en été 2013, contre 277 fin 2015 (notamment suite à abattages et euthanasies), les agents de terrain de l'ONCFS considèrent aujourd'hui que la capacité de capture est de l'ordre de 50 individus par printemps, auxquels peuvent s'ajouter, sans garantie, une dizaine d'individus à l'automne. Ces experts prévoient que cette capacité de capture pourra graduellement diminuer au cours du temps et qu'elle serait significativement réduite si un nouvel abattage massif devait à nouveau être conduit en amont de la vaccination. Actuellement, considérant que l'on peut miser sur 50-60 individus capturables, il est probable que :

- 18-25 (35-40%) d'entre eux soient séropositifs (sur la base des observations passées) et euthanasiés,
- 5 femelles soient gestantes, et soient marquées et relâchées sans être vaccinées
- 25-35 individus soient vaccinables et spécifiquement marqués.

La capture d'individus non-vaccinés plusieurs années de suite permettrait à la fois d'augmenter la taille du noyau d'animaux vaccinés (protégés) et aussi de surveiller le foyer sauvage. La recapture de quelques individus jeunes ou adultes non-vaccinés serait également informative sur le taux d'incidence.

Pour apporter plus de précisions notamment numériques et temporelles, quant à l'efficacité d'un protocole de vaccination à une échelle populationnelle, il serait nécessaire de reconduire une évaluation quantitative précise, qui dépasse le cadre du présent AST.

2.3 Conclusions

Au vu des connaissances bibliographiques et de l'expérience acquise sur le vaccin OVIREV® administré par voie conjonctivale chez les ruminants domestiques, les experts retiennent comme critères préalables indispensables à l'utilisation du vaccin OVIREV® chez le bouquetin, dans le milieu infecté du massif du Bargy, hors RCP et selon le principe de la cascade :

1. **La protection du manipulateur par la mise en œuvre de mesures de biosécurité ad hoc et de suivis médicaux réguliers**, déjà appliqués par les vétérinaires praticiens utilisant ce vaccin dans d'autres régions de France, pour des espèces domestiques et par les agents de terrain, régulièrement au contact des bouquetins du Bargy, potentiellement excréteurs d'une souche sauvage, beaucoup plus virulente que la souche Rev.1 pour l'homme. Le fait que l'administration de ce vaccin à des animaux sauvages en montagne puisse présenter davantage de risque d'exposition du manipulateur qu'une vaccination de petits ruminants domestiques, renforce l'importance d'appliquer ces mesures de biosécurité. Ce critère ne nécessite pas d'expérimentation particulière, mais une formation des agents appelés à manipuler le vaccin dans des conditions de terrain.
2. **la confirmation d'une innocuité équivalente du vaccin OVIREV® chez le bouquetin des Alpes et la chèvre domestique et l'évaluation de la capacité de diffusion de la souche dans l'environnement**. Ces critères sont les seuls nécessitant la mise en œuvre d'une expérimentation, couplée entre les deux espèces.
3. une **vaccination ciblée sur les bouquetins hors gestation ou lactation** afin de limiter le risque d'avortement et d'excrétion associé à la souche vaccinale. Ce critère ne nécessite pas d'expérimentation particulière.
4. un **marquage spécifique et discriminant des bouquetins vaccinés ou non vaccinés** et une **surveillance ciblée sur les bouquetins non vaccinés**, afin d'éviter toute interférence entre surveillance et vaccination. Ce critère ne nécessite pas d'expérimentation particulière.

Les autres critères listés dans la demande d'AST ont été analysés au travers du traitement de la saisine 2014-SA-0218 :

5. la réversibilité de la souche vaccinale : la probabilité d'une réversion vers la virulence de la souche Rev.1 est considérée comme négligeable dans l'Avis Anses 2015
6. le risque de contamination humaine (au-delà du manipulateur) et des animaux domestiques : l'Avis Anses 2015 rappelle que les conséquences négatives éventuelles de l'administration contrôlée de la souche vaccinale, apparaissent très faibles par rapport à celles de l'infection des animaux par la souche sauvage de *B. melitensis* présente dans le massif. En outre, la vaccination vise à réduire l'infection dans la population de bouquetins, diminuant d'autant le risque de transmission aux cheptels domestiques et à l'homme.
7. le développement de la réponse immunitaire chez le bouquetin n'est pas connu bibliographiquement mais peut faire l'objet d'une approche indirecte par l'expérimentation proposée au chapitre 3.

3 Approches expérimentales : utilité et faisabilité

3.1 Critères nécessitant une approche expérimentale

Compte tenu des éléments de la littérature présentés au précédent chapitre et conformément aux recommandations émises par le groupe d'experts de la saisine 2014-SA-0218, les critères à évaluer, préalablement à la mise en oeuvre de la vaccination chez le bouquetin du Bargy, seraient l'innocuité et l'évaluation de la capacité de diffusion dans l'environnement de la souche Rev.1 dans l'espèce *Capra ibex*, sous sa forme conjonctivale et aux doses recommandées chez les petits ruminants domestiques.

