

**Risques sanitaires au regard de l'ESB liés aux rejets
dans l'environnement des effluents et boues issus
d'abattoirs et d'équarrissages**

- septembre 2003 -

Coordination
Rozenn Saunier

Composition du groupe en charge de l'étude

■ Experts du CES ESST en charge de l'étude :

Coordinateur :

Professeur Geneviève BENARD
Ecole nationale vétérinaire de Toulouse
Toulouse

Experts :

Jacques-Christian DARBORD
Pharmacie centrale des hôpitaux
Paris

Jean-Philippe DESLYS
CEA
GIDTIP
Fontenay aux Roses

Pascal EYNARD
ENGREF
Paris

Jean-Pierre FRENCIA
ADIV
Clermont-Ferrand

Jacques GRASSI
CEA
Service de pharmacologie et d'immunologie
Gif-sur-Yvette

Ronald MELKI
CNRS
Laboratoire d'enzymologie et de biochimie structurale
Gif-sur-Yvette

■ Structures ayant été sollicitées pour l'obtention d'informations complémentaires :

- Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche et des affaires rurales
- Ministère de l'environnement et du développement durable
- Agence de l'eau Artois-Picardie
- Fédération nationale de l'industrie et du commerce en gros des viandes (FNICGV)
- Fédération nationale des exploitants d'abattoirs prestataires de services (FNEAP)
- Syndicat des industries françaises de co-produits animaux (SIFCO)
- Syndicat national de l'industrie des viandes (SNIV)
- Vivendi environnement.

Sommaire

Saisine	7
Introduction	9
I Abattoirs	9
A- Etat des lieux	9
1.1- Description des opérations d'abattage	9
a) Stabulation.....	9
b) Etourdissement.....	9
c) Saignée.....	9
d) Dépouille.....	10
e) Eviscération	10
f) Aspiration de la moelle épinière	10
g) Fente et douchage des carcasses.....	10
h) Finition	10
i) Chambres frigorifiques de ressuage.....	10
j) Ateliers de découpe	10
k) Ligne de triperie / boyauderie	10
1.2- Définition des tissus et des sites à risque	10
a) Eléments anatomiques concernés	10
b) Définition des postes à risque	11
1.3- Pré-traitements et leurs effets	14
a) Description.....	14
b) Données de terrain	15
B- Evaluations quantitatives	16
1.1- Observations sur la chaîne d'abattage et mesures macroscopiques.....	16
1.2- Mesures biochimiques	18
C- Devenir des particules infectieuses dans les eaux usées	19
1.1- Hypothèses de travail.....	19
1.2- Propriétés de l'agent infectieux	20
1.3- L'agent infectieux dans l'eau.....	21
D- Comportement en station d'épuration.....	21
1.1- L'agent infectieux en présence des boues de stations d'épuration.....	21
1.2- L'agent infectieux à la sortie des stations d'épuration.....	21
1.3- L'agent infectieux lié à un support solide	22
1.4- Bilan	23
II Equarrissages :	24
A-Traitement des matières à haut risque à incinérer.....	24
B-Fonctionnement de la station de pré-traitement et de traitement	25
III Avis du CES EAUX	25

IV Avis et recommandations	26
A- Conclusions de l'analyse	26
B- Recommandations du Comité	26
C- Réponses à la saisine de l'Afssa en date du 3 septembre 2002	27
D- Axes de recherche à développer	28
1.1- Définition des besoins	28
1.2- Moyens à mettre en œuvre	28
Bibliographie	31
Annexe : Réponse du CES EAUX au CES ESST	32

❧ ❧ ❧

Tableaux, schémas et annexes

<u>Schéma n°1</u> : Bilan des effets des pré-traitements	15
<u>Schéma n°2</u> : Résumé du devenir des particules infectieuses dans les eaux usées des abattoirs et équarrissages	23

❧ ❧ ❧

<u>Tableau n°1</u> : Répartition des résidus physiques issus des stations de pré-traitement d'abattoirs	16
<u>Tableau n°2</u> : Quantités de matières organiques susceptibles d'être retrouvées sur la chaîne d'abattage	17
<u>Tableau n°3</u> : Quantités de matières organiques et de détritiques éliminés par les pré-traitements	18

❧ ❧ ❧



Président du comité d'experts spécialisé sur les ESST

Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
7 bis, avenue du Général de Gaulle
94 701 MAISONS-ALFORT CEDEX

Monsieur le Président,

Suite aux constats établis dans le rapport de l'AFSSA d'avril 2001 relatif aux « Risques sanitaires liés aux différents usages des farines et graisses d'origine animale, et aux conditions de leur traitement et de leur élimination », l'Agence a élaboré un rapport de synthèse relatif aux rejets et effluents issus des établissements traitant de produits et sous-produits de ruminants. Ce rapport est orienté sous deux axes principaux : (i) état des lieux des connaissances scientifiques sur la détection des agents transmissibles non conventionnels -ATNC- en milieux hydrique et tellurique ; (ii) états des lieux concernant la réglementation applicable et les pratiques mises en œuvre dans ces établissements.

Parallèlement, l'Agence a été saisie par les services ministériels sur différentes questions relatives aux risques environnementaux liés aux ATNC. Il s'agit (cf. saisines en annexe) :

- des risques de contamination des sols et de l'eau par le prion susceptibles de résulter des effluents et des boues d'abattoirs ;
- des risques sanitaires liés à la consommation d'eau produite à partir des prises d'eau situées à l'aval d'établissements d'équarrissage ;
- du traitement des effluents des établissements de transformation de matières à haut risque à incinérer (efficacité en termes de réduction de l'infectiosité des traitements par autocuiseur, oxydeur thermique et filtration sur membrane).

Sur le fondement de ce rapport transmis aux experts, je souhaiterais disposer d'un avis du Comité d'experts spécialisé sur les ESST permettant :

- d'évaluer les risques sanitaires pour la santé humaine et animale liés aux rejets issus des établissements traitant des produits et sous-produits issus de ruminants (notamment des MRS). A cet égard, est-il possible de procéder à une hiérarchisation des niveaux de risque qui prendrait en compte, d'une part les étapes auxquelles sont générés ces rejets dans les différents établissements concernés, d'autre part les résultats des tests ou de tout autre paramètre que vous identifierez ? *In fine*, cette démarche permettrait-elle de proposer un traitement différentiel de ces rejets et effluents ?
- de répondre aux saisines des services ministériels concernant les différentes situations recensées ;
- de proposer des recommandations permettant d'accroître le niveau de sécurisation des filières concernées, au regard des modifications réglementaires à venir (dont les principales mesures figurent dans le rapport ci-joint) ;
- d'identifier des axes de recherche spécifique à ce domaine.

Le Directeur général de l'Agence française de
sécurité sanitaire des aliments

Martin HIRSCH

Introduction

L'évaluation des risques liés à la contamination des sols et de l'eau par les prions susceptibles de résulter des effluents et des boues d'abattoirs et d'équarrissages requiert l'évaluation qualitative et quantitative des fragments de matériels à risque spécifiés (MRS) qu'il est possible de retrouver dans les effluents à la sortie de ces structures, et le niveau d'infectiosité possible de ces effluents et de ces boues.

Pour cela, l'analyse a été conduite en trois étapes :

- Première étape :
 1. détermination des sites et postes où des fragments de MRS peuvent être évacués par les eaux usées.
 2. essai d'estimation quantitative de la masse des fragments à risque issus des carcasses.

Cette première partie a permis une évaluation de la charge possible en MRS de l'eau qui arrive en tête de la station de pré-traitement installée dans les abattoirs.

- Une deuxième étape comprend une description des pré-traitements effectués dans les abattoirs et un essai d'évaluation quantitative de leur capacité à éliminer les fragments de MRS contenus dans les effluents. Cette étape a pour but d'estimer le niveau d'infectiosité possible de l'eau sortant des abattoirs et destinée à entrer en station d'épuration, que cette station soit propre à l'établissement ou qu'il s'agisse d'une station collective communale.
- La troisième étape consiste, à partir des données recueillies, à évaluer et modéliser le risque.

I- Abattoirs

A- Etat des lieux

1-1- Description des opérations d'abattage

a) Stabulation

Les animaux séjournent dans les locaux de stabulation dans l'attente de l'abattage.

b) Etourdissement

Les animaux sont dirigés dans l'abattoir où ils sont alors dans un premier temps étourdis à l'aide d'un pistolet d'abattage. Cette opération permet d'insensibiliser l'animal tout en maintenant les battements cardiaques en vue de l'opération de saignée.

c) Saignée

Cette opération consiste à recueillir par section ou ponction des vaisseaux sanguins de gros calibre, la plus grande partie possible du sang des animaux afin de provoquer leur mort. Elle se réalise de 2 façons (au choix de l'établissement) :

-Méthode au couteau : La saignée est effectuée par section des carotides et jugulaires à l'aide d'un couteau. Le sang est récupéré dans une auge de saignée puis pompé dans une cuve de stockage à destination de l'équarrissage.

-Méthode au trocart : Le trocart est un couteau muni d'un manche creux sur lequel est fixé un tuyau destiné à canaliser le sang. Ce sang, auquel est ajouté un anticoagulant (citrate de sodium), est dirigé dans une cuve spéciale réfrigérée puis est valorisé en produits congelés ou en produits déshydratés.

d) Dépouille

Cette opération consiste à retirer la peau de l'animal.

e) Eviscération

Cette opération consiste à :

-Retirer les viscères. Les abats blancs (par exemple : estomacs et vessie) sont envoyés vers l'atelier de triperie-boyauderie où, suivant les produits, ils sont vidés, grattés, échaudés ; les abats rouges (par exemple : cœur, foie, poumons) seront inspectés parallèlement à la carcasse avant d'être réfrigérés).

