Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE, DE L'ALIMENTATION, DE LA PÊCHE, DE LA RURALITE ET DE L'AMENAGEMENT DU TERRITOIRE

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

Adresse : 251 rue de Vaugirard
75 732 PARIS CEDEX 15
Suivi par : A. Fediaevsky
Tél : 01 49 55 84 57
Courriel institutionnel : bsa.sdspa.dgal@agriculture.gouv.fr
NOR : AGRG1112782N
Réf. Interne :1103060
MOD10.21 E 01/01/11
NOR : AGRG1112782N

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDSPA/N2011-8107

Date: 10 mai 2011

Date de mise en application :	Immédiate
Abroge et remplace :	-
Date d'expiration :	-
Date limite de réponse/réalisation :	-
Nombre d'annexe :	1
Degré et période de confidentialité :	aucune

Objet : Tuberculose bovine : Dispositions techniques en application de l'arrêté du 15 septembre 2003 modifié

Références :

- Règlement (CE) n°854/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine ;
- Directive 64/432/CEE relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine ;
- Code rural et notamment son livre II ;
- Arrêté modifié du 15 septembre 2003 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose des bovinés et des caprins ;

Résumé : La présente instruction a pour objet la mise en œuvre d'un protocole sanitaire de sauvegarde de la génétique dans les élevages faisant l'objet d'assainissement dans le cadre de la police sanitaire de la tuberculose bovine.

Mots-clés : tuberculose bovine, sauvegarde génétique

Destinataires	
Pour exécution : DDPP/DDCSPP :	**Pour information** : Anses (LERPAZ) ACSEDIATE, LNCR ENVA GDS France, SNGTV

La présente instruction précise le protocole de sauvegarde génétique qu'il convient de proposer en cas d'abattage d'assainissement d'un troupeau infecté de tuberculose bovine.

Les modalités techniques du protocoles sont présentées en annexe, cette annexe s'insère dans la section Gestion des foyers de la note DGAL/SDSPA/N2010-8305.

J'attire votre attention sur le fait que ce protocole est mis en place à la demande de l'éleveur, à ses frais et avec des risques d'échec inhérent aux opérations de reproduction artificielle. Par ailleurs les gamètes ainsi produits ne peuvent être utilisés que dans le cadre de la monte privée et dans un délai de 24 mois maximum.

Je vous invite à me faire part des difficultés que vous pourrez rencontrer dans l'application de la présente instruction.

Le Directeur général Adjoint
Chef du service de la coordination des action sanitaires
C.V.O.

Jean-Luc ANGOT

Annexe V : Gestion des foyers

D - PROTOCOLE DE SAUVEGARDE DE LA GENETIQUE D'UN ELEVAGE RECONNU INFECTE DE TUBERCULOSE BOVINE

1 - Introduction

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 tuberculose 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 ;
- S'assurer que le matériel génétique sauvegardé, ne sera pas de nature à générer, par la suite, une résurgence du foyer de tuberculose bovine.

Le protocole développé tient compte des travaux et des recommandations publiés par la Société Internationale de Transfert Embryonnaire (IETS) et a été soumis à l'expertise de l'Anses (avis AFSSA 2010-SA-0027). Il précise les différentes étapes qui permettent d'aboutir au prélèvement et à la congélation des gamètes mâles et femelles et des embryons. Il s'appuie d'une part sur la production de semences congelées et d'autre part sur la production d'embryons qui sont obtenus soit in vivo après insémination des femelles donneuses, sélectionnées sur leur statut sanitaire présumé indemne de tuberculose bovine, soit in vitro à partir des ovocytes récupérés après abattage, sur les ovaires des vaches donneuses répondant aux mêmes critères que les vaches citées précédemment, quant à leur statut sanitaire.

La mise en œuvre de ce protocole est sous le contrôle des services de l'Etat via la Direction départementale en charge de la protection des populations (DDecPP) et est **aux frais de l'éleveur demandeur**. La réalisation de certaines opérations techniques nécessite de prendre l'attache du Laboratoire National pour le Contrôle des Reproducteurs (LNCR - 13 rue Jouët – 94704 Maisons-Alfort – tél 01 43 53 51 02).

La semence, les ovocytes et les embryons collectés dans le cadre de ce protocole ne pourront être utilisés que par l'éleveur demandeur (monte privée artificielle). Au delà de 24 mois à compter de la date de début des opérations de repeuplement dans le cheptel de l'éleveur demandeur, l'ensemble du matériel génétique sera détruit.