L'approche proposée pour vérifier l'innocuité chez le bouquetin est une approche indirecte comparée, possible du fait de l'existence d'une AMM pour le vaccin OVIREV® de la firme CEVA®, pour le mouton et la chèvre en France. Elle consiste à vérifier que ce vaccin présente le même pouvoir de colonisation des organes et le même potentiel de dissémination dans l'organisme et d'excrétion (diffusion de la souche) chez le bouquetin des Alpes (*Capra ibex*) que chez la chèvre domestique (*Capra hircus*), idéalement en comparant des appariements adéquats chèvre-bouquetin (ou, selon les modalités du protocole à affiner, deux lots équivalents de ces deux espèces). L'évaluation de ce critère suppose de conduire en parallèle deux expérimentations visant à vacciner par voie conjonctivale, puis d'euthanasier de façon séquentielle des bouquetins et des chèvres appariés (ou des lots équilibrés de bouquetins et de chèvres), pour la réalisation de sérologies et de cultures sur les organes classiquement examinés pour la recherche de la brucellose. Cette expérimentation d'innocuité ne nécessiterait pas la réalisation d'une épreuve virulente avec une souche de *Brucella* sauvage et devrait s'affranchir, de ce fait, de la nécessité de confinement au niveau A3 (voir ci-après).

Idéalement cette expérimentation devrait se réaliser sur une période de 3 mois, avec l'examen d'un 1^{er} lot à 30-45 jours puis un 2nd lot à 70-90 jours après vaccination, de manière à prendre en compte le potentiel de colonisation initial et la potentielle rémanence de la souche vaccinale dans les organes des deux espèces. La taille d'échantillon est à adapter en fonction du protocole et de la disponibilité des animaux et des bâtiments. Des groupes de 8-12 individus adultes apparaissent comme un compromis raisonnable au vu de l'issue létale d'une telle expérimentation. La présence d'un ou 2 individus contacts et leur suivi sérologique régulier dans chaque groupe sera à discuter lors de l'établissement éventuel d'un protocole précis. Le mélange des lots de chèvres et de bouquetins au sein des mêmes installations apparaît difficilement réalisable, au vu du comportement des deux espèces et du caractère distinct des installations dédiées aux caprinés sauvages et domestiques (voir ci-après). Pour autant, le fait de procéder à l'expérimentation comparée dans 2 installations distinctes ne serait pas de nature à compromettre les résultats, sous réserve que les autres facteurs susceptibles d'impacter les résultats de l'expérimentation soient standardisés pour chacune des installations (protocole de vaccination et d'analyse des échantillons ; lot unique de vaccin ; traitement et analyse standardisés des échantillons pour le suivi sérologique et la détection de la souche vaccinale).

En évaluant la dissémination de la souche vaccinale dans l'organisme de l'animal vacciné, son éventuelle diffusion dans l'environnement (objectivée par la présence de la souche vaccinale dans les différents organes, voire dans les excréments et les sécrétions) et le dénombrement de la bactérie dans les différents organes testés, par rapport à ces mêmes éléments chez la chèvre pour laquelle il existe une AMM, cette approche expérimentale indirecte comparée permettra non seulement d'objectiver l'innocuité du vaccin chez le bouquetin par rapport à la chèvre, mais également d'évaluer la réponse immunitaire du bouquetin à ce vaccin, en la comparant à la réponse de la chèvre. En effet, le dénombrement de la bactérie dans les organes, lymphoïdes

notamment, est un paramètre représentatif du rapport entre la virulence de la souche vaccinale et la réponse immunitaire de l'animal inoculé.

Dans la mesure où cette expérimentation viserait à vérifier l'innocuité du vaccin sur bouquetin, il convient d'y inclure des individus sains, non brucelliques, en privilégiant l'inclusion d'animaux de statut séronégatif et issus de populations indemnes (JM Blasco, com. pers.) afin d'éviter les interférences et confusions entre l'effet du vaccin et de la souche sauvage. Comme déjà recommandé par le groupe d'experts de la saisine 2014–SA-0218, la sélection d'animaux sexuellement matures mais hors gestation ou lactation apparaît adaptée dans ce cas, puisqu'il s'agit du statut majoritaire des bouquetins capturés dans le massif du Bargy et que la vaccination des femelles gestantes ou en lactation n'apparaît pas souhaitable.

En prenant en compte le coût d'un flacon de 50 doses de vaccin OVIREV®, même en utilisant un flacon par animal et en incluant les frais d'anesthésie et d'euthanasie, il est possible d'estimer que le coût des produits vétérinaires pour cette expérimentation serait inférieur à 200 € par individu. Le coût des cultures bactériennes et des sérologies est à évaluer en fonction du nombre d'animaux, du nombre d'organes explorés et des équipes de laboratoire impliquées. En première approche, sur la base des analyses effectuées jusqu'à présent pour les bouquetins du Bargy, un coût par individu peut être estimé à 1000 € (hors frais de transports de prélèvements et d'animaux).

3.2 Disponibilité des animaux prélevés en nature ou nés en captivité

3.2.1 Disponibilité des bouquetins nés en nature

En 2010, l'enquête menée par le 'réseau ongulés sauvages' estimait un effectif minimum de 9200 bouquetins vivant à l'état sauvage dans les Alpes françaises, ce chiffre se montant à près de 30 000 sur l'ensemble du massif alpin (UICN¹). Le massif du Bargy en comptait environ 280 fin 2015, avec des niveaux de séroprévalence brucellique variables au sein du massif (10 à 70% selon le secteur, Marchand et al. 2016). La capture des bouquetins en nature est dépendante des conditions de terrain (pentes, nivologie) et surtout de l'existence et la disponibilité d'équipes de professionnels de la faune formées et aguerries. En France, cette capture se pratique principalement au sein des équipes de l'ONCFS et des parcs nationaux Alps. Elle est également pratiquée régulièrement en Suisse et en Italie. Dans l'ensemble des massifs suivis par capture, l'approche des animaux est réalisée au printemps, entre le 20 avril et le 10 juin, lorsque les animaux descendent à l'herbe et au sel et que les femelles n'ont pas encore mis bas. La capture à l'automne est potentiellement réalisable sur certains sites mais est plus limitée (quelques individus) et dépendante des conditions météorologiques.