-Faire l'ablation de la tête (cette opération peut avoir lieu à d'autres stades de la chaîne).

f) Aspiration de la moelle épinière

Cette opération vise à retirer la moelle épinière du canal rachidien des bovins en l'aspirant via une canule. Seuls les bovins de plus de 12 mois sont concernés par cette mesure.

g) Fente et douchage des carcasses

Les carcasses sont fendues à l'aide d'une scie. Il peut arriver que la surface de fente soit douchée à l'eau.

h) Finition

Après la fente, l'étape d'aspiration est complétée par une étape de finition qui consiste à retirer les traces de moelle épinière à l'aide d'un couteau, d'un aspirateur ou d'une fraise.

i) Chambres frigorifiques de ressuage

Les carcasses sont mises au froid (température comprise entre 0 et +4°C).

j) Ateliers de découpe

Les carcasses sont commercialisées en l'état ou découpées et conditionnées dans des ateliers de découpe éventuellement annexés à l'abattoir.

k) Ligne de triperie / boyauderie

Chez les bovins, les intestins sont retirés et acheminés en l'état vers le conteneur réservé aux MRS. Les réservoirs digestifs (panses) sont vidés, échaudés, rincés puis réfrigérés.

Chez les petits ruminants, les intestins sont vidés et rincés et parfois délimonés avant toute valorisation (alimentation humaine, produits techniques).

1-2- Définition des tissus et des sites à risque

a) Eléments anatomiques concernés :

L'analyse porte exclusivement sur les organes (appartenant à la liste des MRS) susceptibles de contenir de l'infectiosité et/ou de la PrPres, et dont la structure anatomique ou le mode de préparation rend possible un contact entre leurs structures profondes et le milieu extérieur. Il s'agit du cerveau, de la moelle épinière et des amygdales.

Pour les autres MRS le problème est différent. Outre le fait que pour certains l'infectiosité n'a pas été démontrée, ils sont, pour la plupart d'entre eux, enveloppés dans une capsule de

tissu fibreux souvent dense qui protège d'un contact entre le parenchyme même de l'organe et le milieu extérieur (c'est par exemple le cas de la rate). Pour ce qui est des intestins, l'agent infectieux se trouve a priori dans la paroi et n'est donc pas en contact immédiat avec le milieu extérieur.

b) Définition des postes à risque

-Poste d'étourdissement :

Le procédé autorisé pour les grands ruminants est le pistolet à tige perforante ou à percussion.

Le pistolet à tige perforante est le plus fréquemment utilisé. Il s'applique sur le frontal de l'animal de façon à ce que la tige perforante pénètre dans le cortex cérébral. Toutefois la réglementation prévoit que l'instrument utilisé ne doit « détériorer aucune des parties consommables de l'animal au point de les rendre impropres à la consommation ». Le plus souvent la tige n'atteint que la surface de l'encéphale provoquant un hématome sous-méningé mais pas le tissu nerveux lui-même. Cependant, il ne peut être exclu que des emboles de système nerveux central puissent se retrouver soit dans la carcasse soit être évacués dans le sang¹.

De façon peu fréquente, il peut y avoir contact au poste d'étourdissement entre la tige du pistolet d'abattage et l'encéphale. La conséquence est la présence possible de fragments de cerveau sur la tige du pistolet d'abattage, qui n'est pas systématiquement nettoyée entre chaque animal. En outre, il est possible que des fragments de tissu nerveux puissent être expulsés par l'orifice de trépanation (cf. paragraphe B se rapportant à l'évaluation quantitative). Il y a écoulement de liquide céphalo-rachidien, mais en l'état actuel des connaissances, cet élément n'est pas considéré comme infectieux et n'est pas classé dans les MRS.

En bilan à ce poste une fraction (0.3 g explicité au paragraphe B sur l'évaluation quantitative) d'encéphale peut être expulsée et elle peut se retrouver soit sur le sol de l'aire d'affilage qui est ensuite nettoyé à l'eau, soit sur la peau de la tête qui n'est pas valorisée.
--

-Poste de dépouille et section de la tête :

Au cours des opérations de dépouille, seule la phase de séparation de la tête au niveau de l'articulation atlanto-occipitale met en contact le couteau avec la moelle épinière qui est sectionnée lors de cette étape.

Il n'y a pas d'utilisation d'eau à ce poste excepté pour le nettoyage du couteau. Celui-ci est passé sous l'eau courante (qui est récupérée dans la cuve d'un lavabo), et est ensuite plongé dans le stérilisateur où de l'eau est maintenue à 82°C.

Des éclaboussures sont projetées au sol lors de cette étape chaque fois que l'opérateur sort le couteau du lavabo pour l'animal suivant ou pour l'aiguiser. Compte tenu de l'importante fixation de la moelle épinière à la dure-mère par l'intermédiaire des racines des nerfs rachidiens, il n'y a pas à cette étape de risque d'expulsion de fragments de système nerveux. La lame du couteau ne porte pas de traces macroscopiquement visibles de tissu nerveux.

¹ Source : Programme européen SAFESTUN

La séparation de la tête peut se faire à ce poste ou, sur certaines chaînes, plus en aval. Le problème qui apparaît après l'ablation de la tête est le risque de dissémination de système nerveux central sur le sol à partir de la carcasse ou bien de la tête lorsque cette dernière est convoyée sur une chaîne parallèle à la chaîne d'abattage. Là encore si un écoulement de liquide céphalo-rachidien est possible, la chute de fragments de tissu nerveux n'est pas observée pour la raison développée ci-dessus.

Les eaux de vidange des lavabos et stérilisateurs ainsi que les projections sont évacuées avec l'ensemble des effluents.

-Poste d'éviscération :

Après la ligature de l'œsophage et du rectum, faite au moment de la dépouille, la panse et les intestins sont réceptionnés dans la goulotte d'éviscération. On peut considérer que seules les enveloppes extérieures sont en contact avec le matériel (outils, bac rincé en permanence, tapis d'évacuation vers le local de vidange – coche).

La rate est séparée à ce poste et réceptionnée dans un bac à déchets. Elle est enveloppée d'une capsule épaisse qui n'est pas incisée lors de l'ablation. Le risque de passage de matériel infectieux est donc improbable.

Si les intestins sont acheminés en l'état vers le bac à MRS *via*, par exemple, un convoyeur pneumatique, il n'y a pas de risque de contamination des effluents, du fait du respect de leur intégrité. En revanche, les pratiques utilisant un broyage préalable des intestins et permettant un gain de place (méthodes rencontrées de manière de plus en plus exceptionnelle), induisent un risque de contamination des effluents.

-Prélèvement de l'obex

Le prélèvement de l'obex n'occasionne pas d'utilisation directe d'eau.

Le moment où a lieu l'ablation de l'obex est très variable suivant les abattoirs. Les risques de dispersion d'éléments nerveux peuvent être différents selon le système de transport des têtes utilisé (chariot, convoyeur...). Cependant, le principal risque vient du transport post prélèvement dans le cas où la tête est suspendue par la mandibule, et que des fragments peuvent tomber. En effet, dans ce cas, il y a eu désolidarisation du tronc cérébral de la dure mère et la manipulation de la tête non encore refroidie peut provoquer la chute de fragments. Un autre risque correspond à la chute potentielle de fragments d'obex à l'occasion d'un prélèvement effectué maladroitement.

Le matériel utilisé pour ce prélèvement (cuillère à usage unique) est détruit.

La table de prélèvement est rincée à chaque pause afin de préserver l'état de propreté général de la table. L'eau de rinçage de la table et du sol est évacuée dans le réseau de collecte des eaux usées de l'abattoir.

-Poste de déméduation.

A ce poste un opérateur manipule la canule d'aspiration de la moelle épinière qui est introduite dans le canal rachidien du bovin. La canule est en principe rincée à l'eau chaude (82°C) entre chaque carcasse. Cependant, une grande variation dans les pratiques est observée en fonction de l'établissement. La chute de particules de moelle épinière est possible lors du retrait de la sonde du canal rachidien. Le risque de chute de débris de moelle épinière est fonction de l'opérateur et de la cadence d'abattage. L'eau de rinçage de la canule (environ 2 litres) est évacuée dans le circuit des eaux usées. Il est à noter que le mandrin qui est utilisé pour guider au départ la canule de déméduation est souvent trempé

dans de l'eau chaude qui est ensuite évacuée dans le circuit général. Sur recommandations officielles, la canule est changée tous les 50 bovins puis est orientée vers un circuit de déchets spécifiques (déchets médicaux) pour destruction.

-Poste de fente de la carcasse.

Pour fendre la carcasse, une scie, sur laquelle coule un filet d'eau permettant d'éviter l'échauffement de la lame et d'éliminer la sciure d'os, est utilisée. Il y a inévitablement projection de fines gouttelettes sur toute la zone de découpe. La consommation d'eau peut être estimée à 8 litres par carcasse.

Les éléments emportés par l'eau utilisée par la scie sont constitués essentiellement de sciure d'os qui se retrouve sur le sol, la présence de fragments de moelle épinière est en rapport avec l'efficacité de l'ablation de la moelle à l'étape précédente.

Très souvent la colonne vertébrale ainsi fendue est douchée sur les deux demi-carcasses et l'eau est récupérée dans les caniveaux d'évacuation et évacuée à travers les siphons à panier du sol. Si l'aspiration n'a pas permis un retrait total de la moelle épinière, il est envisageable que des fragments de moelle épinière soient évacués lors du douchage. La consommation d'eau peut être estimée à 4 litres par carcasse.

-Prélèvement des amygdales.

Le site de prélèvement varie suivant l'organisation des chaînes d'abattage. C'est au poste d'ablation de la langue et des joues que les amygdales sont retirées. Très souvent, c'est la langue qui est directement retirée en effectuant une coupe « suisse », et de ce fait les amygdales restent sur la « caboche », elles ne sont pas manipulées et l'ensemble de la caboche avec la cervelle, les yeux et les amygdales est évacué dans le container à MRS.

Dans d'autre cas, la langue est retirée en totalité de la tête, et les amygdales séparées et stockées dans un récipient réservé.