2 - Exigences à satisfaire en vue de la collecte et de la conservation du sperme des mâles sélectionnés

a - Examens à réaliser 7 à 10 jours avant la collecte du sperme

Tous les mâles dont l'éleveur voudra conserver la semence devront être soumis individuellement aux examens listés ci-dessous :

- Un test pour le dosage du gamma interféron réalisé sur un prélèvement de sang total (tube hépariné)
- Une intradermotuberculination simple ;
- Un examen clinique permettant de constater l'absence de signes cliniques de maladie ainsi que l'intégrité de l'appareil génital interne et externe ;

Les résultats de ces examens seront communiqués à la DDecPP.

La collecte du sperme 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 - Examens à réaliser le jour de la collecte du sperme

Tous les mâles dont l'éleveur aura choisi de conserver la semence et qui satisferont aux exigences du a) devront être soumis individuellement, le jour de la collecte, aux examens listés ci-dessous :

- Un examen clinique permettant de constater l'absence de signes cliniques de maladie ainsi que l'intégrité de l'appareil génital interne et externe, en cas d'anomalie constatée à ce stade, aucune collecte de semence ne pourra être envisagée sur l'animal ou les animaux concernés.
- Un examen biologique et sanitaire de la semence qui sera réalisé aux 3 étapes de la préparation de la semence, de la récolte à la congélation, soit aux phases suivantes :
- Sur un échantillon de sperme pur, lors de la collecte,en cas d'anomalie constatée à ce stade, les éjaculats concernés ne seront pas conservés.
- Sur un échantillon de semence diluée après dilution et avant congélation ;
- Après congélation
- Un examen de recherche du génome bactérien de *M. tuberculosis* réalisé par la méthode PCR sur un échantillon de sperme pur ;

c - Mesures à réaliser après la collecte du sperme

Après congélation de la semence qui sera effectuée dans des paillettes spécifiquement identifiées par la mention « sauvegarde génétique » imprimée sur chaque paillette[1], ces dernières seront placées en quarantaine dans un container dédié uniquement à la conservation des semences de cet élevage.
L'azote liquide qui sera utilisé pour le remplissage du container sera neuf et n'aura pas été utilisé pour d'autres usages au préalable.
Ce container sera mis à disposition par le LNCR après avoir subi un nettoyage et une désinfection soignés.
Après fabrication des doses, le matériel génétique sera entreposé dans la cryobanque du LNCR jusqu'à la mise des paillettes à la disposition de l'éleveur, qui ne pourra intervenir que dans les conditions suivantes et après :

- Abattage des animaux
- Réalisation d'une inspection post mortem permettant de constater l'absence de lésions ;
- Prélèvement des ganglions trachéo-bronchiques, médiastinaux et rétro-pharyngiens qui seront soumis à :
- Une recherche des lésions évocatrices de tuberculose permettant de constater l'absence de lésions évocatrices ;
- Une recherche du génome bactérien de *M. tuberculosis* par la méthode PCR aboutissant à l'obtention d'un résultat négatif.

Seules les paillettes issues d'animaux ne présentant pas de lésions évocatrices de tuberculose (la DDecPP informera le LNCR des résultats de l'inspection post-mortem), ni de résultats positifs aux tests effectués (la DDecPP sera tenue informée des résultats des tests) seront conservées. **Elles ne pourront être utilisées que dans le cadre d'opérations de monte privée.**

3 - 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 ou fécondés in vitro.

Sur les femelles de haute valeur génétique désignées par l'éleveur, deux techniques pourront être mises en œuvre :

- La collecte d'embryons produits in vivo et la congélation de ces embryons ;
- La collecte d'ovocytes à partir des ovaires prélevés après abattage et production d'embryons in vitro (OPU-FIV) qui seront congelés.

Le sperme utilisé pour les inséminations ou pour la fécondation des ovocytes pourra être indifféremment le sperme des taureaux de l'élevage qui, dans ce cas précis devra respecter les exigences décrites ci-dessus en (2), ou le sperme provenant d'un centre de collecte agréé.
M. bovis étant classé en catégorie 4 selon la classification du manuel de la Société Internationale de Transfert Embryonnaire (IETS), 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

1 Les paillettes pourront être préparées notamment pour ce qui concerne leur identification, par le centre de collecte du choix de l'éleveur et mises à disposition des opérateurs désignés pour effectuer les opérations de collecte et de congélation.