Il est possible de capturer, vacciner sur place et relâcher, avec un marquage spécifique, des animaux adultes nés en nature, de façon à pouvoir les tirer à balle en fin d'expérimentation. En revanche, la capture de bouquetins nés en nature pour ensuite les placer en captivité, en vue d'expérimentation en enclos ou bâtiment, apparaît peu souhaitable (voir discussion sur le niveau de confinement ci-après).

Diverses expériences existent, de maintien en captivité de bouquetins capturés en milieu sauvage, notamment chez le bouquetin ibérique, où la pratique a été développée pour les besoins de la gestion cynégétique et/ou de repeuplement (D. Gauthier, com. pers.). La revue de ces expériences montre que de façon générale, le maintien durant une courte période (quelques jours, < 2 semaines) est réalisable, mais que la détention sur plusieurs semaines ou mois se solde le plus souvent par des échecs, avec mortalité et dépression immunitaire, source notamment de pathologies typiques comme les entérotoxiémies ou myopathies dégénératives. Chez le bouquetin

¹ UICN, Union internationale pour la conservation de la nature

des Alpes, il existe une pratique historique : la restauration de l'espèce est passée par une première phase de constitution de pépinières en captivité, à partir d'individus issus du milieu naturel, fin XIX^{ème} – début XX^{ème} siècles. A l'époque, la seule voie viable avait été de capturer des nouveaux-nés après avoir tué la mère, la gestion d'adultes sauvages étant source de problèmes. Ces enclos de captivité ont perduré jusqu'à la seconde guerre mondiale, puis c'est le transfert direct de sujets capturés en milieu sauvage qui a prévalu. Au cours du XX^{ème} siècle et jusqu'aux années 70, le principe de rassembler les animaux en enclos de pré-lâcher pour les habituer au nouveau site prévalait, mais au vu des pertes ou accidents sanitaires (myopathies différées par exemple), cette pratique a été abandonnée au profit d'un transfert et d'un relâcher directs, dans un délai le plus court possible.

Plus récemment, les quelques expériences de maintien des individus sauvages en enclos sont de deux ordres

- accident lors de capture ("infirmerie" préconisée lors de toute opération de réintroduction) : ce dispositif a permis de soigner les animaux concernés mais, après une phase de récupération médicale, il y a eu généralement dépérissement des animaux et mort, d'où la recommandation de relâcher au plus vite, pour ne pas perdre les animaux par stress de contention
- besoins d'expérimentation : c'est notamment le cas pour l'étude de la transmission de la brucellose par le bouquetin des Alpes dans le Parc national du Gran Paradiso, où deux individus capturés en nature ont été mis en enclos avec des brebis, cet essai se soldant par la mort rapide ou l'euthanasie des animaux suite à dépérissement (Ferroglio et al. 2007).

Au vu de ces éléments de connaissance, un plan d'expérimentation sur la vaccination contre la brucellose du bouquetin, dont l'une des contraintes expérimentales majeures est de s'affranchir du risque d'interférence avec les phénomènes de dépression immunitaire liés au stress, ne peut se concevoir que sur des animaux déjà habitués à la captivité, ou *in natura* avec des dispositifs de traçabilité individuelle.

Dans le cas d'une expérimentation en nature il faudra, outre la disponibilité des équipes et des animaux, s'enquérir de l'acceptabilité locale de l'opération, sachant que les animaux vaccinés pour les besoins de l'expérimentation seraient relâchés sur place puis tirés à l'aide d'une arme à feu à l'issue de l'expérimentation, en vue des investigations post-vaccinales. Le coût d'une telle opération devra être évalué en fonction du nombre d'animaux et des équipes impliquées. En prenant comme référence les opérations conduites par l'ONCFS sur le Bargy, un coût d'opération de ~10 000 euros pour la capture d'une dizaine de bouquetins peut être avancé.

3.2.2 Disponibilité des bouquetins nés en captivité

Il existe environ 300 à 350 *Capra ibex* recensés dans les Zoos Européens membres de l'EAZA (association européenne des parcs zoologiques) (Alexis Lécu, com. pers.). Pour le Caprinae Taxon Advisory Group (TAG) de l'EAZA, il ne s'agit pas d'une espèce prioritaire à conserver dans les collections de zoos actuelles, par rapport à des caprins à plus haute valeur de conservation (comme le bouquetin de Nubie, par exemple). Le mot d'ordre est de ne les maintenir que dans les zoos dont la vocation est de présenter la biodiversité locale.

Une centaine de naissances de *Capra ibex* a été enregistrée depuis mai 2015 en Europe. Moins d'une dizaine de ces animaux, nés sur les 12 derniers mois, sont présents dans les parcs français concernés par cette espèce et par sa reproduction. Pour obtenir un effectif supérieur, le recours au niveau européen *via* le TAG de l'EAZA est envisageable.

La participation de parcs zoologiques à la fourniture de bouquetins nés en captivité (qui leur permet de gérer les surplus de leurs collections) ne devrait pas représenter de difficulté particulière, au regard de l'utilité de cette expérimentation pour les bouquetins en milieu sauvage. Il conviendra néanmoins d'apporter les explications nécessaires sur l'étape finale de

l'expérimentation, qui passe nécessairement par l'euthanasie des animaux, à des fins d'investigation des différents organes.