La première méthode évite tout contact entre les amygdales, le milieu extérieur et l'eau, la langue n'étant lavée qu'après son ablation. Dans le second cas, le protocole opératoire ne nécessite pas l'utilisation de l'eau avant l'ablation de la langue mais cela ne peut pas être exclu. Cependant la position des amygdales sous la couche épithéliale ne met pas en contact direct les formations lymphoïdes et l'eau. Ce point est important à considérer car dans le traitement des têtes de veau qui sont épilées et blanchies à l'abattoir, de l'eau entre en contact avec les amygdales et est ensuite évacuée dans le circuit général des eaux usées.

-Poste de finition :

La finition consiste à retirer les fragments résiduels de moelle épinière du canal rachidien au couteau, par aspiration ou à la fraise (plus rarement). Il n'y a pas d'utilisation d'eau mais le risque est de voir des fragments tomber au sol.

La suite des opérations concernant la carcasse, c'est-à-dire l'émoussage puis la réfrigération ne représente pas des étapes où le risque recherché a été identifié.

-Nettoyage de la chaîne, des bacs à MRS, des aires

L'ensemble de l'eau utilisée sur la chaîne transite par des caniveaux puis passe dans des siphons à panier (le diamètre des trous d'évacuation est de 1 à 2 cm).

Le nettoyage de la chaîne s'effectue quotidiennement. D'une façon générale, les opérateurs de la chaîne effectuent un pré-nettoyage qui consiste à éliminer les gros déchets à la raclette et à nettoyer au jet d'eau (provenant du réseau). Ces déchets ainsi que le contenu des

paniers des siphons sont déposés dans les bacs à MRS. Le nettoyage-désinfection s'effectue en 1 phase (application d'un détergent-désinfectant-fongicide, alcalin chloré, à l'aide d'un canon à mousse) ou en 3 phases (nettoyage - rinçage- désinfection). Le rinçage s'effectue sous haute pression à l'aide d'eau du réseau à une température de 30 à 50°C. Les bacs à déchets sont nettoyés de la même façon. Les eaux de nettoyage et de rinçage rejoignent le circuit général des eaux usées.

1-3 Pré-traitements et leurs effets

a) Description

Les eaux issues du hall d'abattage subissent obligatoirement une étape de pré-traitement avant de rejoindre la station d'épuration proprement dite qui peut être propre à l'abattoir ou être une station d'épuration collective.

Le pré-traitement comporte une série d'opérations qui ont pour but d'éliminer la fraction la plus grossière des particules entraînées et de retirer de l'effluent des matières susceptibles de gêner les traitements ultérieurs. Il s'agit : du dégrillage, du dessablage, du tamisage, et de la flottation des graisses (dégraissage).

Le dégrillage permet de retirer les déchets solides en suspension dans les eaux usées comme les papiers, plastiques, boucles d'identification, onglons, matières stercoraires, déchets conjonctifs et divers déchets de viande. Il utilise un système de raclage en échelle qui plonge dans le bac de décantation réceptionnant les eaux issues de l'abattoir. La taille moyenne du tamis est de 2 cm.

Le tamisage permet une filtration de l'eau à travers un tamis rotatif dont les mailles sont de 750 à 1000 microns, et une rétention des déchets solides dont la taille est fonction de la maille du tamis. Les déchets minéraux (sables et graviers) sont aussi retenus à cette étape.

Le dessablage permet l'élimination des sables par dépôt au fond de bassins conçus à cet effet.

Le dégraissage peut être statique ou dynamique. Cette dernière méthode fait appel le plus souvent à l'injection d'air ou d'eau sous pression qui aide la remontée en surface des graisses, qui sont régulièrement raclées et transférées dans une cuve de stockage spécifique.

Une étape supplémentaire (appelée traitement primaire) est parfois mise en œuvre avec floculation des particules colloïdales.

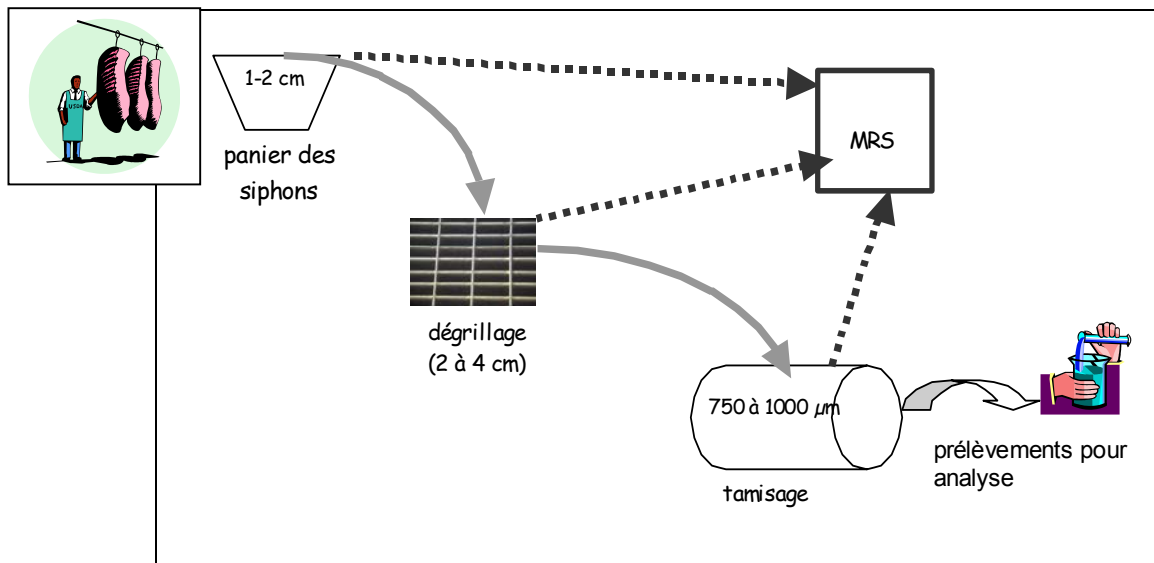


Schéma n°1 : Bilan des effets des pré-traitements

b) Données de terrain

L'ensemble des matériaux retirés lors de ce pré-traitement, et que l'on nomme classiquement les refus de pré-traitement, est éliminé dans le circuit des matières à haut risque à incinérer. La quantité récupérée est variable suivant les conditions de fonctionnement de l'abattoir et peut représenter 0,5 à 1,5% de la quantité d'eau utilisée².

L'eau issue de cette étape de pré-traitement est envoyée à la station d'épuration proprement dite qui utilise, le plus souvent, le système des boues biologiques activées pour assurer la réduction de la charge organique en produisant des boues.

Pour évaluer la part représentée par les fragments de MRS susceptibles de se retrouver dans les refus de dégrillage par rapport à l'ensemble de ces refus, il convient de procéder à une estimation quantitative de ces refus.

L'étude², précédemment citée, fait une extrapolation à 30 352 tonnes brutes / an de refus et 20 235 tonnes / an de graisses. Ces chiffres correspondent à l'ensemble des 342 abattoirs d'animaux de boucherie qui traitent 3,7 millions de TEC par an (chiffre de 2000). Mais parmi ce tonnage celui des bovins représente 1,3 millions de TEC soit 3,6 millions d'animaux.

Les ovins et caprins représentent pour l'année 2001 : 6 894 000 têtes dont 5 405 000 agneaux ce qui laisse 681 000 ovins de réforme et 809 000 caprins, en équivalent TEC cela représente 17 800 TEC pour les ovins de réforme et 2 600 TEC pour les caprins sur un total de 113 400 TEC pour l'ensemble des ovins-caprins³.

Il est possible de penser que la part des refus de dégrillage qui est dévolue aux bovins est de 10 664 tonnes et celle des graisses de 7 109 tonnes, soit respectivement 2,96 kg de refus et 1,97 kg de graisse par tête.

² Evaluation de l'impact du projet de règlement européen établissant les règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux non destinés à la consommation humaine. Analyse économique et technique réalisée par les industries du déchet (FNADE), de l'eau (SPDE), des abattoirs (FNEAP-SNIV-FIA), de l'assainissement (FNSA), du SYPREA (Syndicat des Professionnels du Recyclage en Agriculture).

³ OFIVAL bulletin n°35, 2002

Les principaux MRS susceptibles d'être entraînés dans les eaux usées sont les éléments de moelle épinière et d'encéphale qui sont des matériaux riches en lipides et qui pourraient, pour cette raison, se retrouver dans les déchets de flottation. Il conviendra d'apprécier la part de ce matériel qui peut se retrouver dans les refus de dégrillage ou plus logiquement dans les graisses de flottation et celle qui peut être mise en suspension dans l'eau après le pré-traitement.

On peut rappeler que la quantité d'eau utilisée dans les abattoirs est de l'ordre de 1,5 m³ par TEC, et de 0,7m³ par tonne de déchets traités dans les équarrissages.

Tableau 1 : Répartition des résidus physiques issus des stations de pré-traitement d'abattoirs

Nb step	Refus : (tonnes brutes/an)	Sables : (tonnes brutes/an)	Graisses : (tonnes brutes/an)	Total : (tonnes brutes/an)
Cas étudiés 63	6 188	4 126	4 126	14 440
Extrapolation à 309	30 352	20 235	20 235	70 822

Par ailleurs les dernières dispositions de la réglementation communautaire prévoient qu'un maillage de 6 mm soit installé sur le circuit des eaux usées en abattoirs.

B- Evaluations quantitatives

L'analyse précédente a permis de mettre en évidence la possibilité que des fragments de MRS, notamment de SNC, puissent ne pas être recueillis dans le circuit dédié à ces matériaux et se retrouver éliminés avec les effluents.

Cette deuxième partie relative à la quantification a pour objectif d'exposer les méthodes retenues pour tenter de quantifier ces éléments et les résultats obtenus.