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 ; milieux de maturation, milieux de lavage et embryons dégénérés ou ovule non fécondé pour les embryons produits in vitro).

a - Examens à réaliser 7 à 10 jours avant la collecte des embryons ou des ovocytes

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

- Un test pour le dosage du g interféron réalisé sur un prélèvement de sang total (tube hépariné)
- Une intradermotuberculination simple ;
- 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 DDecPP.

La collecte des embryons ou des ovocytes 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 - 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.
- Un examen de recherche du génome bactérien de M. tuberculosis réalisé par la méthode PCR sur un échantillon du liquide de collecte ;
- Un examen de recherche du génome bactérien de *M. tuberculosis* réalisé par la méthode PCR 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.

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.

c - 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 d'une inspection post mortem permettant de constater l'absence de lésions ;
- Prélèvement des ganglions trachéo-bronchiques, médiastinaux et rétro-pharyngiens qui seront soumis à :
- Une recherche des lésions évocatrices de tuberculose permettant de constater l'absence de lésions évocatrices ;
- Une recherche du génome bactérien de *M. tuberculosis* par la méthode PCR aboutissant à l'obtention d'un résultat négatif.

Seuls les embryons produits à partir d'animaux ne présentant pas de lésions post-mortem évocatrices de tuberculose seront conservés (la DDecPP informera le LNCR des résultats de l'inspection post-mortem). Ces embryons ne pourront être remis en place que sur des femelles receveuses appartenant à l'élevage (opération de monte privée réalisée sur les femelles de repeuplement).

d - Examens à réaliser le jour de la collecte des ovocytes à partir des ovaires prélevés à l'abattoir

Toutes les femelles dont l'éleveur aura choisi de conserver le matériel génétique et qui satisfont aux exigences précédentes devront être soumises individuellement, après abattage, aux examens listés ci-dessous :

- Prélèvements des ovaires dans les conditions ad hoc permettant de les traiter stérilement et séparément pendant toute la durée du processus opératoire, ainsi que les ovocytes et embryons qui seront produits à partir de ces ovaires ;
- Réalisation d'une inspection post mortem permettant de constater l'absence de lésions ;
- Prélèvement des ganglions trachéo-bronchiques, médiastinaux et rétro-pharyngiens qui seront soumis à :
- une recherche des lésions évocatrices de tuberculose permettant de constater l'absence de lésions évocatrices ;
- une recherche du génome bactérien de *M. tuberculosis* par la méthode PCR aboutissant à l'obtention d'un résultat négatif.

Seuls les embryons produits à partir d'animaux ne présentant pas de lésions post-mortem évocatrices de tuberculose et négatifs aux tests effectués, seront conservés.
Ces embryons ne pourront être remis en place que sur des femelles receveuses appartenant à l'élevage d'origine (femelles de repeuplement).

e - Examens à réaliser sur les embryons produits in vitro

Les femelles à partir desquelles on aura choisi de produire et de conserver les embryons devront être soumises à des examens et contrôles sanitaires complémentaires qui permettront de contrôler la qualité sanitaire des embryons produits in vitro (prévus en a et en d).

Les ovocytes et les embryons pourront être traités en lot, chaque lot ne pouvant ne pouvant correspondre qu'à une seule femelle.
Les examens et contrôles seront les suivants :

- Un examen de recherche du génome bactérien de *M. tuberculosis* réalisé par la méthode PCR sur un échantillon du liquide folliculaire ;
- Un examen de recherche du génome bactérien de *M. tuberculosis* réalisé par la méthode PCR 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.

4 - Exigences relatives à l'utilisation du matériel génétique conservé

a - Exigences relatives aux semences

Les semences conservées ne pourront être utilisées que dans le cadre d'inséminations intra-troupeau qui seront réalisées soit pour produire des embryons in vivo (insémination des femelles sélectionnées avant abattage), soit pour procéder à des fécondations in vitro, soit pour inséminer les femelles de repeuplement.

Les dispositions réglementaires de contrôle et de surveillance de ces vaches et des veaux nés de ces opérations n'entrent pas dans le champ du présent protocole.

b - Exigences relatives aux embryons

Les embryons conservés ne pourront être utilisés que dans le cadre de transferts intra-troupeau qui seront réalisés sur les femelles de repeuplement.

Les dispositions réglementaires de contrôle et de surveillance de ces vaches et des veaux nés de ces opérations n'entrent pas dans le champ du présent protocole.