La mise à disposition des animaux est généralement gracieuse, mais le transport peut être relativement onéreux, en fonction de la provenance des animaux et du nombre de lots. Un ordre de grandeur de 1000 euros par individu peut être retenu en 1^{ère} analyse. Le transport de plusieurs individus issus d'un même site réduira les coûts.

La mise en enclos d'animaux issus de parcs zoologiques différents suppose une phase de quarantaine dédiée à la vérification du statut sanitaire des animaux après introduction, suivie d'une phase d'acclimatation et de mise en contact progressive de ces animaux, même s'ils sont nés en captivité. Ceci peut demander plusieurs semaines. Le confinement de ces animaux dans un bâtiment expérimental fermé, pour des durées supérieures à quelques jours n'est pas documenté, mais il est hautement probable que le stress de contention vécu par ces bouquetins, même nés en captivité, ne soit pas nul. Afin d'assurer les conditions optimales d'hébergement des animaux nécessaires au bon déroulement de l'expérimentation, des aménagements spécifiques du bâtiment existant sur le site de la Réserve de la Haute Touche devront être réalisés.

3.2.3 Disponibilité de chèvres domestiques

Les chèvres sont assez disponibles, soit dans les troupeaux de l'INRA, soit dans des troupeaux commerciaux à bon statut sanitaire. Le prix à l'unité, incluant le transport, peut aller de 100 à 350 €, selon l'âge, le statut sanitaire et la génétique. La disponibilité dépend du type d'animaux recherchés (jeune, adultes...) et du délai accordé à la recherche des animaux.

3.3 Pré-requis réglementaires & logistiques à l'expérimentation sur des animaux de la faune sauvage

3.3.1 Dérogation à la destruction d'espèce protégée

Qu'il soit né en nature ou en captivité, le bouquetin demeure une espèce protégée. Il est donc nécessaire, dans le cadre d'une expérimentation supposant l'euthanasie des animaux, de déposer une demande de dérogation à la destruction d'espèce protégée auprès de la préfecture concernée (Direction Départementale des Territoires, DDT). Cette demande est soumise à l'avis du CRPN ou CNPN (Conseil Régional / National de la Protection de la Nature²), puis fait l'objet d'une autorisation par le biais d'un arrêté préfectoral.

A titre informatif l'ONCFS dépose chaque année, auprès de la DDT de Haute Savoie, une demande de dérogation à titre d'étude afin de pouvoir capturer les bouquetins sur la zone Bargy et euthanasier les individus séropositifs. Si une expérimentation devait être lancée, elle devrait faire l'objet d'une demande spécifique auprès de la DDT concernée par le lieu d'expérimentation, argumentant en particulier sur l'utilité de l'étude et la nécessité d'euthanasie. Le laps de temps entre le dépôt de dossier par le demandeur, la réponse de l'administration et l'édition de l'arrêté préfectoral après avis du CNPN peut être plus ou moins long (par exemple : ~2.5 mois au printemps 2016).

En cas d'expérimentation en milieu contrôlé le responsable de l'établissement détenteur doit être titulaire d'un certificat de capacité pour l'entretien d'animaux d'espèces non domestiques (art. L.413-2 et suivants du CE). Les gestionnaires de parcs zoologiques sont capacitaires.

² <http://www.developpement-durable.gouv.fr/Presentation-du-Conseil-National.html>

3.3.2 Protection des animaux utilisés à des fins scientifiques

L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques est soumise à une réglementation spécifique lorsque les procédures appliquées sont susceptibles de causer « une douleur, une souffrance, une angoisse ou des dommages équivalents ou supérieurs à l'introduction d'une aiguille » (art. R. 214-89 du Code Rural et de la Pêche Maritime). Les espèces sauvages sont concernées, y compris lorsque ces procédures sont conduites en nature. Seules peuvent conduire ces travaux les personnes compétentes (formées, art. R. 214-101) au sein d'établissements agréés (art. R. 214-99), ayant obtenu une autorisation de projet du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, après évaluation éthique du comité d'éthique de l'établissement.

Le fait de mettre à mort des animaux uniquement pour récupérer des organes et tissus ne relève cependant pas de la réglementation de l'utilisation des animaux à des fins scientifiques (art. R.214-89). Ainsi, le projet d'expérimentation vaccinale sur des bouquetins ne serait visé que si les anesthésies nécessaires aux captures étaient considérées comme des actes relevant du champ d'application.

Concernant les expérimentations en captivité, en enclos ou en bâtiment, les conditions d'entretien des animaux dans les locaux font l'objet d'un chapitre du dossier d'agrément. Il y a ainsi nécessité de disposer d'une station expérimentale agréée pour l'espèce, ou la catégorie/groupe d'espèces (ici caprinés sauvages ou domestiques).

En France la seule structure capacitaire habilitée à héberger des bouquetins et agréée pour l'utilisation des animaux à des fins scientifiques est la Réserve Zoologique de la Haute Touche³, qui combine les statuts de parc zoologique et de station expérimentale. L'autorisation d'expérimentation à la Haute Touche est actuellement limitée aux cervidés (*C. elaphus* et *C. nippon*) et au sanglier. L'agrément comprenait les caprinés sauvages jusqu'en 2013. Il serait possible de redemander son attribution, à titre ponctuel, auprès de la DDPP de l'Indre. Concernant les bâtiments (voir ci-après), la construction d'une quarantaine adaptée aux caprinés sauvages (enclos ou bâtiment) serait un préalable indispensable à cette demande d'agrément.