La quantification peut se faire de 2 façons :

- D'une part en récoltant et pesant les fragments de MRS aux différents postes à risque, puis en évaluant l'effet des différentes étapes destinées à retirer les fragments considérés à risque qui sont véhiculés par les effluents liquides des abattoirs, et ce jusqu'à la sortie de la station de pré-traitement.

- D'autre part, en mettant en œuvre des méthodes analytiques sur l'eau recueillie en sortie de la station de pré-traitement dans le but de mettre en évidence des marqueurs du SNC et de procéder à une évaluation quantitative de leur concentration. Pour cela, 2 méthodes ont été retenues : une mesure de la PrP et une mesure de la GFAP.

Il faut tout de suite souligner que les éléments donnés dans ce chapitre correspondent à un travail tout à fait ponctuel destiné à évaluer la faisabilité des méthodes retenues et que les résultats présentés doivent être considérés comme des données très préliminaires qui devront nécessairement être complétées si l'on veut envisager une modélisation du risque.

1-1 Observations sur la chaîne d'abattage et mesures macroscopiques

Une enquête a été menée dans 6 abattoirs de bovins afin d'évaluer aux différents postes référencés précédemment, la quantité de MRS susceptible de se retrouver dans les eaux usées. Les postes à retenir sont :

-le poste d'étourdissement : la fréquence d'expulsion de fragments d'encéphale par l'orifice de trépanation a été observée.

-le poste de démyélinisation : le sol est soigneusement nettoyé à la raclette puis nettoyé de nouveau après passage d'un nombre déterminé de carcasses. L'ensemble des résidus de moelle épinière récolté est alors pesé.

-le poste de prélèvement de l'obex et lors de la vidange des bacs de MRS dans les bennes des camions de ramassage : les résidus présents au fond des bacs ont été pesés.

Les données obtenues fournissent une évaluation par excès des quantités de SNC susceptibles de tomber au sol et de se retrouver dans le circuit des eaux usées. En effet, dans la pratique les paniers des siphons sont vidés dans les bacs de MRS avant qu'il soit procédé au nettoyage de la chaîne et du sol.

A la suite d'observations menées dans les abattoirs, les données suivantes ont été obtenues :

-Au poste d'étourdissement, le pistolet utilisé est doté d'une broche dont l'extrémité est en emporte pièces, sa longueur varie de 79 mm à 110 mm, son diamètre de 11,43 à 12 mm. L'expulsion de fragment d'encéphale a été observée avec une fréquence de l'ordre de 15% à la suite de 8 séries d'observations. Ces fragments, pesant en moyenne 0,3 g par bovin, restent soit adhérents aux poils du masque et donc l'aire de travail n'est pas souillée soit tombent sur le sol. Dans ce cas ils sont évacués dans le circuit du sang qui part en MHR ou dans les eaux de lavage de l'aire d'affilage et se retrouveront dans le circuit des eaux usées de l'abattoir.

-Au poste de prélèvement des obex, l'observation a porté sur 6 séries d'abattage. Il a été ramassé sur la table de prélèvement et le sol alentour 134,3 g de tissu nerveux pour 281 bovins abattus soit une moyenne de 0,48 g par animal. Les variations sont importantes suivant les abattoirs et les séries pouvant aller d'aucune trace à 0,6 g/bovin.

-Dans la zone de démyélinisation et de fente, les enregistrements sur 6 séries soit 321 bovins ont permis de récupérer 87,3 g de tissu nerveux soit 0,27g/carcasse.

-La quantité de tissu nerveux susceptible d'être éliminée lors du nettoyage des aires souillées serait de l'ordre de 0,75 g par bovin. Il faut noter que les contenus des paniers à siphon sont normalement récupérés avant le nettoyage et éliminés avec les MRS, aussi les estimations chiffrées avancées correspondent-elles à une évaluation maximale.

Bilan :

Le **tableau n°2** ci-dessous montre les quantités de matières organiques susceptibles d'être retrouvées sur la chaîne d'abattage :

postes	quantité de SNC collectée sur les postes à risque en g / bovin
étourdissement (trépanation)	0,34
démyélinisation	0,27
prélèvement de l'obex	0,48
vidange des bacs	1,64
total	2,73

Les éléments de MRS présentés dans le tableau précédent sont normalement retenus dans les paniers des siphons situés sous la chaîne d'abattage et éliminés dans le circuit des MRS. Toutefois, lors du lavage du hall d'abattage et des différents locaux de l'établissement, nombre d'éléments figurés sont convoyés dans l'eau et sont repris dans les installations de la station de pré-traitement.

NB : il convient de souligner que les abattoirs ciblés (multi-espèces, tonnage de 10 000 tonnes par an) ne sont pas représentatifs de la situation nationale. Des données plus pertinentes seraient obtenues après une enquête fondée sur un plan d'échantillonnage national.

Le **tableau n°3** reprend les quantités de matières organiques et aussi de détritiques divers (boucles auriculaires, fragments de ficelle etc....) éliminés par le dégrillage et le tamisage et qui représentent ce qu'on appelle les refus de pré-traitement (cf. I A 1-3) :

pré-traitement	quantité de matières retenue en kg / bovin
dégrillage	2.96
tamisage ($\approx 800 \mu\text{m}$)	
flottation	1.87
total	4.83

Il est certain que dans cette masse peuvent se retrouver des fragments de MRS dont la taille est suffisamment importante pour qu'ils soient retenus par les mailles des différents systèmes, mais il n'est pas possible d'effectuer un tri macroscopique ou même une détermination microscopique de la proportion d'éléments du SNC susceptibles de se retrouver dans ces refus. C'est pourquoi des mesures biochimiques de marqueurs du SNC ont été menées sur les eaux en sortie de la station de pré-traitement.

1-2 Mesures biochimiques

Le but de ce travail était d'évaluer la quantité de prion qui pourrait être présente dans les effluents liquides à la sortie des abattoirs à l'aide d'une approche biochimique. La seule façon absolue d'aborder ce problème aurait été de mesurer le caractère infectieux de ces effluents sur un grand nombre de prélèvements, à l'aide de modèles animaux (souris ou ruminants infectés par voie intracrânienne). Cette approche n'apparaissait pas réaliste à double titre :

- en raison de la lourdeur (notamment au regard des coûts et délais) de ce type d'expérimentation ;
- compte tenu du faible pourcentage d'animaux infectés détectés dans les abattoirs (environ 1/40.000, en France en 2002), ce travail serait extrêmement aléatoire.

Pour les mêmes raisons, il aurait été illusoire d'essayer de détecter dans ces effluents la présence de PrPres, seul marqueur direct connu pour les ESST. La seule approche rationnelle envisageable était de mesurer des marqueurs biochimiques des MRS et notamment des marqueurs du système nerveux central (SNC), puisque comme indiqué précédemment, chez les bovins infectés par l'ESB, la grande majorité du matériel infectieux est concentrée dans le cerveau et la moelle épinière. Deux approches fondées d'une part sur le dosage de la PrP normale et d'autre part sur la mesure d'un autre marqueur du SNC, la GFAP, ont été étudiées.

-Le choix de mesurer dans les effluents d'abattoir la PrP normale (PrP^{sens}) appelle quelques commentaires. En effet, si cette protéine est particulièrement concentrée dans le système nerveux central, elle est aussi présente dans la quasi-totalité des tissus et fluides biologiques des mammifères (voir Moudjou *et al.* pour le mouton). Elle est notamment présente en quantité significative dans le sang (plasma et cellules sanguines). On s'attend par conséquent à ce qu'elle soit présente dans ces effluents liquides. Elle ne peut donc pas être considérée comme un marqueur spécifique du SNC. Cependant, compte tenu du rôle joué par cette protéine dans la pathogenèse des ESST, on peut considérer que, dans le cadre du scénario du pire, que la PrP^{sens} est un bon marqueur des tissus capables de répliquer la PrP^{Pres} dont elle est le précurseur. D'autre part, il était intéressant d'évaluer les méthodes disponibles quant à leur capacité à détecter la protéine dans un milieu très différent des tissus habituellement analysés.

-Le choix de la GFAP résulte des travaux effectués lors d'un programme de recherche Européen mené conjointement par des partenaires anglais, irlandais et français et dont l'Université de Bristol était le coordinateur⁴. Cette étude a conclu que parmi les six protéines étudiées dans ce programme (Syntaxine 1-B, Annexine V, S100 β , Enolase, Synaptophysine, et la GFAP), la GFAP était le meilleur marqueur du SNC et notamment de la moelle épinière.

Des analyses ont été réalisées, pour ces deux marqueurs, sur des prélèvements issus de trois abattoirs différents, en aval de la station de pré-traitement située dans ces abattoirs. Ces analyses ont été réalisées à l'aide de dosages immunologiques développés dans un cadre de recherche (Service de Pharmacologie et d'Immunologie du CEA/Saclay pour la PrP, ADIV/Clermont Ferrand, pour la GFAP). Dans les deux cas ce travail n'a pas abouti et n'a pas permis d'évaluer de façon fiable la quantité de SNC présente dans les effluents d'abattoir après les opérations de pré traitement. Ainsi, pour ce qui est de la PrP, il a été possible de détecter la PrP dans la fraction "soluble"⁵ de ces effluents mais plusieurs données convergentes indiquent que la PrP détectée provient essentiellement du sang présent en quantité importante dans ces effluents. De la même façon, les mesures réalisées sur le contenu en GFAP de ces effluents ne sont pas cohérentes avec les relevés faits en abattoir. Dans ce cas, il semble que l'étalonnage du test soit en cause.

Il est clair que les travaux réalisés dans le cadre de cette expertise doivent être considérés comme des travaux purement exploratoires et ne peuvent pas être utilisés pour fonder un avis quelconque concernant le niveau de risque associé à ces effluents. Les tests utilisés doivent être améliorés et validés spécifiquement pour cette application. Il conviendrait aussi de rechercher d'autres marqueurs plus spécifiques du SNC.

Ces travaux préliminaires ont tout de même permis de mieux définir les objectifs à atteindre pour cette approche biochimique et une première estimation des méthodes analytiques disponibles.