Par ailleurs, la plate-forme d'infectiologie expérimentale (PFIE) de Nouzilly (INRA Centre Val de Loire), certifiée ISO9001, dispose déjà de tous les agréments, bâtiments et compétences nécessaires pour la réalisation d'une expérimentation de 90 jours sur la chèvre domestique, quel que soit le niveau de bio-confinement souhaité (1, 2 ou 3), sur des lots pouvant aller jusqu'à plusieurs dizaines de sujets. L'hébergement de bouquetins, quant à lui, apparaît impossible en l'état. Il ne pourrait s'envisager éventuellement *a minima* qu'avec des animaux conditionnés, sans doute originaires de parcs et non capturés, et dans des bâtiments qui devraient être adaptés. Même si elle a déjà eu l'occasion de mettre en œuvre des études en confinement sur faune sauvage (sanglier, blaireau), la PFIE n'a aucune expérience d'utilisation des petits ruminants sauvages.

3.3.3 Niveau de confinement

La demande d'AST propose d'examiner les options d'expérimentation sur bouquetin en captivité, semi-liberté ou liberté. Les termes retenus dans le présent rapport décrivent le mode d'hébergement des animaux correspondant à un niveau de confinement décroissant : en bâtiments fermés (pour captivité), en enclos (pour semi-liberté) ou en nature (pour liberté). Ils correspondent au confinement physique des animaux.

Les avantages et inconvénients des différents niveaux de confinement ont été analysés pour répondre à la demande d'AST, sur la base des critères suivants :

- Disponibilité des structures d'accueil (existence et capacité)

³ <http://www.zodelahautetouche.fr/>

- Agrément des structures d'accueil pour l'utilisation des animaux à des fins scientifiques
- Contact avec espèces non cibles
- Risques liés au stress de contention des bouquetins
- Contrôle du statut sanitaire des animaux (brucellose ou autres pathologie intercurrentes)
- Durée possible et période d'expérimentation
- Coût de mise à disposition des animaux, de transport et d'hébergement (ou d'abattage en fin d'expérimentation pour le scénario *in natura*).

L'ensemble de ces éléments figure dans le tableau 2.

En ce qui concerne le bio-confinement (niveau 2 ou 3) pour la gestion du risque biologique, dans la mesure où, d'une part, le vaccin possède une AMM et est déjà utilisé en élevage ovin en France et où, d'autre part, le protocole proposé ne prévoit pas d'épreuve virulente (infection expérimentale par une souche de *Brucella* sauvage), le niveau de confinement requis pour une étude d'innocuité n'atteint pas le stade A3, vis-à-vis du risque microbiologique. Ce niveau aurait été incompatible avec les exigences de bien-être animal pour le bouquetin des Alpes (cf 3.2).

L'expérimentation en nature présenterait l'avantage de ne pas nécessiter d'hébergement des animaux et respecter leur bien-être, mais présenterait en revanche l'inconvénient d'un manque de contrôle de l'expérimentation (en particulier dans la zone Bargy, où les bouquetins peuvent être déjà infectés tout en étant séronégatifs ou s'infecter en cours d'expérimentation), ainsi qu'un risque de ne pas pouvoir récupérer tous les animaux vaccinés au terme de l'expérimentation. En outre, en nature, la comparaison d'innocuité entre bouquetin et chèvre sauvage apparaît difficilement réalisable.

Le compromis le plus satisfaisant au plan technique, serait de pratiquer un test d'innocuité dans un niveau de confinement intermédiaire, comme un bâtiment avec un grand parcours collectif, adapté à l'hébergement des caprinés sauvages. L'aménagement d'un bâtiment (6 loges à séparations amovibles et modulables sur 68 m² dont loge infirmerie/contention) et d'un parcours (70 m²) adapté aux bouquetins peut représenter un coût de 50.000 euros. Cette option peut être complétée par l'aménagement d'un enclos extérieur (paddock). L'étanchéité des structures vis-à-vis de la sortie des animaux et vis-à-vis des animaux sauvages locaux, ainsi que le respect de règles classiques de vide sanitaire/désinfection seraient suffisants pour la conduite d'un tel essai vaccinal. L'alternative consistant à installer les bouquetins dans un enclos extérieur de type « enclos de quarantaine » ne paraît pas envisageable : en effet cet enclos seul, sans être adossé à un bâtiment comme précédemment décrit, ne serait pas acceptable pour des raisons d'accès aux animaux en cours d'expérimentation.

L'utilisation d'un bâtiment avec loge individuelle devra être ponctuellement envisagée pour le bouquetin (en mode infirmerie), notamment pour l'acte vaccinal et dans les 24h qui suivent, de façon à éviter les erreurs liées aux manipulations (risque de contamination d'animaux par un biais mécanique) et la diffusion de vaccin dans l'environnement par le jetage et les larmes, au moment de la vaccination. Le confinement total, quant à lui, n'est pas envisageable, du fait de l'impact du stress de contention sur le comportement des animaux et, par là même sur l'expérimentation.

L'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) sera à interroger sur les autorisations et contraintes réglementaires relatives aux MOT (Micro-organismes et toxines hautement pathogènes), sur la base d'un protocole détaillé.

3.3.4 Autorisation du projet

Une fois réglées les questions réglementaires liées aux agréments des personnes et des bâtiments, il convient que le chercheur en charge de l'expérimentation soumette une demande d'autorisation de projet (DAP), mentionnant clairement les procédures envisagées, au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (dossier Apafis), si le projet entre dans le champ d'application de la loi sur l'Utilisation des Animaux à des Fins Scientifiques. Pour l'obtention de cette autorisation, la demande est préalablement étudiée par le comité d'éthique dont dépend l'établissement utilisateur. Le comité d'éthique examine le protocole, en particulier le nombre

d'animaux utilisés (qui doit être minimum), le bien-être des animaux (en lien avec leur hébergement, voir tableau 2), le nombre et la nature des manipulations et l'euthanasie. Ces deux derniers points doivent être plus particulièrement argumentés. Si l'avis du comité peut être rapide, l'autorisation formelle par le Ministère peut être plus longue.