C- Devenir des particules infectieuses dans les eaux usées des abattoirs et équarrissages (selon le scénario du pire)

1-1 Hypothèses de travail

Les rapporteurs ont fait le choix de travailler selon un scénario du pire c'est-à-dire d'essayer d'évaluer les risques liés à l'éventuelle dispersion des prions dans l'environnement et les conséquences en termes d'exposition pour les ruminants et l'homme, dans le cas particulier

⁴ programme REMCORD-FAIR-PL97-3301

⁵ dans ces expériences, la fraction "soluble" des effluents est définie comme la fraction non sédimentable (6000 g pendant 30 minutes), elle contient la PrP en solution ou celle présente dans de petites particules tissulaires ou cellulaires.

où un bovin malade passe sur la chaîne d'abattage. Il faut noter que cet événement est très rare puisqu'en France 1 animal sur 40 000 environ se présentant à l'abattoir, sera détecté positif par les tests rapides. Il a été considéré que la totalité du risque était associée au système nerveux central (cerveau, moelle épinière) des bovins. Dans ce schéma, par exemple, les risques liés au sang sont négligés.

Pour mener à bien cette évaluation, il faut aussi faire des hypothèses sur les propriétés biochimiques de l'agent infectieux dans les effluents considérés.

Deux cas de figure ont été étudiés :

-Dans une première hypothèse l'agent est présent dans les effluents dans son contexte naturel, c'est à dire qu'il reste associé aux tissus ou aux cellules et circulera essentiellement sous la forme de fragments tissulaires ou de petites particules. Cette hypothèse est probablement celle qui rend le mieux compte de ce qui se passe sur le terrain. En effet, l'analyse de la chaîne d'abattage montre qu'en règle générale les fragments de tissus nerveux centraux, qui peuvent être transportés par les effluents, n'ont pas été au contact de détergents avant d'entrer dans le circuit de pré-traitement. Dans ces conditions, l'agent infectieux (et la PrPres associée) n'est pas extrait des structures cellulaires. Il est envisageable que dans ce cas, le comportement d'un tissu infecté sera similaire à celui d'un tissu sain et donc que l'extrapolation au cas d'un animal infecté des données acquises sur les effluents couramment collectés dans les abattoirs sera possible.

-Il faut cependant envisager aussi le cas où l'agent infectieux et son marqueur direct, la PrPres, ont été extraits des structures cellulaires et tissulaires. En effet, des détergents peuvent être employés lors du lavage de l'abattoir. Ces détergents pourraient faciliter l'extraction puis l'agrégation des particules infectieuses dont les propriétés biochimiques ne sont pas nécessairement identiques à celles issues d'animaux sains. Cette hypothèse se situe clairement dans le cadre d'un scénario du pire puisque ce processus d'extraction agrégation produit un agent infectieux de plus petite taille dont les propriétés sont mal connues.

Enfin, la survenue d'un événement exceptionnel comme une inondation avec dispersion sans traitement des eaux usées contenant des tissus potentiellement infectieux n'est pas traitée dans le chapitre qui suit.

1-2 Propriétés de l'agent infectieux

Les particules infectieuses de PrP en présence de détergents ont un diamètre de l'ordre de 4 nm. Elles traversent donc des filtres de 200 nm. La taille de ces particules en l'absence de détergent, leur hétérogénéité et leurs propriétés d'interaction avec les lipides et d'adsorption aux surfaces sont inconnues. Il en est de même de leurs propriétés en présence de graisses à différentes températures (en particulier à des températures élevées), ainsi qu'en présence ou en absence de détergents, où des micelles avec la partie hydrophile de la PrPres exposée au solvant, *i.e.* dirigée vers l'extérieur et agissant comme une molécule amphiphile, et pouvant servir de matrice pourraient voir le jour.

Les propriétés d'adsorption des particules infectieuses de la PrP à différents types de surfaces ne sont pas connues. Ces propriétés conditionnent l'élimination de ces particules au voisinage de la source de contamination. Néanmoins, dans le cas où les particules infectieuses se lient au voisinage de la source de contamination, cette surface deviendrait rapidement saturée et l'infectiosité s'étendrait de proche en proche, en particulier si l'agent est persistant.

1-3 L'agent infectieux dans l'eau

Dans l'hypothèse où les particules infectieuses seraient en suspension dans l'eau utilisée lors de l'abattage ou du nettoyage des surfaces de travail et utiliseraient cette eau comme vecteur de transport, elles ne seraient pas retenues par les dispositifs de dégrillage dont les mailles ont un diamètre de l'ordre de 2 cm.

L'eau est par la suite tamisée. Le tamis ne retient que des particules dont la diamètre est supérieure à 0,6 mm et par conséquent de masse supérieure à 0,06 mg. En effet, une particule sphérique de 0,6 mm de diamètre a un volume approximatif de $0,06 \text{ mm}^3$. Si cette particule a une densité égale à celle de l'eau, sa masse sera de 0,06 mg. Une telle particule comme toute particule de masse plus faible peut se retrouver en présence de la biomasse « boues » des stations d'épuration des eaux usées.

D- Comportement en station d'épuration

1-1 L'agent infectieux en présence des « boues » des stations d'épuration

La dégradation de la forme infectieuse de la PrP par cette biomasse est probable mais incertaine. En effet, l'adsorption de ces particules aux microorganismes dans les « boues », et leur dégradation par cette biomasse n'ont pas été documentées. Ainsi la possibilité d'une activation de cette charge en présence de divers produits présents dans la biomasse (métaux, aldéhydes...) ne peut être exclue.

1-2 L'agent infectieux à la sortie des stations d'épuration

Dans l'hypothèse où les particules infectieuses ne seraient pas totalement éliminées par les boues et qu'elles utilisent l'eau comme vecteur de transport, il faut envisager deux cas de figure pour évaluer le risque encouru par les animaux consommant l'eau. En effet, le risque de propagation de l'infectiosité n'est pas le même si l'on considère les particules infectieuses comme sécables ou pas.

1er cas de figure : les particules ne sont pas sécables et de ce fait ne peuvent être assimilées à un soluté que l'on peut diluer. Dans ce cas, l'ingestion par un animal d'une faible quantité de matériel infectieux qui se trouverait dans l'eau pourrait, selon la taille de la particule ingérée, transmettre une dose infectieuse. Pour estimer le risque dans ce cas, il faudrait déterminer la probabilité d'ingestion par un individu d'une telle particule ainsi que la probabilité de rejet dans l'environnement de ces particules.

2ème cas de figure : les particules infectieuses sont de faible taille et peuvent être assimilées à un soluté que l'on dilue dans l'eau. Dans ce cas un plus grand nombre d'individus pourraient être amenés à ingérer ces particules dont l'infectiosité pourrait dépendre soit de la taille de la particule (dose infectante) soit du cumul des particules à la suite d'une consommation fractionnée. Dans ce cas, il faudrait estimer la probabilité pour un individu d'accumuler une dose infectieuse à la suite d'ingestion de fractions de cette dose⁶.

⁶ Dans le cas où l'agent infectieux n'a pas été dégradé significativement par la biomasse, et si 0,1 mg d'équivalent de cerveau de bovins infecté est rejeté dans l'environnement par litre d'eau issu d'une station d'épuration, et étant donné que la dose infectieuse pour les bovins est de l'ordre de 0,1 g (avis du CSD). Si la dose infectieuse pour l'homme est identique (on se place ici dans un scénario du pire puisqu'on suppose qu'il n'existe pas de barrière d'espèces), une dose infectieuse correspondrait à 1000 litres d'eau contaminée. Cette quantité d'eau est proche de ce qui est utilisé par TEC.

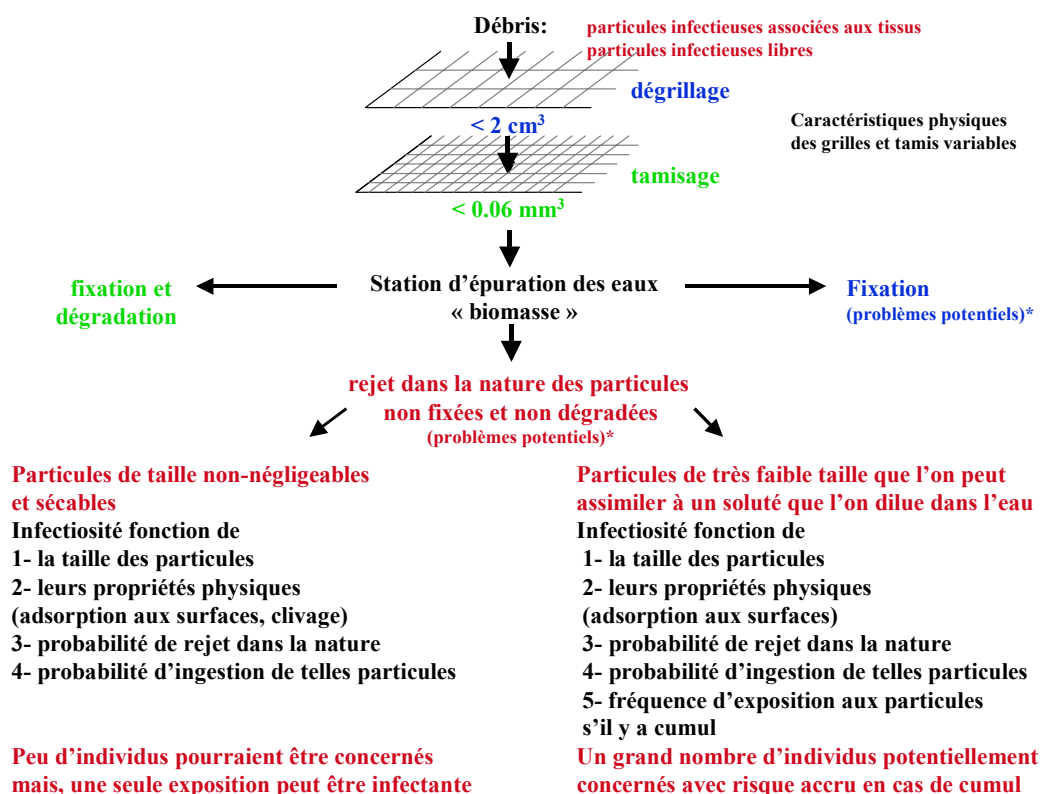
Dans le second cas de figure, il est important de ne pas négliger le fait que la terre contaminée puisse concentrer l'infectiosité « diffuse ou diluée ». En effet, la nature du sol, argile, calcaire etc..., ou la teneur en métaux du sol (la PrPc a une forte affinité pour les métaux qui pourraient même jouer un rôle dans la conversion PrPc>PrPres) est primordiale dans la rétention / filtration et concentration de particules infectieuses provenant de l'eau qui filtre à travers les sédiments. La forme infectieuse de la PrP pourrait, comme d'autres pathogènes, contaminer des nappes phréatiques. Le voyage de l'eau de la surface vers les nappes phréatiques est un processus lent (une à plusieurs années). Certains sols sont perméables comme le sol calcaire, des particules infectieuses peuvent alors parvenir à la nappe phréatique à travers des micro fissures (réduction significative du temps nous séparant d'une éventuelle contamination), tandis que l'argile est imperméable et va probablement plutôt retenir les particules en surface et probablement les concentrer localement. Enfin, l'agent infectieux peut atteindre une nappe phréatique par le ruissellement d'une eau contaminée à travers un forage et cela quelque soit la nature du sol.

1-3 L'agent infectieux lié à un support solide

Les particules infectieuses présentes dans les « boues » des stations d'épuration ou amenées par l'eau et concentrées dans le sol rentrent dans cette catégorie. Le risque de transmission de l'agent pathogène est ici lié à l'ingestion de terre contaminée par des herbivores qui rentrent dans la chaîne alimentaire d'autres animaux.

La forme infectieuse de la PrP résiste partiellement à la dégradation par les microorganismes présents dans le sol⁷ (Brown et Gajdusek, 1991, Palsson PA, 1979). Il est de ce fait important, dans le cas où la forme infectieuse de la PrP ne serait pas complètement dégradée dans les « boues » des stations d'épuration que ces boues ne soient pas utilisées comme fertilisant et épandues dans la nature mais considérées comme déchets à risque.

⁷ Une réduction d'un facteur 100 de l'infectiosité de la souche 263K adaptée au hamster est observée après trois ans sans diffusion significative de l'infectiosité. Il s'agit d'un surnageant de centrifugation à 150 g pendant 5 minutes d'un homogénat de cervelles de hamsters infectés, mélangé à de la terre placé dans des pots de fleurs et enfoui.



*les problèmes devront être traités dans les axes de recherche

Schéma n°2 : résumé du devenir des particules infectieuses dans les eaux usées des abattoirs et équarrissages

1-4 Bilan :

Les relevés réalisés sur la chaîne d'abattage ont montré que des quantités significatives (ordre de grandeur estimé à quelques grammes par bovins, cf. tableau n°2) de SNC pouvaient être transportées par les effluents liquides. A raison de 1,5 m³ d'eau utilisée par carcasse, ceci correspond à une concentration de quelques mg par litre d'effluent. Si cette valeur est comparée à la dose infectieuse par voie orale estimée à ce jour pour les bovins (0,1 g de cerveau, cf. expériences actuellement en cours menées par les britanniques et dont les premiers résultats sont présentés dans un avis du CSD en date du 5 juin 2003⁸) ceci signifie qu'une dose infectieuse serait contenue dans 10 à 100 litres d'effluent. La même conclusion pourrait être tirée pour l'homme, dans un scénario du pire, qui négligerait la probable barrière d'espèce entre les bovins et l'homme. Il est évident que les pré-traitements appliqués dans les abattoirs doivent apporter une réduction sensible de cette charge infectieuse potentielle. En effet, une large proportion des fragments de SNC collectés sur la chaîne d'abattage ont, à l'évidence, une taille supérieure à celle du tamis utilisé pendant les opérations de tamisage. Cependant, les mesures biochimiques réalisées en aval des stations de pré-traitement n'ont pas permis d'objectiver et de quantifier cette réduction. De la même façon, il est très probable que les traitements effectués dans les stations d'épuration réduisent d'un facteur très important les quantités de SNC présentes dans les effluents et probablement aussi l'infectiosité qui pourrait y être associée. A l'heure actuelle, aucune donnée expérimentale pour chiffrer l'effet de ces traitements n'est à notre disposition. Dans

⁸ Overview of the BSE risk assessments of the European Commission's SSC and it's TSE/BSE *ad hoc* group adopted between september 1997 and april 2003

l'hypothèse raisonnable où chacune des étapes (pré-traitement et traitement) réduirait d'un facteur 10 la quantité d'agent infectieux dans ces effluents, la conclusion à laquelle nous aboutirions est qu'une dose infectieuse par voie orale serait contenue dans un volume d'eau compris entre 1000 et 10000 litres. Ces chiffres suggèrent donc un risque faible pour l'environnement, le cheptel bovin et l'homme, surtout si l'on tient compte du caractère rare de l'évènement contaminant pris en compte (environ 1 animal positif aux tests rapides sur 40.000 animaux abattus). Notre incapacité à évaluer quantitativement et objectivement la réduction d'infectiosité induite par les traitements des effluents d'abattoir impose la prudence et fait apparaître la nécessité de renforcer nos connaissances dans ce domaine.

Pour évaluer les risques liés à la présence possible de l'agent responsable de l'ESB (et donc de la PrPres associée) dans les rejets d'épuration que ce soit dans l'eau ou dans les boues biologiques, il conviendrait d'avoir des informations précises sur le comportement de la PrP dans ces effluents, sa partition entre l'eau et les matières en suspension puis son devenir au contact des boues activées. De même pour envisager le devenir de l'agent infectieux lors de l'épandage des boues, il conviendrait là encore de réunir des informations scientifiques, non disponibles à l'heure actuelle, sur le devenir de la PrP dans le sol, les possibilités de dégradation, la persistance du pouvoir infectant de la PrPres. A l'évidence, pour obtenir ces données, il faudra développer de nouvelles méthodes d'analyse et étudier dans des modèles expérimentaux simplifiés (avec des tissus infectés) le comportement des prions dans les différentes situations décrites dans ce rapport.

II Equarrissages

La description qui suit sur l'évaluation des postes à risque dans les équarrissages repose sur l'analyse d'observations réalisées sur un seul site d'équarrissage et les données ne se veulent pas être représentatives de l'ensemble des équarrissages. Pour cela, il serait utile de mener une enquête sur les circuits des eaux utilisées dans les équarrissages, ou de pouvoir étudier les données déjà existantes qui sont fournies par les établissements lors de leur déclaration d'activité auprès des organismes de contrôle dont ils relèvent.

A-Traitement des matières à haut risque :

Seuls les ateliers traitant des produits à haut risque à incinérer sont ciblés par la présente analyse. Les équarrissages reçoivent 2 types de produits à haut risque : les cadavres d'animaux morts ou euthanasiés et les MRS issus des abattoirs. Le circuit de ces 2 types de produits est différent.

-Les MRS sont apportés à l'équarrissage dans des camions étanches. Ces véhicules sont réceptionnés sur une aire bétonnée et déversent leur contenu directement dans une trémie. Lors de cette opération, des liquides s'écoulent en faible quantité, notamment lors de la libération des vis de serrage avant l'ouverture des bennes. Lorsque le véhicule est déchargé, le rinçage de l'intérieur de la benne s'effectue sur la même aire à l'aide d'eau froide sous pression. L'ensemble des liquides s'écoulant à l'ouverture de la benne, composés de l'eau de nettoyage de la benne et de l'eau de nettoyage de l'aire bétonnée, est récupéré dans un circuit dédié qui rassemble tous ces éléments et les envoie pour être traité à 130°C pendant 20 minutes. Après refroidissement les eaux ainsi stérilisées rejoignent le circuit général des eaux usées.

-Les cadavres arrivent dans des bétailières qui sont vidées sur une aire bétonnée. Lorsque les cadavres sont en état de putréfaction, il arrive que les panses soient éventrées.

Sur les bovins de plus de 24 mois, un opérateur procède à l'ablation de la tête au niveau de l'articulation atlanto-occipitale, et la tête est posée sur une table dans l'attente de la

réalisation du prélèvement de l'obex. Le reste du cadavre est alors mis sans autre incision dans un broyeur avant de rejoindre la trémie avec les MRS.

Le seul risque de dispersion de MRS est celui qui résulte, comme dans le cas des abattoirs, de l'opération de section de la tête et de prélèvement de l'obex.

Lorsque ces opérations se passent sur l'aire où sont traités les MRS, les éventuels fragments de système nerveux central qui pourraient chuter sur le sol sont repris dans le circuit des eaux destinées à être stérilisées.

Le reste des opérations de traitement des MRS se passe dans des circuits fermés composés de vis sans fin, tubes, réservoirs, les eaux de lavage de ces éléments rejoignant le circuit des eaux à stériliser.

Le circuit général des eaux usées reçoit les eaux de lavage des cours, de l'aire de lavage de l'extérieur des camions et de l'aire de réception des cadavres.

B-Fonctionnement de la station de pré-traitement et de traitement.