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des différents modes de confinement pour une expérimentation vaccinale

Mode hébergement	Animaux concernés : adultes sexuellement matures (hors gestation-lactation)	Niveau de confinement	Structures d'accueil	Agrément DDPP des structures pour l'utilisation des animaux à des fins scientifiques	Contact avec espèces non cibles	Risques liés au stress de contention chez le bouquetin	Contrôle du statut sanitaire des animaux	Durée possible de l'expérimentation	Coût de mise à disposition des animaux, de transport et d'hébergement
Bâtiment fermé	Bouquetins nés en captivité Chèvres d'élevage	Confinement de type A3	Bouquetins des Alpes : pas de structure Chèvres : INRA Centre Val de Loire, Anses	Pas de structure Agrément DDPP caprinés domestiques : INRA Centre Val de Loire, Anses	-	+++	+++	Bouquetin : non praticable Chèvre : plusieurs semaines/mois	
Bâtiment fermé	Bouquetins nés en captivité Chèvres d'élevage	Bâtiment en loge individuelle isolée pour les bouquetins Station expérimentale pour les chèvres	Bouquetins des Alpes : MNHN/parc de la Haute Touche pour environ 10 individus sous réserve d'aménagement des locaux Chèvres : INRA Centre Val de Loire, Anses	Agrément pour caprinés sauvages : MNHN/parc de la Haute Touche sous réserve de renouvellement agrément caprinés sauvages Agrément pour caprinés domestiques : INRA Centre Val de Loire, Anses	-	++	+++	Bouquetin : quelques jours (péri-vaccination). L'expérimentation doit ensuite se poursuivre dans un bâtiment avec parcours collectif. Chèvres : plusieurs semaines/mois	Bouquetins : adaptation des locaux : 50.000 €. Transport des animaux : 1000 €/animal maxi Chèvres : Achat-transport : 150 à 350 €/animal Hébergement et entretien des 2 espèces : à déterminer en fonction du protocole
Bâtiment fermé	Bouquetins nés en captivité Chèvres d'élevage	Bâtiment avec parcours collectif pour les bouquetins Station expérimentale pour les chèvres	Bouquetins des Alpes : MNHN/parc de la Haute Touche pour environ 10 individus sous réserve d'aménagement des locaux. Chèvres : INRA Centre Val de Loire, Anses	Agrément pour caprinés sauvages : MNHN/parc de la Haute Touche sous réserve de renouvellement agrément caprinés sauvages Agrément pour caprinés domestiques : INRA Centre Val de Loire, Anses	-	+/-	++	Bouquetins : 3 mois d'hébergement envisageables Chèvres : plusieurs semaines/mois	Bouquetins : adaptation des locaux : 50.000 €. Transport des animaux : 1000 €/animal maxi Chèvres : Achat-transport : 150 à 350 €/animal Hébergement et entretien des 2 espèces : à déterminer en fonction du protocole
Bâtiment fermé	Bouquetins capturés en nature	Tout niveau				+++		Expérimentation non réalisable. Bouquetins voués à la mort avant la fin de l'expérimentation.	

Mode hébergement	Animaux concernés : adultes sexuellement matures (hors gestation-lactation)	Niveau de confinement	Structures d'accueil	Agrément DDPP des structures pour l'utilisation des animaux à des fins scientifiques	Contact avec espèces non cibles	Risques liés au stress de contention chez le bouquetin	Contrôle du statut sanitaire des animaux	Durée possible de l'expérimentation	Coût de mise à disposition des animaux, de transport et d'hébergement
Enclos	Bouquetins nés en captivité Chèvres d'élevage	Enclos pour les bouquetins Station expérimentale pour les chèvres	Bouquetins des Alpes : MNHN/parc de la Haute Touche Chèvres : INRA Centre Val de Loire, Anses	Agrément pour caprinés sauvages : MNHN/parc de la Haute Touche sous réserve de renouvellement agrément caprinés sauvages Agrément pour caprinés domestiques : INRA Centre Val de Loire, Anses	-	-	++	Bouquetins : l'enclos seul sans être adossé à un bâtiment adapté n'est pas envisageable pour des raisons d'expérimentation et d'accès aux animaux. Chèvres : plusieurs semaines/mois	
Enclos	Bouquetins nés en captivité Chèvres d'élevage	Enclos en contact avec le public pour les bouquetins Station expérimentale pour les chèvres	Pas de structure volontaire pour les bouquetins car non souhaitable/compatible avec l'activité de présentation des collections						
Nature pour les bouquetins Bâtiments pour les chèvres	Bouquetins nés en nature Chèvres d'élevage	<i>In natura</i> , Massif du Bargy pour les bouquetins Station expérimentale pour les chèvres	Possible capture de 20-30 individus séronégatifs en avril-juin et 5-10 individus séronégatifs en octobre-novembre (non garanti) Chèvres : INRA Centre Val de Loire, Anses	Pas d'agrément nécessaire (sous réserve), Sous autorisation DGAL Agrément pour caprinés domestiques : INRA Centre Val de Loire, Anses	+	+/-	---	Bouquetins : plusieurs semaines Chèvres : réalisation sur le massif du Bargy difficile voire impossible. Le recours à une expérimentation en station pour les chèvres semble indispensable.	Bouquetins : ~10 000 euros pour la capture de 5-10 individus séronégatifs, le marquage et le test des animaux in situ. Chèvres : Achat-transport : 150 à 350 € /animal Hébergement et entretien : à déterminer en fonction du protocole