Les eaux usées du circuit général et les eaux usées traitées thermiquement passent dans un dégrillage sous forme de racloir, les matières issues de ce dégrillage sont renvoyées dans les trémies de MRS. Puis ont lieu les opérations de décantation (qui permet d'éliminer les sables), et de flottation des graisses par injection d'eau sous pression (qui permet de faire remonter à la surface les éléments plus légers). Les 2 parties solides (sables et résidus de flottation) rejoignent les trémies de MRS. Les eaux sont ensuite conduites dans un bassin maintenu en anaérobiose de la station d'épuration, puis passent dans des bassins de boues activées avec injection d'air. Les boues du bac en anaérobiose sont régulièrement racloées et stockées dans un bac récupérateur de boues. L'eau épurée est envoyée dans un bassin de décantation où les boues se déposent, l'eau est ensuite, après chloration, rejetée dans le cours d'eau voisin et les boues rejoignent le bassin récupérateur pour ensuite être centrifugées. L'eau issue de la centrifugation des boues rejoint le circuit des eaux usées et les boues concentrées celui des MRS en vue d'un traitement thermique et de la réduction en farines à incinérer.

En bilan, compte tenu du fonctionnement des ateliers d'équarrissage, les fragments d'organes susceptibles de contenir de l'infectiosité sont représentés :

- pour les cadavres : par d'éventuels fragments de tronc cérébral lors de la séparation de la tête ou du prélèvement de l'obex ;
- pour les MRS issus d'abattoirs : par les fragments provenant du lavage des bennes des véhicules de transport. Ces éléments sont repris dans le circuit des eaux usées destinées à être stérilisées. Les éléments solides, retirés lors des opérations de dégrillage des eaux usées, subissent le traitement thermique dévolu aux matières à haut risque.

Ces éléments sont repris dans le circuit des eaux usées destinées à être stérilisées. Les éléments solides, retirés lors des opérations de dégrillage des eaux usées, subissent le traitement thermique dévolu aux matières à haut risque.

III Avis du CES EAUX

Le CES EAUX a été sollicité par le CES ESST le 18 décembre 2002 pour répondre à la demande d'appui scientifique et technique. Il s'agit :

-de l'étude du comportement en station d'épuration des particules de nature protéique de quelques microns susceptibles de contenir du prion et qui sont issues du réseau d'évacuation des effluents d'abattoir ;

-de l'identification des voies de contamination par le prion des animaux *via* l'environnement.
Sa réponse se trouve en annexe 3.

IV Avis et recommandations du CES ESST

La dissémination de prions d'origine bovine dans l'environnement via les fèces n'est pas considéré comme un risque connu et a été considéré comme négligeable. La contamination des eaux de surface et souterraines est donc uniquement envisagée à partir des eaux et boues issues des abattoirs et des équarrissages à travers leur devenir dans l'environnement.

En premier lieu, il est à noter que le risque actuel de dispersion de l'agent infectieux dans l'environnement par l'intermédiaire des eaux et boues à la sortie des stations d'épuration ne peut qu'avoir décru de façon significative du fait de l'application des mesures de lutte contre cet agent pathogène et de la diminution des cas d'animaux infectés.

A- Conclusions de l'analyse :

L'analyse menée par les experts a permis :

-de réaliser des mesures pondérales à différents postes de la chaîne d'abattage qui montrent que des fragments de tissus potentiellement infectieux sont susceptibles de se retrouver dans les effluents issus des abattoirs.

-d'effectuer des essais de quantification de marqueurs issus du système nerveux central (dosages de la PrP et de la GFAP) dans les effluents prélevés en aval de la station de pré-traitement. Ces mesures et/ ou la fiabilité des méthodes employées n'ont pas permis d'évaluer de façon fiable la quantité de système nerveux central présents dans ces effluents.

-de révéler l'absence de données scientifiques concernant le devenir de l'infectiosité lors du passage en station d'épuration et dans les rejets issus de ces stations.

B- Recommandations du Comité :

Concernant spécifiquement les abattoirs, le Comité recommande de :

- mener une enquête sur un nombre d'établissements statistiquement significatif et représentatif du parc national d'abattoirs, permettant une évaluation quantitative précise de la présence de fragments de système nerveux central dans les effluents et la détermination de l'effet des pré-traitements, et d'en déduire ce qui est pertinent pour diminuer la charge en éléments infectieux ;
- identifier le ou les marqueurs spécifiques du système nerveux central (notamment de la moelle épinière) permettant d'évaluer la teneur en tissus potentiellement infectieux dans les diverses eaux issues des établissements et notamment celles issues des installations de pré-traitements et destinées aux stations d'épuration, et mettre en place un système de contrôle continu ;

- déterminer la partition de l'agent infectieux au contact des boues activées (biologiques) et d'évaluer le degré d'inactivation de l'agent résultant de ce traitement. En l'absence de données concernant ce dernier point, le Comité attire l'attention sur le risque de présence résiduelle d'infectiosité associée à ces boues. En effet, sous certaines conditions, ces boues pourraient concentrer l'agent pathogène s'il n'est pas dégradé en leur présence.

Concernant spécifiquement les équarrissages, et devant le manque d'informations disponibles, le Comité recommande de mener une enquête exhaustive visant à identifier les points à risque et à faire un relevé des mesures mises en œuvre pour s'assurer de l'absence de dispersion des MRS.

C- Réponses à la saisine de l'Afssa en date du 3 septembre 2002 :

A la question des risques de contamination des sols et de l'eau par le prion susceptibles de résulter des effluents et des boues d'abattoirs, le Comité estime ne pas disposer de données scientifiques suffisantes pour fournir un avis étayé. Il apparaît néanmoins que l'essentiel du risque serait lié à l'épandage des boues.

A la question des risques sanitaires liés à la consommation d'eau produite à partir de prises d'eau situées en aval d'établissements d'équarrissage, l'ensemble des considérations énoncées ci-dessus pour les abattoirs s'appliquent aux équarrissages avec les particularités suivantes :

- la charge infectieuse totale entrante dans ces installations est nettement supérieure (du fait de l'incidence de l'ESB détectée en équarrissage qui est 30 à 40 fois supérieure à celle mesurée en abattoir et du fait que l'ensemble des MRS collectés en abattoir converge vers les équarrissages) ;
- cette surcharge est en partie contre-balancée d'une part par l'application de traitements spécifiques à certains effluents considérés comme présentant un risque supérieur, et d'autre part par la présence de stations d'épuration dédiées et autonomes.

A la question relative à l'efficacité des traitements en terme d'inactivation de l'agent pathogène, le Comité a fourni un rapport d'analyse sur la technologie des oxydeurs thermiques le 15 janvier 2003. A ce stade, aucune comparaison avec d'autres méthodes n'a été réalisée. Cependant, les résultats de la demande d'éléments complémentaires émanant du CSHPF section des eaux concernant le traitement des effluents d'une usine d'équarrissage traitant des matières à haut risque, laissent apparaître de fréquents dysfonctionnements, d'une part en ce qui concerne la capacité du système à traiter les effluents (en effet, il a été noté que lors de défaillances techniques, des eaux incomplètement traitées sont rejetées vers le milieu naturel), et d'autre part en ce qui concerne l'ultrafiltration, outre le fait que ce système se soit révélé peu fiable, le rapport n'apporte pas d'éléments permettant d'en apprécier l'efficacité au regard des prions. L'ensemble de ces informations permet de confirmer l'importance de la prévention des contaminations des effluents par les MRS en amont de la station de traitement des eaux.

D- Axes de recherche à développer :

1-1 Définition des besoins :

A l'issue de cette analyse, le Comité a identifié des axes de recherche qui sont à développer afin d'acquérir des connaissances scientifiques et techniques complémentaires. Il s'agit notamment :

- En ce qui concerne le comportement de l'agent pathogène :

- du devenir de l'agent au contact des boues de stations d'épuration (études des phénomènes de biodégradations aérobies ou anaérobies, adsorption, inactivation physicochimique...).
- de l'effet de concentration de l'agent par saturation des surfaces (intégration dans les biofilms, dans les dépôts de canalisations...).
- de la filtration de l'agent à travers les sols.

- En ce qui concerne les méthodes de détection :

- d'identifier un ou plusieurs marqueurs très spécifiques du système nerveux central et de développer les méthodes d'analyse de ce marqueur permettant sa mesure dans les effluents des stations de pré-traitement et d'épuration.
- de valider les méthodes d'analyse capables d'étudier le devenir de l'agent infectieux responsable de l'ESB au contact des boues des stations d'épuration.

1-2 Moyens à mettre en œuvre :

Une partie des moyens à mettre en œuvre pour répondre aux besoins ont été définis avec l'aide d'experts du CES EAUX et d'experts externes à l'Agence. Il s'agit :

- Identifier des marqueurs, couplés à une technique de détection sensible, permettant de suivre les tissus nerveux centraux dans le circuit des effluents

L'utilisation de marqueurs aurait pour objectif d'évaluer la quantité totale de tissus nerveux dans les effluents des abattoirs ainsi que le facteur de dilution de l'agent pathogène dans les effluents et son adsorption aux surfaces. Par ailleurs, cette technique pourrait également être appliquée sur le terrain pour vérifier la qualité des eaux rejetées par les abattoirs dans le milieu naturel. Il faudrait alors prévoir un plan d'échantillonnage national.

Deux types de marqueurs pourraient être utilisés :

-des marqueurs exogènes qui seraient artificiellement ajoutés avant les différents pré-traitements au sein des établissements concernés, puis détectés à différentes étapes du processus. De tels marqueurs pourraient notamment être composés de peptides présentant des caractéristiques physico-chimiques similaires à la PrP-res (peptides bêta amyloïdes, PrP recombinante) qui pourraient être couplés à des billes magnétiques ou à un fluorophore pour faciliter leur détection. Il est également envisageable d'utiliser des homogénats de tissus nerveux d'animaux fluorescents de façon artificielle (couplage à un fluorophore) ou

spontanée (tissus provenant d'animaux transgéniques exprimant une protéine fluorescente, comme la GFAP).

-des marqueurs endogènes spécifiques du système nerveux central. Si les deux marqueurs évalués durant cette étude (PrP, GFAP) s'avéraient définitivement inutilisables, il faudrait essayer d'identifier d'autres molécules spécifiquement localisées dans le système nerveux central pour lesquelles des techniques d'analyse très sensibles et faciles à mettre en œuvre seraient disponibles. La sensibilité est particulièrement critique car elle doit permettre le suivi du marqueur tout le long de la chaîne de traitement. A terme, l'intérêt de cette approche est de permettre d'effectuer des contrôles en routine, à la sortie des stations de pré-traitement et d'épuration.