4 Conclusions

En prenant en compte l'Avis et le rapport d'expertise collective de l'Anses de 2015 ainsi que les données réglementaires sur le vaccin OVIREV®, disposant d'une AMM pour le mouton et la chèvre en France, pour une administration par voie conjonctivale, les experts retiennent comme critères préalables indispensables à l'utilisation du vaccin OVIREV® chez le bouquetin, dans le milieu infecté du massif du Bargy, hors RCP selon le principe de la cascade :

1. La protection du manipulateur, par la mise en œuvre de méthodes de biosécurité *ad hoc* et de suivis médicaux réguliers. Ce critère ne nécessite pas d'expérimentation particulière, mais une formation des agents appelés à manipuler le vaccin dans des conditions de terrain.
2. la confirmation d'une innocuité équivalente chez le bouquetin des Alpes et la chèvre domestique et l'évaluation de la capacité de diffusion de la souche dans l'environnement. Ces critères sont les seuls nécessitant la mise en œuvre d'une expérimentation, couplée entre les deux espèces.
3. une vaccination ciblée sur un groupe de bouquetins sexuellement matures, hors gestation ou lactation pour les femelles, afin de limiter le risque d'avortement et d'excrétion associé à la souche vaccinale. Ce critère ne nécessite pas d'expérimentation particulière.
4. un marquage spécifique et discriminant des bouquetins vaccinés ou non vaccinés et une surveillance ciblée sur les bouquetins non vaccinés, afin d'éviter toute interférence entre surveillance et vaccination. Ce critère ne nécessite pas d'expérimentation particulière.

Les autres critères listés dans la demande d'AST ont été analysés au travers du traitement de la saisine 2014-SA-0218 et ne présentent pas de difficulté particulière.

Concernant l'expérimentation vaccinale visant à vérifier que le vaccin OVIREV® présente une innocuité équivalente chez le bouquetin des Alpes et la chèvre, la prise en compte des avantages et inconvénients des différents modes de confinement fait apparaître :

- L'impossibilité de maintenir en captivité des bouquetins capturés en nature ;
- L'impossibilité de maintenir des bouquetins nés en captivité, plus de quelques jours dans un bâtiment fermé en loge individuelle ;
- La possibilité d'envisager une expérimentation couplée bouquetins-chèvres dans des installations expérimentales de niveau de confinement moins élevé, de type parcours en bâtiment ;
- La possibilité d'envisager une expérimentation en nature pour les bouquetins sur le massif du Bargy, devant être complétée par une expérimentation sur des chèvres domestiques en station expérimentale.

La décision d'une telle expérimentation et le choix de ses modalités reviennent au gestionnaire, en fonction de ses priorités.

Un protocole précis d'expérimentation pourra être développé le cas échéant, assorti d'un calendrier d'étapes et de calculs de coûts plus précis, à l'issue de cette décision.

Maisons-Alfort, le

Dr Roger GENET
Directeur Général de l'Anses

Paris, le

Jean-Pierre POLY
Directeur Général de l'ONCFS

5 Bibliographie

- Afssa (2007). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur l'évaluation du risque relatif à l'arrêt de la vaccination contre la brucellose ovine et caprine. 2007-SA- 0246. Paris, 10pp.
- Afssa (2008). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur un protocole de lutte contre l'épididymite contagieuse ovine (*Brucella ovis*) dans les Pyrénées-Atlantiques. 2007-SA-0405. Paris, 19pp.
- Alton, G.G. (1985). "Rev.1 and H38 *Brucella melitensis* vaccines." In *Brucella melitensis*, edited by JM Verger and M Plommet, 215-217. The Hague, The Netherlands: Martinus Nijhoff publishers for CEC.
- Alton G.G. (1987). Control of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats—a review. *Tropical Animal Health and Production*, 19 (2):65-74.
- Anses (2015). Mesures de maîtrise de la brucellose chez les bouquetins du Bargy. Avis de l'Anses et Rapport d'expertise collective SANT2014_SA_0218. Paris, 194 pp.
- Blasco J.M. (1997). A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Preventive Veterinary Medicine*, 31(3):275-283.
- Blasco J.M. (2010) Control and eradication strategies for *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Prilozi*, 31(1):145-65.
- Blasco J.M., Diaz R. (1993). *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *The Lancet*, 342(8874):805.
- De Bagüés M.P., Marin C.M., Blasco J.M., Moriyon I., Gamazo C. (1992). An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival *B. melitensis* strain Rev 1 vaccination. *Veterinary Microbiology*, 30(2):233-241.
- Fensterbank R., Pardon P., Marly J. (1985): Vaccination of ewes by a single conjunctival administration of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *Annales de Recherches Vétérinaires*, (16):351–358.
- Ferroglio E., Gennero M.S., Pasino M., Bergagna S., Dondo A., Grattarola C., Bassano B. (2007). Cohabitation of a *Brucella melitensis* infected Alpine ibex (*Capra ibex*) with domestic small ruminants in an enclosure in Gran Paradiso National Park, in Western Italian Alps. *European Journal of Wildlife Research*, 53(2):158-160.
- Godfroid J., Garin-Bastuji B., Saegerman C., Blasco J.M. (2013). Brucellosis in terrestrial wildlife. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 32(1):27-42.
- Hars J., Rautureau S., Vaniscotte A., Herbaux J.P., Pasquier J.J., Depecker A., Le Bourg V., Game Y., Toigo C., Mick V., Garin-Bastuji B. (2015). La brucellose des bouquetins du massif du Bargy (Haute-Savoie) : où en est-on en 2015 ? *Bulletin Épidémiologique, Santé Animale et Alimentation*, 70:14-18.
- Jones L.M, Marly J. (1975). Serological and bacteriological studies of ewes vaccinated with *Brucella melitensis* strain Rev 1 during lactation. *Annales de Recherches Veterinaires*, 6(1):67-71.

- Marchand P., Hars J., Herbaux J.P., Le Bourg V., Game Y. (2015). Suivis sanitaires et populationnels des bouquetins du massif du Bargy et des massifs adjacents. Bilan des opérations réalisées en 2015. Rapport technique ONCFS. 25pp.
- Martin C., Duquesne V., Guibert J.M., Pulido C., Gilot-Fromont E., Gibert P., Velarde R., Thiéry R., Marco I., Dubois E. (2013). Experimental infection of pregnant Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*) with border disease virus subtype 4. *Journal of Wildlife Diseases*, 49(1):55-68.
- Scharp D.W., al Khalaf S.A., al Muhanna M.W., Cheema R.A., Godana W. (1999): Use of mass vaccination with a reduced dose of REV 1 vaccine for *Brucella melitensis* control in a population of small ruminants. *Tropical Animal Health and Production*; 31(3):135–141.
- Stüwe M., Grodinsky C. (1987). Reproductive biology of captive Alpine ibex (*Capra i. ibex*). *Zoo Biology*, 6(4):331-339.
- Zundel E., Verger J.M., Grayon M., Michel R. (1992). Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine: safety and serological responses. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 23:177–188.
- Verger J.M., Grayon M., Zundel E., Lechopier P, Olivier-Bernardin V. (1995). Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine* 13(2):191-196.
- WHO. (1986). "Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis – Sixth Report." *World Health Organization Technical Report* 740.

Date de validation du rapport : 27 juillet 2016

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de la demande

COURRIER ARRIVE

23 JUIN 2016

DIRECTION GENERALE



2016-SA-0146

- 0487-1

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT

Direction générale de l'alimentation
Service des actions sanitaires en production primaire
Sous-direction de la santé et de la protection
animales

Bureau de la santé animale
 Adresse : 251, rue de Vaugirard
 75 732 Paris cedex
 Dossier suivi par : L. Cavalerie
 Tél. : 01.49.55.84.51
 Réf. Interne : 1605029

Le Directeur général de l'alimentation

au

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

Directeur général de l'Office National de la Chasse
 et de la Faune Sauvage

Paris, le 22 JUIN 2016

**Objet : Demande d'AST sur la définition et l'évaluation bibliographique des critères
 préalables à une approche vaccinale contre la brucellose chez les bouquetins du Bary**

Le rapport de l'Anses relatif à la saisine 2014-SA-0218 présente une évaluation de l'efficacité de différents scénarios de gestion du foyer de brucellose chez des bouquetins dans le massif du Bary. Dans cette évaluation, les scénarios incluant le recours à l'outil vaccinal ont les meilleures perspectives d'élimination ou d'extinction de la maladie à long terme. Le recours à un vaccin vivant dans un contexte inédit : la vaccination d'une population sauvage de bouquetins en contact avec des ruminants domestiques, nécessite d'apporter un certain nombre de garanties préalables avant d'être envisagée.

J'ai l'honneur de solliciter l'expertise conjointe de l'Anses et de l'ONCFS pour définir puis évaluer bibliographiquement les critères préalables au recours à un outil vaccinal dans la gestion de la brucellose chez les bouquetins du massif du Bary.

Pour cela nous souhaiterions que soient abordées les questions suivantes :

1/ Quels doivent être les critères incontournables à évaluer en perspective d'une utilisation de la vaccination notamment en perspective d'un maintien du noyau sain ?

Les critères suivants sont a minima à développer sur la base des vaccins existants :

- l'innocuité après administration à l'animal et pour le manipulateur pendant l'administration,
- la réversibilité de la souche vaccinale,
- le développement de la réponse immunitaire,
- l'interférence avec la surveillance pour le suivi de la situation liée à la réponse humorale,
- la capacité de diffusion de la souche dans l'environnement,
- le risque de contamination humaine (au-delà du manipulateur) et des animaux domestiques.

Cette liste est éventuellement à compléter.

D'autres critères, secondaires à ce stade, sont à développer autant que possible dans les délais impartis tels que les contraintes liées à l'innoculation sur le plan logistique, financier et écologique.

2/ Quelles sont les connaissances de la bibliographie qui permettent d'évaluer ces critères ?

3/ Quels sont les critères dont l'évaluation nécessite une approche expérimentale ou des travaux scientifiques complémentaires ? Quelles sont les approches possibles et quelle est la faisabilité de ce(s) protocole(s) expérimental(aux)/scientifique(s) ? En ce qui concerne d'éventuels essais vaccinaux, quelles sont les conditions de captivité, de semi-captivité (population saine et isolée), de liberté (risque d'échec, durée nécessaire, possibilité technique, réglementaire, ordre de grandeur minimal des coûts s'ils peuvent être estimés) ?

Un rapport est attendu pour début août 2016.

Le Directeur Général de l'Alimentation,
Patrick DEHAUMONT

Destinataires

- Directeur général de l'Anses
- Directeur général de l'ONCFS

Copie

- DDPP 74
- MEEM