- Développer des modèles miniaturisés des procédés de traitement :

Le développement et l'utilisation de stations d'épuration pilotes, utilisées à l'échelle d'un laboratoire de recherche, permettrait d'étudier la partition de l'agent infectieux entre les différentes matrices (boues, graisses, eaux) et la biodégradation subie au contact des effluents et des boues activées (c'est à dire la réduction de l'infectiosité).

Le protocole consisterait en une surcharge des effluents en amont de la station ou des boues par différentes souches d'agent pathogène (ESB, ESB adaptée à la souris, tremblante du hamster). Différents types de boues, prélevées sur le terrain, seraient testées en aérobiose et en anaérobiose.

Par la suite, seraient réalisées des mesures :

- de dégradation de la PrP avec l'utilisation de tests biochimiques (western blot et ELISA),
- des constantes physico-chimiques,
- d'infectiosité par injection intracérébrale chez l'animal (hamster, souris) ou par utilisation de modèles cellulaires.

Il est important de noter que de l'ensemble de ces manipulations nécessite au moins 2 ans pour être réalisées de manière fiable.

Références bibliographiques

Brown, P., Gadjusek, D. C., 1991. Survival of scrapie virus after 3 years interment. *Lancet*. 337, 269-70

Moudjou, M., Frobert, Y., Grassi, J., La Bonnardiere, C. 2001. Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *J Gen Virol*.82, 2017-24

Palsson PA.1979 : Rida (scrapie) in Iceland and its epidemiology.vol I. New York : Academic Press : 357-66

Overview of the BSE risk assessments of the European Commission's Scientific Steering Committee (SSC) and it's ad hoc group adopted between september 1997 and april 2003

Annexe 2 : Eléments de réponse du CES EAUX au CES ESST



DIRECTION DE
L'EVALUATION DES
RISQUES
NUTRITIONNELS ET
SANITAIRES

Unité
d'évaluation
des risques
liés à l'eau

Le Président du Comité d'experts spécialisé « Eaux »

à

Monsieur le Professeur Marc ELOIT

Président du Comité d'experts spécialisé sur les ESST
Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
7 bis, avenue du Général de Gaulle
94 701 MAISONS-ALFORT CEDEX

Maisons-Alfort, le

Objet : « prions et environnement » : réponse à la demande d'appui scientifique et technique du CES ESST

Monsieur le président,

Le CES EAUX a été sollicité le 18 décembre 2002, par le CES ESST pour répondre à des questions dépendantes de son domaine de compétence. Il s'agit :

1. de l'étude du comportement en station d'épuration des particules de nature protéique de quelques microns susceptibles de contenir du prion et qui sont issues du réseau d'évacuation des effluents d'abattoirs ;
2. de l'identification des voies de contamination par le prion des animaux via l'environnement ;

1. Pour ce qui concerne la première question, ce point a été abordé lors de la réunion du 21 janvier 2003 réunissant des experts des deux Comités d'experts spécialisés ESST et EAUX. La question a été reformulée et il s'agit de déterminer :

- la répartition théorique du Système nerveux central (SNC) retenu lors du traitement d'épuration des eaux usées ;
- le pourcentage de SNC retenu lors du traitement d'épuration des eaux usées.

Etant donné qu'en l'état actuel des connaissances, ces déterminations ne sont pas possibles, il est proposé d'adopter un raisonnement basé sur la répartition induite par les dimensions des fractions de SNC dans les eaux usées.

Parmi les principales caractéristiques physico-chimiques des agents transmissibles non conventionnels (ATNC), on note :

- que la taille de l'agent infectieux de la tremblante expérimentale du hamster a été estimée entre 15 et 40 nm par des expériences d'ultrafiltration ;

- que l'agent infectieux présente une grande hydrophobicité et un fort potentiel d'agrégation. Ainsi, lorsqu'ils sont placés en milieu aqueux, les ATNC ont tendance à s'agréger et à sédimenter ;
- que la protéine du prion (PrP) est le constituant majeur, voire unique, de la fraction infectieuse dans les ESST. La PrP-res est considérée comme un marqueur indissociable de l'infectiosité. La PrP-res présente un certain nombre de caractéristiques particulières :
 - la masse moléculaire de la PrP-res est comprise entre 30 et 35 kDa en fonction de l'état de glycosylation de la protéine (elle peut être bi-, mono ou non glycosylée).
 - la PrP-res a tendance à se polymériser sous forme de fibrilles spécifiques, les « Scrapie Associated Fibrils » ou SAF, quand elle est mise en présence de détergents. Le diamètre de ces fibrilles a été estimé, dans le cadre d'une expérience égal à 4nm.
 - la structure 3D de la protéine PrP-res n'est pas connue, mais les données actuellement disponibles permettent de dire que cette protéine est majoritairement constituée de feuillets β .

Au regard des propriétés physico-chimiques de l'agent infectieux, dans le cas d'une filière classique d'épuration des eaux usées, les différentes étapes sont susceptibles de favoriser l'élimination des ATNC présents dans ces eaux :

- Lors de l'étape de pré-traitement, les particules de taille supérieure à quelques dizaines de micromètres peuvent être éliminées et par voie de conséquence l'ensemble des agents infectieux agrégés à ces particules.
- Lors de l'étape de traitement physico-chimique (primaire ou tertiaire), l'ajout d'agents de coagulation et de floculation adéquats favorise l'élimination des matières colloïdales et éventuellement des agents infectieux agrégés, liés aux colloïdes ou libres dans l'eau. Au cours de ces deux premières étapes, la pollution initialement présente dans les effluents liquides se retrouve concentrée dans les déchets de pré-traitement et dans les boues primaires (ou tertiaires). Les agents sont alors susceptibles d'être présents dans ces boues, leur devenir devra donc être pris en considération.
- Les traitements biologiques par action des microorganismes permettent d'abattre la charge organique. Leur action potentielle sur les particules de nature protéique n'est pas connue.

Ainsi, des axes de recherche restent à définir pour évaluer expérimentalement l'impact de ces traitements sur le devenir des particules de nature protéique notamment l'agent infectieux.

En outre, l'utilisation de la technique d'ultrafiltration membranaire avant rejet de ces eaux contribue certainement à intégrer un facteur important de réduction de risque. Ainsi au cours de la réunion du 21 janvier 2003, il a été demandé au Comité d'experts spécialisé eaux de définir la porosité de la membrane d'ultrafiltration à appliquer.

Concernant les membranes d'ultrafiltration, le point de coupure habituellement indiqué pour décrire une membrane l'est :

- pour une pression donnée,
- pour une molécule ayant un encombrement sphérique donné

L'utilisation d'une membrane permet de garantir la rétention de 95% des molécules dont le poids moléculaire est égal au point de coupure. Pour obtenir un abattement de 3 log, le rapport entre le poids moléculaire et le seuil de coupure doit être proche de 2,5.

Pour garantir ces résultats, l'intégrité permanente de la membrane doit être assurée par un dispositif de suivi adapté.

Ces considérations amènent à formuler différentes hypothèses :

- Si l'agent infectieux se retrouve libre dans l'eau, en estimant le poids de cet agent proche du poids moléculaire de la protéine PrP-res soit 30 kDa et en se basant sur l'expérience ayant permis d'évaluer la taille de l'agent infectieux entre 15 et 40 nm, le poids moléculaire de cet agent se situerait alors entre 25kDa et 90 kDa.

En considérant que le point de coupure de la membrane a été déterminé dans les mêmes conditions que celles de son utilisation :

- pour un seuil de coupure de 100 000 Daltons, la rétention de l'agent est de 50%
- pour un seuil de coupure de 30 000 Daltons, la rétention de l'agent est de 95%
- pour un seuil de coupure de 10 000 Daltons, la rétention de l'agent est de 99,9%

- Si les agents infectieux sont agrégés et en considérant :
 - a. que la taille des agrégats et leur poids moléculaire sont supérieurs à ceux de la PrP-res (30 kDa). Alors, le pourcentage de rétention de l'agent sera plus important pour un seuil de coupure équivalent que lorsque le prion se retrouve libre dans l'eau,
 - b. que les agrégats formés sont des fibrilles de taille proche de 4 nm. Les données concernant la longueur de ces fibrilles ne sont pas disponibles. Dans ce cas, seul un procédé membranaire correspondant à ces tailles (nanofiltration ou osmose inverse) permettrait un abattement significatif mais les techniques actuelles n'offrent pas des garanties suffisantes.
- Si l'agent infectieux de par sa grande hydrophobicité se trouve lié à des particules en suspension dans l'eau. La rétention par une membrane d'ultrafiltration sera fonction de la taille et de la conformation dans l'espace des particules auxquelles sont liés les agents infectieux.

Etant données les hypothèses précédentes, le choix des caractéristiques de la membrane se fera en fonction des objectifs de performance que l'on souhaite atteindre pour une installation. A noter que les traitements d'épuration des eaux utilisés en amont doivent permettre l'obtention d'une eau de qualité suffisante pour pouvoir mettre en oeuvre un traitement d'ultrafiltration.

2. Pour ce qui concerne les voies de contamination par le prion des animaux via l'environnement, le schéma suivant présente les principales voies d'exposition théoriques susceptibles de toucher les populations animales lors de l'émission dans l'environnement d'eaux usées ou de boues contaminées par les ATNC :

Eaux usées → Eaux de surface → Animaux
Eaux usées → Eaux souterraines → Animaux
Eaux usées – Sols → Plantes → Animaux
Boues – Sols → Plantes → Animaux
Boues – Sols → Animaux
Boues – Sols → Particules → Animaux
Boues – Sols → Eaux de surface → Animaux
Boues – Sols → Eaux souterraines → Animaux

Veuillez agréer, Monsieur le président, l'expression de mes sentiments les meilleurs.